

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İSTANBUL İLİ VE ÇEVRESİNDE TOPLANAN KENELERDE  
NAİRO, FLEBO VE FLAVİVİRUSLARIN ARAŞTIRILMASI**

**Bio. Nergis EMANET**

**Mikrobiyoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA  
2020**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, akademik hayatımın temellerini attığım bu süreçte heyecanıma ortak olan, tecrübeleriyle bilimsel gelişimime katkıda bulunan, değerli bilgi birikimiyle yolumu aydınlatan, ulusal ve uluslararası mecralarda bana imkanlar sunan sevgili danışman hocam Prof. Dr. Koray ERGÜNAY' a,

Akademik hayatımın şekillenmesinde önemli bir yere sahip olan danışman hocam ile yollarımızı kesiştiren, değerli bilgi birikimini her zaman esirgmeden aktaran, mesleki hayallerim konusunda beni her zaman cesaretlendiren sevgili hocam Prof. Dr. S. Bülent ALTEN'e,

Tez çalışmamı yapabilmem için bana tüm olanakları sağlayan, Tıbbi Mikrobiyoloji AD. Başkanı saygıdeğer Prof. Dr. Cumhuri ÖZKUYUMCU'ya,

Tez çalışmamın arazi örneklemelerinde bizzat benimle çalışan, kene teşhislerini laboratuvarını açarak bana öğreten, tezde kullanılan örneklerin bir kısmını bağışlayan Doç. Dr. Sırrı Kar'a ve arazi sürecim boyunca beni yalnız bırakmayan, benimle örnekleme yapan sevgili kuzenim Muhammet USTA'ya,

Kene örneklerimin teşhis edilmesi sürecinde bana laboratuvarlarını kullanımına sunan sevgili H.Ü. EBAL ekibine,

Eğitimimin her aşamasında bana katkı sağlayan değerli bölüm hocalarıma,

Çalışmalarımın her aşamasındaki katkılarından dolayı teknisyen İrfan ATMACA'ya

Lisans eğitimimden bu yana kendime olan inancımı kaybettiğim her anda desteklerini hissettiğim sevgili dostlarım Fatmanur ŞENER, Büşra KARACALAR, Nisanur DİLMEN ve Tuğba KAYGISIZ'a

Yüksek lisans eğitimim boyunca dostluklarını ve desteklerini ilk günden bu yana hissettiğim başta Öznur GÜRPINAR, Gökçe KIRCA, Dr. Öğr. Üyesi Serra ÖRSTEN, Dr. Tuğçe ÜNALAN, Dr. Selay DEMİRCİ DOS SANTOS DUARTE ve Ceyda KIRCALI olmak üzere tüm arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan, beni her konuda destekleyen ve yalnız bırakmayan sevgili anneme, babama ve kardeşlerime çok teşekkür ederim.

## ÖZET

**Emanet, N., İstanbul İli ve Çevresinde Toplanan Kenelerde Nairo, Flebo ve Flavivirusların Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2020.** Bu çalışmada, İstanbul ili ve çevresinden toplanan örneklerde kene kaynaklı virüslerin taranması, kene kaynaklı hastalıkların epidemiyolojisinin belirlenmesi ve kene türlerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Arbovirüsler içerisinde *Bunyavirales* takımında *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae* ailelerinde ve *Flaviridae* ailesinde yer alan *Nairovirüs*, *Flebovirüs* ve *Flavivirüs* cinsleri, kenelerle bulaşma gösteren, aralarında Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKAV), trombositopeni sendromlu yüksek ateş ve kene kaynaklı ensefalit virüsü gibi, tüm dünyada önemli sağlık sorunları oluşturmuş virüsleri içermektedir. Belirli bir bölgede vektör kaynaklı ya da patojen olmayan virüs aktivitesinin bilinmesi, hastalık riskinin değerlendirilebilmesi ve epidemiyolojik özelliklerin incelenebilmesi için, eklemcanelerin sürveyansı önem taşımaktadır. Bu çalışmada, ülkemizde nüfus yoğunluğu en fazla İstanbul ili ve çevresinden toplanan kene örneklerinde jenerik PZR yöntemleri ile nairo-, flebo- ve flavivirüsler araştırılmış, saptanan virüsler DNA dizi analizi ile tanımlanmış ve bulgular tartışılmıştır. Çalışma kapsamında 2013, 2014, 2015 ve 2018 yıllarında İstanbul, Kırklareli, Edirne ve Tekirdağ illerinden 37 lokasyondan bayraklama ve hayvan örnekleme ile 7154 kene toplanmıştır. Morfolojik incelemeler, örnekler arasında en sık saptanan türün *Ixodes* sp. (%30,92) olduğunu göstermiş, bunu *Hyalomma marginatum* (%14,29), *Hyalomma scupense* (%13,45), *Haemaphysalis parva* (%9,40), *Rhipicephalus turanicus* (%8,17) ve diğerleri takip etmiştir. Toplanan örnekler; lokasyon, cinsiyet ve türe göre toplam 572 havuz olarak virüs taramasına alınmış, %0,7'sinde (4/572) nairovirüs ve %3,3'ünde (19/572) flebovirüs pozitifliği saptanmıştır. Ancak havuzlarda flavivirüs RNA'sı tespit edilememiştir. Bölgede KKKAV ve KKKAV-AP92 izolatu saptanmıştır. Bunun yanı sıra ülkemizden daha önce bildirilmiş olan yeni kene kaynaklı flebovirüslere dair veriler elde edilmiştir. Bu veriler kene kaynaklı flebovirüsler ile ilgili bölgeden yapılmış olan ilk bildirimdir.

**Anahtar kelimeler:** Kene, Nairovirüs, Flebovirüs, Flavivirüs, PCR

## ABSTRACT

**Emanet, N., Investigation of Nairo, Phlebo and Flavivirus in Ticks Collected around Istanbul Province Hacettepe University Graduate School Health Sciences, MSc, thesis in Microbiology, Ankara, 2020.** In this study, we aimed to screen tick-borne viruses, to determine the epidemiology of tick-borne diseases and to identify tick species in samples collected from around Istanbul province. Among arboviruses under the order *Bunyvirales*, *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae* families and *Flaviviridae* family there are Nairovirus, Phlebovirus and Flavivirus genus which include tick-borne viruses with significant global health impact, such as Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV), severe fever with thrombocytopenia syndrome virus and tick-borne encephalitis virus. Arthropod surveillance provides information on regional vector-borne or non-pathogenic virus circulation, for the understanding virus epidemiology and risk assessment. In this study, we carried out nairovirus, phlebovirus and flavivirus screening in ticks via generic PCR, around Istanbul province which has a significant part of the urban population of Turkey. The detected strains were characterized via sequencing. A total of 7154 ticks were collected by flagging and animal sampling from 37 localities in Istanbul, Kırklareli, Edirne and Tekirdağ provinces, during 2013, 2014, 2015 and 2018 years. Morphological identification revealed *Ixodes* sp. (30.92%) to be the most abundant species, followed by *Hyalomma marginatum* (14.29%), *Hyalomma scupense* (13.45%), *Haemaphysalis parva* (9.40%), *Rhipicephalus turanicus* (8.17%) and others. The individuals were pooled in a total of 572 specimens, according to species, sex and collection sites. Nairovirus screening provided positive results in 0.7% (4/572) and phlebovirus screening provided positive results in 3.3% (19/572) of the pools. However, flavivirus RNA could not be detected in any tick pools. CCHFV and CCHFV-AP92 isolates were detected in the region. In addition, we obtained data on new tick-borne phleboviruses previously reported from Turkey. This is the first report from the region of tick-borne phleboviruses.

**Key words:** Tick, Nairovirus, Phlebovirus, Flavivirus, PCR

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xiv
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Eklembacaklı Kaynaklı Virüsler	3
2.2. Keneler ve Genel Özellikleri	5
2.3. Kene Kaynaklı Arbovirüsler	7
2.4. Orthonairovirüsler	11
2.4.1. Tarihçe	11
2.4.2. Genel Özellikler, Virion ve Genom Yapısı	11
2.4.3. Hücre İçi Replikasyon	13
2.4.4. Hayat Döngüsü, Konaklar ve Yayılım	14
2.4.5. Patogenez, Klinik Bulgular ve Tanı	15
2.4.6. Tedavi ve Korunma	16
2.5. Flebovirüsler	16
2.5.1. Tarihçe	16
2.5.2. Genel Özellikler, Virion ve Genom Yapısı	18
2.5.3. Hücre İçi Replikasyon	18
2.5.4. Hayat Döngüsü, Konaklar ve Yayılım	19
2.5.5. Patogenez, Klinik Bulgular ve Tanı	19
2.5.6. Tedavi ve Korunma	20
2.6. Flavivirüsler	21
2.6.1. Tarihçe	21

2.6.2. Genel Özellikleri, Virion ve Genom Yapısı	21
2.6.3. Hücre İçi Replikasyon	23
2.6.4. Hayat Döngüsü, Konaklar ve Yayılım	24
2.6.5. Patogenez, Klinik Bulgular ve Tanı	25
2.6.6. Tedavi ve Korunma	26
2.7. Türkiye’de Kene Kaynaklı Virüsler	27
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>29</b>
3.1. Arazi Çalışmaları	29
3.2. Laboratuvar Çalışmaları	31
3.2.1. Kene Havuzlarında Homojenizasyon ve Nükleik Asit İzolasyonu	31
3.2.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	32
3.2.3. Kene Örneklerinde Nairovirüs RNA’sının Araştırılması	33
3.2.4. Kene Örneklerinde Kene Flebovirüs RNA’sının Araştırılması	34
3.2.5. Kene Örneklerinde Flavivirüs RNA’sının Araştırılması	35
3.2.6. Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi	37
3.2.7. Kenelerde Tespit Edilen Falvivirüs, Nairovirüs ve Kene Flebovirüslerinin Tanımlanması	38
<b>4. BULGULAR</b>	<b>40</b>
4.1. Toplanan Örnek Sayısı ve Dağılımı	40
4.2. Kene Örneklerinde Nairovirüs İncelemeleri	43
4.3. Kene Örneklerinde Flebovirüs İncelemeleri	47
4.3. Kene Örneklerinde Flavivirüs İncelemeleri	53
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>54</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>64</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>66</b>
<b>8. EKLER</b>	
EK-1: Kene Örneklemelerinin Yapıldığı Lokasyonlara İlişkin Bilgiler	
EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Bildirimler	
EK-3: Orjinallik Raporu	
EK-4: Dijital Makbuz	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>%</b>	Yüzde
<b>°C</b>	Derece santigrad
<b>g</b>	Gram
<b>kb</b>	Kilobaz
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>ml</b>	Mililitre
<b>mm</b>	Milimetre
<b>M</b>	Molarite
<b>mM</b>	Milimolar
<b>µl</b>	Mikromolar
<b>nm</b>	Nanometre
<b>rpm</b>	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
<b>pmol</b>	Pikomol
<b>A.</b>	<i>Argas</i>
<b>aa</b>	Amino asit
<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>Am.</b>	<i>Amblyomma</i>
<b>B.</b>	<i>Boophilus</i>
<b>bç</b>	Baz çifti
<b>cRNA</b>	Komplementer RNA
<b>D.</b>	<i>Dermacentor</i>
<b>DH<sub>2</sub>O</b>	Distile su
<b>DNA</b>	Deoksiribo Nükleik Asit
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleozit trifosfat
<b>EBAL</b>	Ekolojik Bilimler Araştırma Laboratuvarı
<b>ELISA</b>	Enzim işaretli immünolojik tanı yöntemi (“Enzyme-linked immunosorbent assay”)
<b>ER</b>	Endoplazmik retikulum

<b>H.</b>	<i>Hyalomma</i>
<b>Hae.</b>	<i>Haemaphysalis</i>
<b>HRTV</b>	Heartland virüsü
<b>I.</b>	<i>Ixodes</i>
<b>ICTV</b>	Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (“International Committee on Taxonomy of Viruses”)
<b>KKKA</b>	Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi
<b>KKKAV</b>	Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü
<b>mRNA</b>	Mesajcı RNA
<b>MSS</b>	Merkezi Sinir Sistemi
<b>n</b>	Örnek sayısı
<b>NKHV</b>	Nairobi koyun hastalığı virüsü
<b>O.</b>	<i>Ornithodoros</i>
<b>Ot.</b>	<i>Otobius</i>
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimeraz Polymerase Chain Reaction)
<b>R.</b>	<i>Rhipicephalus</i>
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>RT-PCR</b>	Ters Transkripsiyonlu Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
<b>SFTSV</b>	Trombositopeni Sendromlu Yüksek Ateş Virüsü (Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus)
<b>TBE</b>	Kene Kaynaklı Ensefalit (Tick-Borne Encephalitis)
<b>TOSV</b>	Toskana virüs
<b>UTR</b>	Untranslated region
<b>vRNA</b>	Viral RNA



## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. İnsanların tesadüfi ya da son konak olduğu arbovirüslerin yaşam döngüsü.	4
2.2. Vektör kenelerde patojenlerin aktarımı.	6
2.3. Nairovirüs ve flebovirüs virion yapısı.	12
2.4. Nairovirüs ve flebovirüs genom yapısı.	13
2.5. Nairovirüslerin ve flebovirüslerin hücre içi replikasyonu.	14
2.6. Flavivirüslerin virion ve genom yapısı.	22
2.7. Flavivirüslerin hücre içi replikasyonu.	24
3.1. Örneklem yapılan lokasyonları gösteren harita.	29
3.2. Kene örneklemede kullanılan bayraklama yöntemi.	30
4.1. Kene örneklerinin illere göre dağılımı.	40
4.2. Kene örneklerinin biyolojik evre ve illere göre dağılımı.	41
4.3. KKKAV nükleik asit dizi hizalama sonuçları.	44
4.4. KKKAV aminoasit dizilimi.	44
4.5. 19, 20, 44 ve 45 kodlu havuzlarda saptanan nairovirüs nükleotit dizilerinin analizi.	46
4.6. Flebovirüs nükleik asit dizi hizalama sonuçları.	49
4.7. Flebovirüs aminoasit dizilimi.	49
4.8. 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 32, 38, 40, 41, 42, 43 ve 47 kodlu havuzlarda saptanan flebovirüs nükleotit dizilerinin analizi.	53

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. Kene kaynaklı virüslerin sınıflandırılması.	8
3.1. Nairovirüs PCR için kullanılan jenerik primer dizileri.	34
3.2. Nairovirüs PCR için karışım içeriği ve reaksiyon koşulları.	34
3.3. Kene Flebovirüs PCR için kullanılan jenerik primer dizileri.	35
3.4. Kene Flebovirüs PCR için karışım içeriği ve reaksiyon koşulları.	35
3.5. İki turlu Flavivirüs PCR için kullanılan jenerik primer dizileri.	36
3.6. İki turlu flavivirüs 1.tur PCR için karışım içeriği ve reaksiyon koşulları.	36
3.7. İki turlu flavivirüs 2.tur PCR için karışım içeriği ve reaksiyon koşulları.	36
4.1. Kene örneklerinin tür, toplama bölgesi ve biyolojik evreye göre dağılımı	42
4.2. Nairovirüs pozitif olarak izlenen havuzların özellikleri.	43
4.3. Çalışmada saptanan Nairovirüs dizilerinin nükleotit (475 bç) karşılaştırma matrisi.	45
4.4. Çalışma saptanan Nairovirüs dizilerinin amino asit (158 aa) karşılaştırma matrisi.	45
4.5. Flebovirüs pozitif olarak izlenen havuzların özellikleri.	47
4.6. Çalışmada elde edilen Flebovirüs dizilerinin nükleotit (508 bç) karşılaştırma matrisi.	51
4.7. Çalışma elde edilen Flebovirüs dizilerinin amino asit (169 aa) karşılaştırma matrisi.	52

## 1. GİRİŞ

Arbovirüsler vektör sivrisinekler, kum sinekleri ve keneler ile özgün konaklarına aktarılmaktadır. Arbovirüslerin vektörleriyle konaklarına iletimi yatay nakil, dikey nakil ve aynı konak üzerinde eş zamanlı beslenme ile gerçekleşmektedir (1). İnsanlar bazı arbovirüslerin yaşam döngüsünde tesadüfi ya da son konak yer alabilirler. İnsan sağlığı için önemli arz eden arbovirüslerin en önemli konakları arasında memeliler, kuşlar ve kemirgenler yer almaktadır (2). Arbovirüslerin yayılımında vektör ve konakları etkileyen çevresel ve ekolojik faktörler önemli bir role sahiptir (3, 4). Çeşitli biyotik ve abiyotik faktörlerin etkisiyle son yıllarda dünya çapında arboviral salgınlar artış göstermiştir (2).

Keneler, güncel taksonomide çeşitli özelliklerine göre *Argasidae*, *Ixodidae* ve *Nuttalliellidae* olmak üzere üç aile içerisinde sınıflandırılır ve yaklaşık 900 türe sahiptir (5). Yeryüzünde geniş bir yayılıma sahip zorunlu ektoparazit olan keneler; memeli, kuş, sürüngen ve amfibilerden kan emerler (6). Bu süreçte de çeşitli patojenleri duyarlı konaklara aktarırlar. Keneler birçok bakteriyel, protozoal ve viral enfeksiyonun vektörüdür. Kene kaynaklı enfeksiyonların en yaygın vektörleri *Amblyomma*, *Boophilus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes* ve *Rhipicephalus* cinslerine ait çeşitli türlerdir. *Amblyomma* cinsi dışındaki cins ve türlerin Türkiye’de varlığı bildirilmiştir (7).

Kene kaynaklı Arbovirüsler yeni taksonomik düzenlemeler ile *Bunyavirales*, *Mononegavirales* ve sınıflandırılmayanlardan oluşan takımların ailelerinde yer almaktadır (8, 9). Dünya üzerinde önemli insan ve hayvan patojeni olarak bildirilmiş olan kene kaynaklı virüslerin büyük bir çoğunluğu *Bunyavirales* takımından *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae* ve *Phenuiviridae* ailelerinde ve *Flaviridae* ailesinde bulunmaktadır (8-11). İnsan ve hayvanlarda enfeksiyonlara yol açan kene kaynaklı virüsler arasında KKKAV, NKHV, SFTSV, HRTV, TBE virüsü, Kyasanur orman hastalığı virüsü, Alkhumra kanamalı ateşi virüsü, Omsk kanamalı ateşi virüsü ve “Louping ill” virüsleri sıralanabilir (11).

Türkiye’de vektör keneler ile duyarlı konaklara bulaşan çeşitli bakteriyel, parazitik ve viral etkenler saptanmıştır (12). Bunların içerisinde en iyi bilinen viral enfeksiyon etkeni KKKAV’dür ve virusun çeşitli özellikleri, vektör keneler ve yayılımları ile ilgili kapsamlı çalışmalar bulunmaktadır. Buna karşın KKKAV dışında kalan muhtemel viral ajanlar konusunda bilgiler oldukça sınırlıdır. Son yıllarda yapılan güncel çalışmalar ile, KKKAV’nin çeşitli genotiplerinin ülkemizdeki varlığı ortaya konmuştur (13, 14). Bu çalışmalarda aynı zamanda çeşitli kene kaynaklı flebovirüslere ek olarak, “Anadolu Kene Flebovirüsü” olarak isimlendirilen yeni bir virüs tanımlanmıştır (13, 14). Bu ve benzeri flebovirüslerin Güneydoğu Anadolu, İç Anadolu, Akdeniz ve Ege bölgelerinde çeşitli kene türlerinde tespit edildiğine dair bulgular söz konusudur (15).

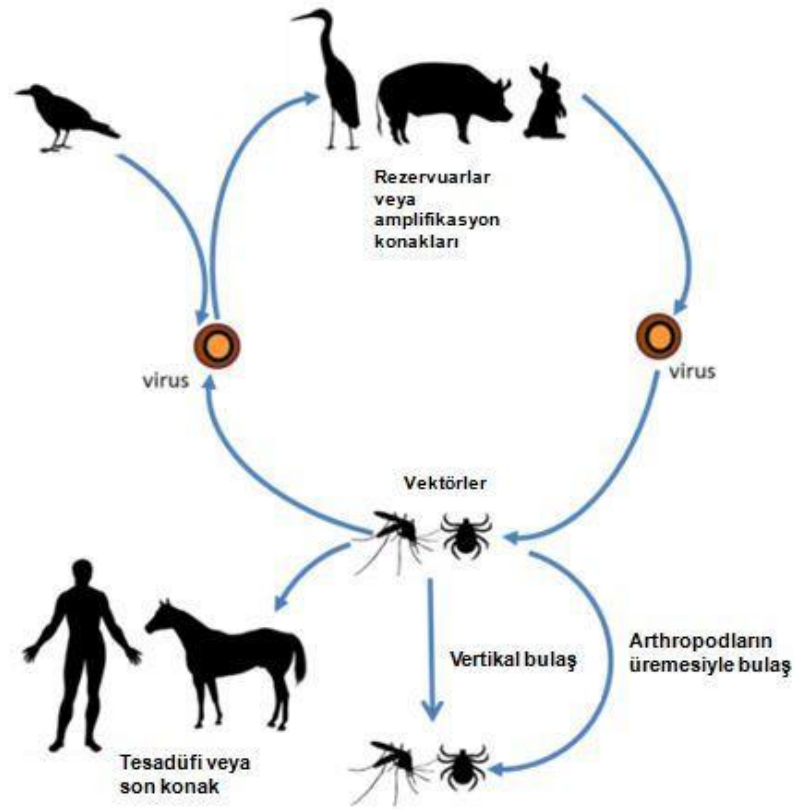
Bu tez çalışması ile, İstanbul ili ve çevresinde (Trakya bölgesinde) belirli lokasyonlarda yapılan arazi çalışmalarından toplanan örneklerde kene kaynaklı virüslerin taranması, kene kaynaklı hastalıkların epidemiyolojisinin belirlenmesi ve vektör kene türlerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Eklem Bacaklı Kaynaklı Virüsler

Arbovirüs (“arthropod-borne”, eklem bacaklılar kaynaklı virüs), kan emici eklem bacaklılar tarafından bulaştırılan virüsleri tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Arbovirüslerin yaşam döngülerinde sıklıkla en az iki konakçı, bir eklem bacaklı ve bir omurgalı bulunmaktadır. Özgün konaklarında yeterli viremi düzeyine ulaşan virüsler, vektör eklem bacaklılar ile aktarılır. Arbovirüslerin biyolojik iletimi çoğunlukla yatay ve dikey nakil ile olmakla birlikte aynı konak üzerinde eş zamanlı beslenme ile aktarım da söz konusudur (1).

Arbovirüslerin yaşam döngüleri, genellikle vektör eklem bacaklılar ile özgün ara konaklar arasında gerçekleşir. Sivrisinekler, kum sinekleri ve keneler başta gelen vektörlerdir (16). Sivrisinekler ve keneler virüs naklinde rolleri tanımlanan ilk eklem bacaklılardır. Bu eklem bacaklılar sarı humma ve “Louping ill” virüslerinin vektörleri olarak tespit edilmişlerdir (17, 18). İnsanlar çoğunlukla arbovirüslerin yaşam döngüsünde yer almazken, bazı virüsler için tesadüfi ya da son konak olarak döngüye katılmaktadır. Halk sağlığı için önemli olan arbovirüslerin en önemli konakları memeliler, kuşlar ve kemirgenlerdir (2).



**Şekil 2.1.** İnsanların tesadüfi ya da son konak olduğu arbovirüslerin yaşam döngüsü ((19) no.lu kaynaktan uyarlanmıştır.).

Arbovirüsler, çevresel ve ekolojik faktörlerin etkilediği bir coğrafik dağılıma sahiptir. Dünya üzerinde geniş bir yayılıma sahip olan arbovirüsler, çoğunlukla ılıman iklim kuşağında, iklim koşullarının uygun olduğu zaman dilimlerinde, soğukkanlı eklem bacaklıların dağılımına paralel olarak izlenir. Yağış, sıcaklık ve nem yaygınlıklarında etkili olur. Bunların yanı sıra bitki örtüsü ve diğer ekolojik faktörler ile eklem bacaklı vektörlerin ve omurgalı konakların etkileşimlerine bağlı olarak coğrafi dağılımları etkilenir (3, 4).

Arbovirüsler uygun vektör ve omurgalı konak popülasyonlarının elverişli çevresel koşullarda bulunması sonucu hızlı bir biçimde çoğalır ve insanda enfeksiyon oluşturacak seviyelere ulaşır. Viral genom varyasyonları, konakçı çeşitliliğini etkileyen faktörler, omurgalıdaki virülans veya viremi seviyesi, vektör spektrumundaki değişiklikler, olguların sporadik ya salgın şeklinde izlenmesinde etkili olur. Ayrıca çevresel değişiklikler, yeni nişler, ticaret ve seyahat gibi faktörler de epidemiyolojik değişikliklere neden olur (4). Arboviral salgınlar son 20 yılda

çeşitli nedenlerle küresel ölçekte ortaya çıkmış ve birçok enfeksiyonun prevalansında artış gözlemlenmiştir (2).

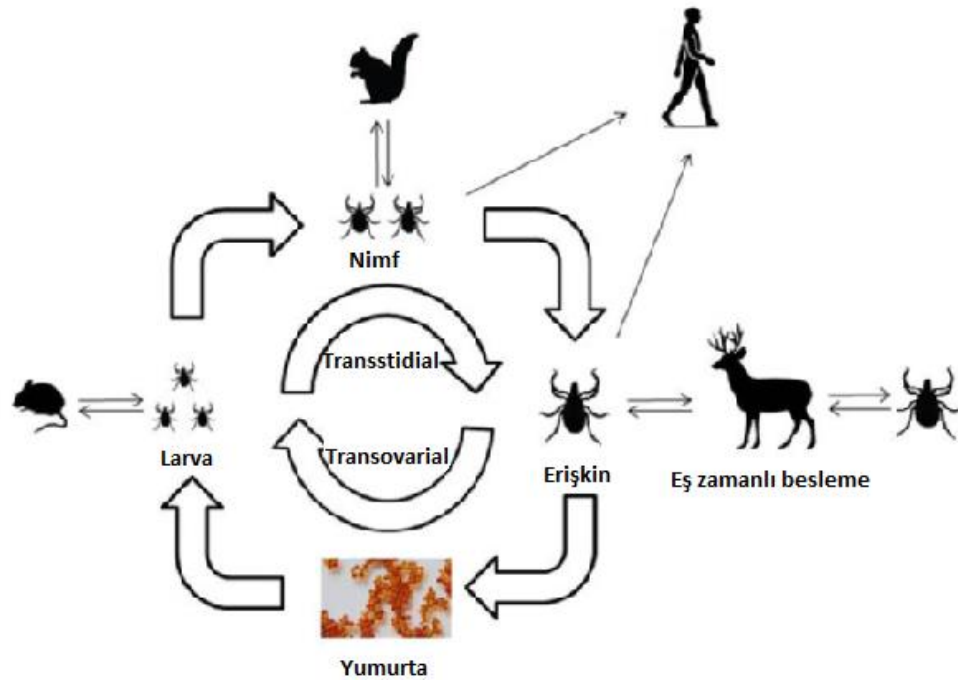
## 2.2. Keneler ve Genel Özellikleri

Keneler, insan ve hayvan sağlığı açısından önem taşıyan çeşitli patojenlerin aktarımında vektör olarak rol oynamaları nedeniyle tıbbi entomoloji ve veterinerlik alanlarında önemli bir yere sahip eklembacaklılardır (6).

Keneler, biyolojik sınıflandırmada *Arthropoda* şubesi *Arachnida* sınıfı, *Acarina* takımında yer almaktadır. Biyolojik, morfolojik ve davranışsal özelliklerine göre, *Argasidae* (yumuşak keneler), *Ixodidae* (sert keneler) ve *Nuttalliellidae* olmak üzere üç aile içerisinde incelenmektedirler. Dünya üzerinde, *Argasidae*; 193 tür, *Ixodidae*; 702 tür ve *Nuttalliellidae*; 1 tür olmak üzere yaklaşık 900 kene türü teşhis edilmiştir (5, 20). Subtropikal iklim bölgelerinden subarktik bölgesine kadar yeryüzünde geniş bir yayılıma sahiptirler. Zorunlu ektoparazit olan keneler; çeşitli memeli, kuş, sürüngen ve amfibi türlerinden kan emerler (21).

Yaşam döngülerinde larva, nimf ve ergin olarak üç temel evre bulunmaktadır. Yumurtadan çıkan larva, kan emip konak üzerinde gelişimi için gerekli süreyi geçirdikten sonra gömlek değiştirir ve nimfe dönüşür. Bu süreci takip eden evrede nimf, özgün konağı üzerinden kan emdikten sonra gömlek değiştirir ve nimflerin ergin dişi ve erkek bireylere dönüşmesi ile yaşam döngüleri tamamlanır. Erginlerin aynı konak üzerinde gerçekleştirdikleri çiftleşme hareketinden sonra kan emen dişiler toprağa düşer ve çok sayıda yumurta bırakır. Böylelikle yaşam döngüleri bir yıl içerisinde tamamlanır. Evreler arası geçiş süreleri, konak özellikleri ve kan emme periyotlarının uzunlukları gibi farklılıklar nedeniyle, türler arasında değişiklik göstermektedir. Bir tür, her evrede farklı konakları tercih edebilmektedir. Yaşam döngüsünün tamamlanma süresi ve periyotları da türler arasında değişiklik göstermektedir. Bu değişkenliğin en önemli etkeninin kan emme süresi ve zamanındaki farklılıklardan olduğu bilinmekle birlikte diğer biyolojik ve çevresel faktörlerinde etkilediği gösterilmiştir (6).

Keneler, patojen mikroorganizmaları enfekte omurgalılarından kan emme sırasında alır ve deri değiştirme sürecinde patojeni vücudunda bulundurur. Patojenin duyarlı konaklara aktarımı da kan emme yoluyla gerçekleşir. Kenelerin patojeni aktarımı üç yolla gerçekleşmektedir: Horizontal (yatay) aktarım, enfekte vektörler arası cinsel birleşme ve ergin dişinin kan emme esnasında omurgalı konağa virüsü aktarmasıdır. Vertikal (dikey) aktarım ise, ergin dişi bir vektörün başkalaşımları esnasında yaşam formlarına, virüsü yumurtaya kadar aktarımıdır. “Co-feeding” (eř zamanlı beslenme) ile aktarımda ise kan emen kene patojeni konağa aktarır ve aynı konaktan kan emen başka bir kene etkeni almak suretiyle enfekte olur, böylece aynı konak üzerinde keneler arası etken aktarılır (şekil 2.2.) (1, 22).



**şekil 2.2.** Vektör kenelerde patojenlerin aktarımı ((22) no.lu kaynaktan uyarlanmıştır.).

Keneler birçok bakteriyel, protozoal ve viral enfeksiyonların vektörüdür (23). 19 yy. başlarında “Louping ill” bildiriminden bu yana virüslerin taşınmasındaki rolü bilinmekte (18) ve insan ve hayvanlarda etken patojenlerin aktarılmasında ki olduğu bildirilmiştir (11).

Kene kaynaklı enfeksiyonların en yaygın vektörleri *Ixodiade* ailesinden *Amblyomma*, *Boophilus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes* ve



*Rhipicephalus* cinslerinin türleridir (24). *Amblyomma* cinsi hariç, diğer cinslerin türlerinin Türkiye’de var olduğu tespit edilmiştir (25).

### **2.3. Kene Kaynaklı Arbovirüsler**

Uluslararası virüs taksonomisi komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) tarafından yapılan yeni düzenlemelere göre kene kaynaklı virüsler *Bunyavirales*, *Mononegavirales* ve sınıflandırılmayanlardan oluşan takımların aileleri içerisinde yer almaktadır. Önemli insan ve hayvan patojeni olduğu bilinen kene kaynaklı virüslerin büyük bir çoğunluğu ise *Bunyavirales* takımından *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae* ve *Phenuiviridae* ailelerinde ve *Flaviridae* ailesinde bulunmaktadır (Tablo 2.1.) (8, 9, 11).

**Tablo 2.1.** Kene kaynaklı virüslerin sınıflandırılması (8, 11).

Takım	Aile	Cins	Virüs	Vektör	Coğrafi Dağılım		
<i>Bunyavirales</i>	<i>Nairoviridae</i>	<i>Orthonairovirus</i>	KKKAV	<i>H. marginatum</i> <i>Ixodes spp.</i> <i>R. rossicus</i>	Avrupa, Asya ve Afrika		
			Dugbe virüs	<i>Am. variegatum</i> <i>H. truncatum</i> , <i>B. decoloratus</i>	Sahra altı Afrika		
			NKHV	<i>R. appendiculatus</i>	Hindistan, Sri Lanka		
			Ganjam virüs	<i>R. appendiculatus</i>	Afrika		
			Farallon virüs	<i>Ornithodoros spp.</i>	Amerika		
			Hughes virüs	<i>O. denmarki</i>	K. Galler, Büyük Britanya Fransa, Hint okyanusu		
			Zirga virüsü	<i>Ornithodoros spp.</i> , <i>A. cooleyi</i>	Abu Dabi		
			<i>Peribunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	Bahig virüs	<i>H. marginatum</i>	İtalya
					Matruh virüs	<i>H. marginatum</i>	Mısır, İtalya
				<i>Flebovirus</i>	Uukuniemi virüs	<i>Ixodes ricinus</i>	Fillandiya, Avrupa ve Azerbeycan
	Mukawa virüs	<i>I. persulcatus</i>			Japonya		
	Lone Star virüsü	<i>Am. americanum</i>			Amerika		
	Palma virüs	<i>H. punctata</i>			Portekiz		
	Kaisodi virüsü	<i>H. spinigera</i>			Güney Hindistan Rusya		
	Khasan virüsü	<i>H. longicornis</i>			Malaya		
	Lanjan virüsü	<i>D. auratus</i>			Amerika		
	Heartland virüsü	<i>Am. americanum</i>			Avustralya		
	<i>Mononegavirales</i>	<i>Nyamiviridae</i>	<i>Nyavirus</i>	Midway virüsü	<i>Ornithodoros spp.</i>	Pasifik, Japonya	
				Nyamanini virüsü	<i>A. walkerae</i> <i>A. arboreris</i>	Nijerya, Mısır, Hindistan, Tayland ve G. Afrika	
				Sierra Nevada virüsü	<i>O. coriaceus</i>	Amerika	
<i>Rhabdoviridae</i>				<i>Ledantevirus</i>	Barur virüsü	<i>H. intermedia</i>	Hindistan, Kenya, Somali

<b>Bir takıma dahil edilmeyenler</b>	<b>Asfarviridae</b>	<i>Vesiculovirüs</i>  <i>Diğer Rhabdovirüsler</i>	Kolente virüs	<i>Am. variegatum</i>	Gine
			Yongjia kene virüsü 2	<i>H. hystrici</i>	Çin
			İsfahan virüsü	<i>H. asiaticum</i>	Türkmenistan
			Long Island kene rhabdovirüsü	<i>Am. americanum</i>	Amerika
			Zahedan rhabdovirüsü	<i>H. anaticum</i>	İran
			Connecticut virüsü	<i>I. dentatus</i>	Amerika
			New Minto virüsü	<i>H. leporispalustris</i>	Amerika
			Sawgrass virüsü	<i>D. variabilis,</i> <i>H. leporispalustris</i>	Florida
			Afrika domuz vebası virüs	<i>O. moubata,</i> <i>O. erraticus</i>	Sahra altı Afrika, G. Avrupa ve G. Amerika
			<b>Flaviviridae</b>	<i>Asfvirüs</i>	Kyasanur orman hastalığı virüsü
	Alkhumra kanamalı ateşi virüsü	<i>Ornithodoros savigny</i>			Sudi Arabistan
	Louping ill virüsü	<i>I. ricinus</i>			İrlanda, İngiltere, İskoçya ve Galler
	Omsk kanamalı ateşi virüsü	<i>Dermacentor reticulatus</i>			Rusya ve B.Sibirya
	Powassan virüsü	<i>Ixodes spp. ve I. cookei</i>			Kanada, Amerika ve Rusya
	Geyik kene virüsü	<i>I. scapularis</i>			New England
	Kene ensefalit virüsü	<i>I. ricinus,</i> <i>I. persulcatus ve I. ovatus</i>			K. Avrupa, K. Asya ve Sibirya
	Karshi virüsü	<i>O. papillipes</i>			Malta
	Langat virüsü	<i>I. granulatus</i>			Fransa
	Saumarez Reef virüsü	<i>O. capensis</i>			Avustralya
	Tyuleniy virüsü	<i>I. eudyptidis,</i> <i>I. putus</i>			Tuleniy adası
	<b>Orthomyxoviridae</b>	<i>Quarjavirüs</i>	Johnston Atoll virüsü	<i>O. capensis</i>	Avustralya, Yeni Zellanda, Havai
<i>Quaranfil virüsü</i>			<i>A. arboreus</i>	Nijerya, Kuveyt, İran ve Irak	
<i>Thogotovirüs</i>		Dhori virüsü	<i>Hyalomma spp.</i>	D. Rusya, Mısır	

			Jos virüsü	<i>Amblyomma spp.</i> , <i>Rhipicephalus spp.</i>	Gine, Afrika, Fildişi Sahili, Senegal
			Thogoto virüsü	<i>Rhipicephalus spp.</i> , <i>Boophilus spp.</i> , <i>Hyalomma spp.</i> , <i>Am. variegatum</i>	Orta ve Doğu Afrika, G. Avrupa, G. Portekiz
	<b>Reoviridae</b>	<i>Coltivirus</i>	Colorado kene ateşi virüsü	<i>D. andersoni</i> , <i>D. occidentalis</i> , <i>D. albipictus</i> , <i>D. arumapertus</i> , <i>H.leporispalustris</i> , <i>Ot. lagophilus</i> , <i>I. sculptus</i> , <i>I. spinipalpis</i>	Amerika
			Eyach virüsü	<i>I. ricinus</i> , <i>I. ventalloi</i>	Almanya ve Fransa
			Baku virüsü	<i>O. maritimus</i>	Hazar Denizi Özbekistan
			Chenuda virüsü	<i>A. hermanni</i>	Mısır, Özbekistan
			Essaouira virüsü	<i>O. maritimus</i>	Morocco
			Huacho virüsü	<i>O. amblus</i>	Peru
			Kala Iris virüsü	<i>O. maritimus</i>	Morocco
			Mono Lake virüsü	<i>A. cooleyi</i>	Kaliforniya
			Sixgun virüsü	<i>A. cooleyi</i>	Amerika
			Chobar Gorge virüsü	<i>Ornithodoros spp.</i>	Nepal
			Great Island virüsü	<i>I. uriae</i>	Kanada
			Kemerovo virüsü	<i>I. persulcatus</i> , <i>I. ricinus</i>	Rusya, Slovakya
			Lipovnik virüsü	<i>I. ricinus</i>	Slovakya, Çekya
			Tribec virüsü	<i>I. ricinus</i> , <i>H. punctata</i>	Slovakya, İtalya, Belarus
			Seletar virüsü	<i>B. microplus</i>	Malezya, Singapur
			Wad Medani virüsü	<i>R. sanguineus ve</i> <i>Hyalomma spp.</i>	D. Afrika, Asya, Jamaika

## 2.4. Orthonairovirüsler

### 2.4.1. Tarihçe

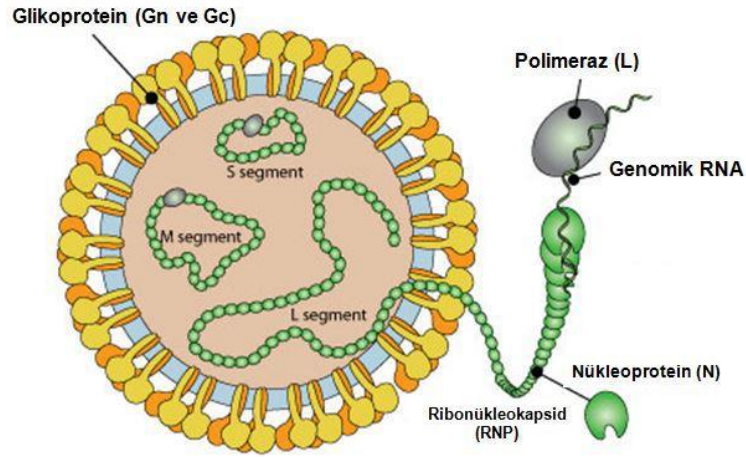
*Orthonairovirüs* cinsi, *Nairoviridae* içerisinde yer alır ve ICTV tarafından Şubat 2019 tarihinde yapılan değişiklikler ile 17 cinsi kapsamaktadır (8). Bunların arasında, önemli patojenler olan Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsü ve Nairobi Koyun hastalığı ve Dugbe virüsleri bulunmaktadır (11, 26).

Nairovirüslerin prototipi olarak kabul edilen Nairobi koyun hastalığı virüsü (NKHV), ilk kez 1910 yılında Kenya’da Nairobi yakınlarında akut gastroenterit gözlenen bir koyundan izole edilmiş ve 1917’de enfeksiyon etkeni olduğu bildirilmiştir. NKHV varyantı olan Ganjam virüsü ise yeni tanımlanmıştır (11, 27, 28).

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsü (KKKAV)nün tanımlanmasından önce etkeni olduğu Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), balgam, kusma, kanlı idrar ve rektum, bağırsaklar, diş etleri ve abdominal kanamaların görüldüğü hastalardan 12. yüzyılda Tacikistan’da kaydedilmiştir (29, 30). Modern tıbbın gelişmesiyle birlikte, 1944-1945 yıllarında Rus askerlerinde hastalığın bulgularının görülmesiyle, KKKA kliniği ayrıntılı olarak belirlenmiştir. KKAV ise 1967 yılında farelere, enfekte hastaların kan ve dokularının intraserebral inokülasyonu ile izole edilmiş, ancak Kongo’da ateşli bir hastadan izole edilmiş olan Kongo virüsü ile antijenik olarak ayırt edilememiştir. Daha sonra Asya, Avrupa ve Afrika’dan izole edilen suşların antijenik benzerlikleri nedeniyle virüs Kırım Kanamalı Ateşi-Kongo olarak ve daha sonraları ise KKKAV olarak isimlendirilmiştir (30, 31).

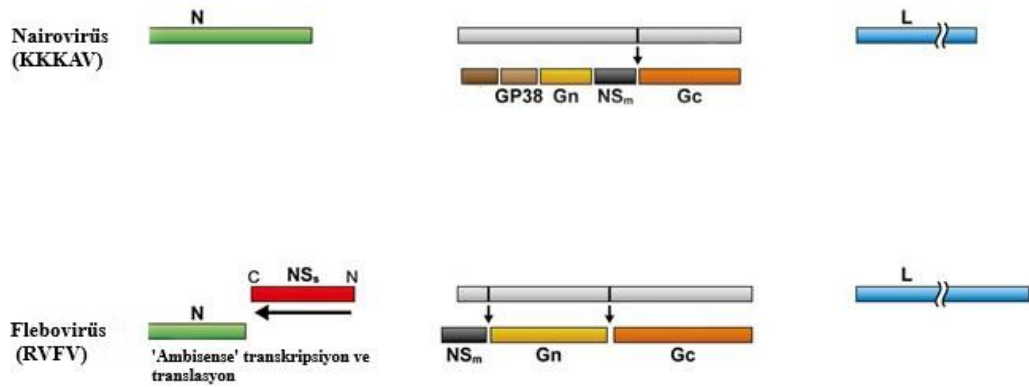
### 2.4.2. Genel Özellikler, Virion ve Genom Yapısı

Orthonairovirüsler tek sarmallı ve yaklaşık 18.8 kb olan RNA genomuna sahiptir. Genom ortalama 100 nm çapında ve helikal simetrik yapıda ve üç segmentlidir.



**Şekil 2.3.** Nairovirüs ve flebovirüs virion yapısı ((32, 33) no.lu kaynaklardan uyarlanmıştır.).

RNA segmentleri; S (“small”; 1,7 kb), M (“medium”; 4,9 kb) ve L (“large”; 12,2 kb)’dir (26, 32). Segmentlerin her birinde, tek bir açık okuma bölgesi (“open reading frame”, ORF) bulunmaktadır. S segment, nükleokapsid proteinini (N, ~53 kDa) kodlamaktadır. N proteini virionda en yoğun bulunan proteindir ve RNA’nın korunmasında ve viral replikasyonda birçok önemli rolü bulunmaktadır (32). M segment, zarf glikoproteinlerini kodlamaktadır. Nairovirüslerin birçoğunda iki adet glikoprotein (Gn; 35 kDa ve Gc; 75 kDa) bulunmasına karşın Hazara ve CloMor virüslerinde üç adet glikoprotein olduğu gösterilmiştir (26, 32). Genom segmentlerinden L, viral RNA-bağımlı RNA polimeraz enzimini kodlamaktadır. Bu enzim, viral RNA (vRNA) ve komplementer RNA (cRNA)’ların replikasyon ve transkripsiyonunda rol oynamaktadır. Yapısal çalışmalarla, L segmentinin amino (N) terminal ucunda korunmuş over tümörü benzeri proteaz bölgelerinin bulunduğu bildirilmiştir (34).

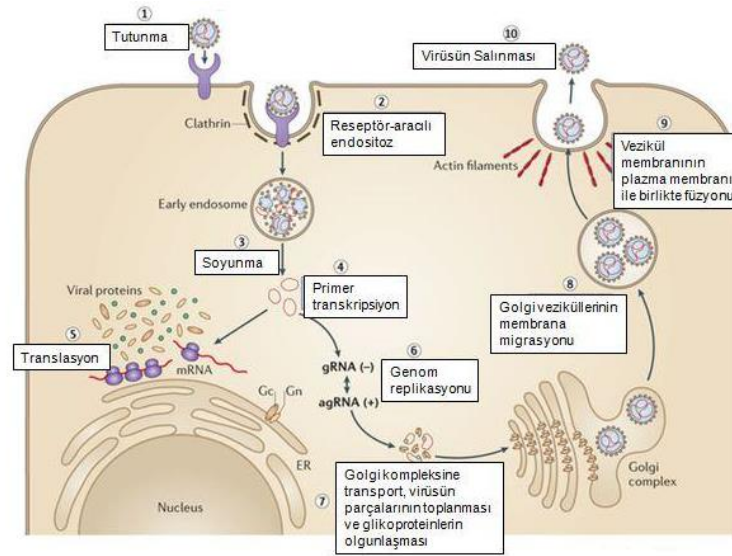


**Şekil 2.4.** Nairovirüs ve flebovirüs genom yapısı ((32) no.lu kaynaktan uyarlanmıştır.).

Viral genomunun 5' ve 3' kısımlarında, kodlama yapmayan bölgeler (“untranslated region”, UTR'ler) bulunur ve bu bölgelerde transkripsiyon, genom replikasyonu ve paketlenmesi için gerekli düzenleyici motifler yer alır (26). Genom segmentleri uçlarında ise, nairovirüslere spesifik terminal diziler bulunmaktadır (32).

### 2.4.3.Hücre İçi Replikasyon

Nairovirüslerin hücre yüzeyine tutunması yapısal glikoproteinleri (Gn ve Gc) ile olmakla birlikte virüsün hücreye girişinde etkili olan hücre reseptörleri kesin olarak bilinmemektedir (26). Hücre yüzeyine tutunan virüs, endositoz yoluyla hücre içine girer. Endozom membranının, düşük pH'ya bağlı olarak uğradığı konformasyonel değişim ve viral zarfla füzyonu sonucu, nükleokapsid sitoplazmaya geçer. Sitoplazmada genomik RNA'dan mRNA'nın transkripsiyonu gerçekleşir. Viral mRNA aracılığı ile viral proteinler sentezlenir, endoplazmik retikulum (ER)'dan golgi kompleksine taşınır. Viral RNA'dan sentezlenen cRNA kalıp olarak kullanılarak vRNA replikasyonu gerçekleşir. Viral proteinlerin ve RNA'nın sentezinin ardından viral partiküllerin bir araya gelişi golgide gerçekleşir. Yeni oluşan virionlar golgiden tomurcuklanır ve ekzositoz ile konak hücreden ayrılır (26, 32, 34).



**Şekil 2.5.** Nairovirüslerin ve flebovirüslerin hücre içi replikasyonu ((33) no.lu kaynaktan uyarlanmıştır.).

#### 2.4.4. Hayat Döngüsü, Konaklar ve Yayılm

Nairovirüslerin hayat döngüsü sıklıkla birden fazla konak bulunur ve birçoğunun bulaşında vektör olarak keneler rol alır. Keneler aktarımın yanı sıra doğada virüsün bulunduğu rezervuar konaklar olmaları sebebiyle de oldukça önemlidir (35).

Virüsün bulaşması temelde, enfekte kenenin kan emme esnasında tükürük salgısıyla birlikte virüsü konağa aktarması yoluyla gerçekleşir. Bunun yanı sıra enfekte kenenin, çıplak elle toplanması sırasında ezilmesi veya parçalanmasıyla; enfekte hayvanların vücut sıvıları ve dokularıyla temas; enfekte insanların kan ve vücut sıvıları ile temas sonucunda bulaş söz konusudur (30-32). Aktarımında rol oynayan vektör kene türleri ve konakları, virüsler arasında değişkenlik göstermektedir (Tablo 2.1.) (11). Nairovirüsler içerisindeki en önemli enfeksiyöz ajan olan KKKAV aktarımı özellikle *Hyalomma marginatum*, *Rhipicephalus scupulus* ve *Ixodes* spp. kene türleri ile olmakta ve konakları arasında kuşlar, yarasalar, kemirgenler, küçük memeliler, koyun, keçi, sığırlar ve insanlar yer almaktadır. KKKAV Asya, Afrika ve Avrupa'da birçok ülkeden bildirilmiştir (31, 36). Önemli bir hayvan patojeni olarak bilinen NKHV vektörü ise *Rhipicephalus*



*appendiculatus* ve konakları koyun ve keçilerdir. Hindistan, Sri Lanka, Doğru ve Orta Afrika'dan NKHV bildirimleri bulunmaktadır (11).

#### **2.4.5. Patogenez, Klinik Bulgular ve Tanı**

Nairovirüsler içerisinde en önemli insan patojeni, enfekte kişilerde %30 düzeyinde mortalite izlenebilen KKKAV'dır. Kene ısırması ile vücuda giren KKKAV için yaklaşık inkübasyon süresi 1-5 gündür. Enfekte kan veya doku ile temas sonrası bulaşı takiben inkübasyon süresi ise genellikle 5-7 gün olmakla birlikte 13 güne kadar uzayabilmektedir. Hastalığın seyri inkübasyon, prehemorajik, hemorajik ve konvelesan dönem olmak üzere 4 klinik fazda gerçekleşmektedir. Prehemorajik dönemde ani yükselen ateş, miyalji, eklem ağrısı, baş dönmesi, halsizlik, baş ağrısı, bel ve abdominal ağrı görülür. Ateş ortalama 4-5 gün devam ederken bazı olgularda ek olarak ishal, bulantı ve kusma görülebilir. Prehemorajik dönem ortalama 1-7 gün sürmektedir. Hemorajik dönem, genellikle hastalığın 3-5. gününde başlar ve 2-3 gün sürer. Hemorajik semptomlar, mukozaya ve deride peteşi ile yaygın büyük hematomlar şeklinde ortaya çıkar. Kanamalar ise beyin, solunum, ürogenital ve gastrointestinal sistemler başta olmak üzere çeşitli bölgelerde görülebilmektedir. Konvelesan dönem, hastalığın belirtilerinin ortaya çıkışından sonraki 10-20 günde görülür. Bu dönemde, taşikardi, labil nabız, saç dökülmesi, polinörit, görme bozukluğu, işitme kaybı ve hafıza kaybı gibi semptomların görüldüğü bildirilmiştir (31, 32). KKKAV patogenezi tam olarak açıklanmamış olmakla birlikte damar endotel hücrelerinde enfeksiyon ve sitokin üretiminin hastalık tablosunun oluşmasında etkili olduğu bilinmektedir (31).

KKKAV erken tanısı, uygun tedavi, olası nozokomiyal enfeksiyonların ve bulaşın önlenmesi için önemlidir. Virüs izolasyonunun hastalığın ilk 5 gününde hücre kültüründen yapılması mümkün olmasına karşın bu yaklaşım yüksek biyogüvenlik seviyesine sahip laboratuvarlarda çalışılması gerekliliği ve duyarlılığının düşük olması nedeniyle tercih edilmemektedir. Hastalığın akut döneminde tanı için antijen saptamak amacıyla ELISA ("Enzyme-linked immunosorbent assay"; Enzim işaretli immünolojik tanı yöntemi) testleri kullanılmaktadır. Viral RNA'nın kalitatif veya kantitatif olarak RT-PCR ("Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction"; ters transkripsiyonlu polimeraz zincir reaksiyonu) metodu ile saptanması tanıda en sık

tercih edilen yöntemdir. Enfekte kişilerde virüs yükü ile prognoz arasında korelasyon bildirilmiştir. Hasta serumunda IgM ve IgG antikorlarının saptanması, hastalığın yedinci gün itibariyle mümkün olmaktadır. Enfeksiyonun ortaya çıkışından 4 ay sonra özgül IgM'ler kaybolurken, IgG'ler 5 yıl ya da daha uzun süre saptanabilir düzeyde kalmaktadır. KKKAV antikorlarının saptanması için ELISA ya da immüno Floresans yöntemleri kullanılmaktadır (31, 37).

#### **2.4.6. Tedavi ve Korunma**

KKKA için özgül bir tedavi bulunmamaktadır. Hastalığın tedavisinde destekleyici tedavi yaklaşımları olan trombosit, taze donmuş plazma ve eritrosit preparatları uygulanmaktadır. Olguların takibinde sıvı ve elektrolit dengesi kontrol altında olmalıdır. Hastalığın tedavisinde antiviral ajan olarak ribavirin kullanılmakla birlikte etkinliği açık değildir. Hastalığa karşı insan bağışıklamasında kullanılabilecek güvenilir ve etkin bir aşı yoktur (31, 37).

KKKA karşı korunma, özellikle endemik bölgelerde yaşayan ve bu alanlara ziyarette bulunacak bireylerde kişisel korunma önemlerine dayanmaktadır. Bunun yanı sıra enfeksiyonla mücadelede, kenelerin yoğun olarak bulunduğu alanlarda vektör kontrolü ve araksidlerin kullanımı önemli bir yere sahiptir. Hastalık aktivitesinin görüldüğü bölgelerde hayvancılıkla uğraşan kişilerde de enfekte materyalle temastan kaçınmak için koruyucu kıyafet, eldiven ve böcek kaçıracı kullanılmalıdır. Hastanelerde takip edilen KKKA vakaları, nozokomiyal salgınlara kaynak oluşturabilmeleri nedeniyle, uygun kontrol ve izolasyon önemleri altında izlenmelidir (37).

### **2.5. Flebovirüsler**

#### **2.5.1. Tarihçe**

Flebovirüsler, ICTV'nin güncel düzenlemesine göre *Bunyavirales* takımı, *Phenuiviridae* ailesi içerisinde yer alır ve 58 tür ile temsil edilmektedir (8).

Flebovirüsler ilk kez, Balkanlarda 1886'da kum sineği ateşi etkeni olarak bildirilmiş ve klinik bulguları tanımlanmıştır (38). Flebovirüslerin aktarımında rol

oyunayan *Phlebotomus* türleri, 1909 yılında Bosna Hersek'te askeri birliklerde tespit edilmiş ve enfeksiyon etkenini taşıyan vektörler olduğu belirlenmiştir (39). İkinci dünya savaşı sırasında İtalya'da, Kuzey Afrika ülkelerinde, Akdeniz bölgesinde, Hindistan ve Pakistan'da askeri birliklerde büyük salgınlar kaydedilmiş, tarihteki en büyük salgın ise 1948'de Sırbistan'da meydana gelmiştir (40). Muhtemel etkenlerin araştırılması sırasında ikinci dünya savaşında İtalya'da görülen epidemide hastalardan toplanan kan örneklerinden antijenik olarak farklılık gösteren “sandfly fever” Sicilya virüsü ve “sandfly fever” Napoli virüsü tanımlanmıştır (39). Antijenik olarak Napoli virüsü ile benzerlik gösteren Toskana virüsü (TOSV) ise, ilk kez İtalya'da 1971 yılında *Phlebotomus perniciosus* türü kum sineklerinden izole edilmiştir (40, 41). İnsan patojenitesi ile ilgili ilk bulgular ise Portekiz ve İtalya ziyaretleri sonrasında ülkelere dönen İsveç ve Amerika vatandaşlarında görülen merkezi sinir sistemi (MSS) enfeksiyonlarının ardından bildirilmiştir (40, 42, 43). Daha sonraki çalışmalar ile TOSV'nün insanlarda ortaya çıkan çeşitli nörolojik hastalıklarla ilişkili olduğu belirlenmiş ve kum sineği ateşi etkenleri arasında belirgin nörotropizm gösteren tek virüs olduğu ortaya konmuştur (40).

Kene kaynaklı flebovirüsler, eski sınıflandırmaya göre Uukuniemi grup içerisinde dahil edilmiş ve ilk kez 1960 yılında Finlandiya kaynaklı *Ixodes ricinus* kene havuzlarında, grubun prototipi olan *Uukuniemi* virüsünün tespit edilmesi ile bildirilmiştir (44). Virüsün, İskandinavya, Orta ve Doğu Avrupa ve Orta Asya'da Azerbaycan'dan toplanan kenelerden izolasyonları yapılmıştır (11). Uukuniemi grup içerisinde bulunan virüsler, Avrupa, Afrika, Orta Asya, Avustralya ve Amerika'da bildirilmiştir. Bu virüslerin bazılarında ait antikorlar insanlarda saptanmış olmasına rağmen halk sağlığını tehdit eden enfeksiyöz ajanlar olduklarına dair bildirim yoktur (45).

ICTV'nin 2019 yılı güncellemesi ile *Banyangvirus* cinsi altında sınıflandırılan kene kaynaklı flebovirüsler, iki önemli insan patojeni olan Trombositopeni sendromlu yüksek ateş virüsü ve Heartland virüsü olgularının bildirimine kadar göz ardı edilmiştir (46). Trombositopeni sendromlu yüksek ateş virüsü (“Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus”, SFTSV) ilk kez 2009 yılında Çin'de yüksek ateş, miyalji, trombositopeni, lökopeni ve çoklu organ

bozukluğu olan hastalarda tespit edilmiştir (47). Heartland virüsü (HRTV) ise ilk kez 2009 yılında Missouri (ABD)'de, SFTS ile benzer semptomları olan 57 ve 67 yaşlarında iki olguda tarif edilmiştir (48).

### 2.5.2. Genel Özellikler, Virion ve Genom Yapısı

Flebovirüs virionları ikozahedral yapılı, 90-100 nm çapındadır. Flebovirüsler, heliksel yapılı nükleokapsid içeren zarflı virüslerdir. Virüs yapısı yaklaşık olarak %50 protein, %20-30 lipitten oluşmaktadır (Şekil 2.1.) (49).

Viral genom tek iplikli, üç segmentli RNA'dan oluşur. RNA segmentleri S ("small"; 1,7 kb), M ("medium"; 3,2 kb) ve L ("large"; 6,4 kb)'dir (32). Segmentlerin uçlarında, nairovirüslerde olduğu gibi komplementer ve cinse özgül diziler bulundurmaktadır. Bu bölgeler transkripsiyon, genom replikasyonu ve paketlenmesinde de işlevseldir. S segment; nükleokapsid proteinini (N, 253 aa) ve yapısal olmayan proteini (NSs, 316 aa) kodlamaktadır. M segmenti ise 1339 aminoasitten oluşan tek bir proteini kodlar. Bu protein, post-translasyonel modifikasyonu ile NSm yapısal olmayan proteini ve zarf glikoproteinleri (Gc; 65 kDa ve Gn; 55-70 kDa) oluşmaktadır (32). L segmenti, viral RNA-bağımlı RNA polimerazı (2095 aa) kodlamaktadır (Şekil 2.2.) (49, 50). Korunmuş olan genom segmentlerinin ucunda spesifik olarak terminal diziler yer almaktadır(51).

### 2.5.3. Hücre İçi Replikasyon

Flebovirüslerin konak hücre içine girişi, virüs glikoproteinleri ile hücre reseptörleri arasında oluşan etkileşim ile endositoz yoluyla gerçekleşir. Genomik RNA nükleokapsid içerisinde sitoplazmaya geçer ve mRNA transkripsiyonu için kalıp olarak kullanılır. mRNA'nın oluşmasının ardından protein sentezi başlar. Glikoproteinler ER'de sentezlenir ve golgiye taşınır. Yeni oluşan virionlar golgiden tomurcuklanarak hücre lizisi ya da ekzositoz ile hücre dışına salınır (Şekil 2.3) (32, 49, 52).

#### 2.5.4. Hayat Döngüsü, Konaklar ve Yayılım

Flebovirüsler, insan ve hayvan sağlığı için önemli birçok türe sahiptir (11). Konaklara aktarımında ise sivrisinekler, kum sinekleri veya keneler vektör görevi görmektedir. Birçok arbovirüste olduğu gibi hayat döngülerinde bir eklembacaklı ve en az bir omurgalı yer almaktadır. Kene kaynaklı flebovirüslerin aktarımı ise nairovirüslerde olduğu gibi kan emme esnasında tükürük salgısı ile konakçıya verilmesi ile olabildiği gibi enfekte insan veya hayvan vücut sıvısı, kan ve doku temasıyla da olabilmektedir (32).

Kene kaynaklı flebovirüsler içerisinde yer alan iki önemli insan patojeninden SFTSV için bulaşında etken ana vektör *Haemaphysalis longicornis* türü kenelerdir. Virüsün konakları arasında ise fare, kirpi, kedi, köpek, tavuk, keçi, koyun, büyükbaş hayvanlar gibi kenenin tutunduğu düşünülen omurgalılar yer almaktadır (53). İnsanlar SFTSV için tesadüfi konaktır. Virüsün mevcut yayılım alanları orta ve kuzeydoğu Çin, Japonya ve Kore'dir (53). Bir diğer önemli kene kaynaklı flebovirüs olan HRTV'nün ise vektörü *Amblyomma americanum* keneleridir. Konaklarının ise geyik, rakun ve bunlara ek olarak diğer birçok küçük memelinin olabileceği bildirilmiştir (54). Virüsün bildirilen güncel yayılım alanları Amerika Birleşik Devletleri'nde çeşitli kırsal bölgeleri kapsamaktadır (51).

#### 2.5.5. Patogenez, Klinik Bulgular ve Tanı

Enfekte kişilerde SFTSV'ye bağlı klinik belirtiler ateş, çoklu organ bozukluğu ve konvelesan evre olmak üzere üç dönemde ortaya çıkmaktadır: Ani yükselen ateş ile başlayan hastalık yorgunluk, baş ağrısı, gastrointestinal semptomlar, trombositopeni, lökositopeni, lenfadenopati ile yaklaşık 7 gün sürmektedir. Semptomlar genellikle bir haftanın sonunda kaybolmasına karşın, bazı hastalarda hastalığın 7-13. gününde belirgin hale gelen karaciğer ve kardiyak enzimlerde yükselme, çoklu organ işlevsel bozukluğu, hemorajik ve merkezi sinir sistemi belirtilerini takiben çoklu organ yetmezliği meydana gelebilmektedir. Konvelesan dönemde klinik semptomlar ortadan kalkar ve laboratuvar parametreleri normale dönmektedir. Mortalite oranının ise %30' lara kadar çıkabildiği bildirilmiştir (32, 55). HRTV enfeksiyonlarında akut ateşli hastalık tablosunun yanı sıra baş ağrısı,

halsizlik, bulantı, kusma, miyalji, artralji, trombositopeni ve lökopeni izlenebilmektedir. Bazı hastalarda mental durumlarında değişiklikler gözlenmesine karşın ensefalit ya da menenjit ile seyreden enfeksiyon bildirilmemiştir. Bazı olgularda tabloya aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz enzimlerinde yükselme eşlik etmektedir. Özellikle klinik seyri ağır olan hastalarda hiponatremi, yüksek bilirubin, ferritin, kreatin kinaz ve laktat dehidrojenaz, belirgin şekilde artış gösterebilmektedir (54). Her iki virüs için insanda izlenen klinik tablolardan sorumlu patogeneze mekanizmaları, uygun hayvan modellerinin mevcut olmaması nedeniyle ayrıntılı olarak tariflenememiştir. İmmün sistemi baskılanmış çeşitli fare modellerinde çeşitli dokularda SFSTV replikasyonu izlenebilmektedir (56).

Fleboviral enfeksiyonların tanısında kullanılan yaklaşımlar; virüs izolasyonu, viral nükleik asitlerin veya virüse karşı oluşan özgül immün yanıtın belirlenmesi şeklindedir. Virüsün izolasyonu hücre kültüründe veya farelerde intraserebral inokülasyon ile yapılabilir, fakat düşük duyarlılıkları ve uygulamadaki zorluklar sebebiyle tanıda rutin olarak kullanılmaları güçtür. Viral nükleik asitlerin saptanması ise, genomun farklı segmentlerini hedef alan primer ya da prob setleri kullanılarak standart/"nested" RT-PCR, gerçek zamanlı RT- ve multipleks PCR yöntemleri ile mümkündür. Virüse karşı oluşan antikorların saptanması amacıyla, ELISA ve IFA yöntemleri sıklıkla kullanılmakta, antijenik benzerlik gösteren izolatlarda antikor spesifitesinin doğrulanması amacıyla ise nötralizasyon testleri uygulanmaktadır.

### **2.5.6. Tedavi ve Korunma**

Kene kaynaklı flebovirüslerle meydana gelen hastalıkların tedavisi için mevcut klinik yaklaşımlar, genel destekleyici önlemlere dayanmaktadır. Hastaların hematolojik ve pıhtılaşma durumunu izlemek esastır. Ribavirinin bazı vakalarda kullanıldığı bildirilmekle birlikte, bu antiviral ilacın ilgili flebovirüsler üzerindeki etkinliğini doğrulayan klinik çalışma yoktur (55). Kene kaynaklı fleboviral enfeksiyonların önlenmesinde nairovirüslerde olduğu gibi en önemli nokta, duyarlı kişilerle enfekte kenelerin temasının, kişisel korunma önlemleri ve vektör kontrol çalışmaları ile önlenmesidir.

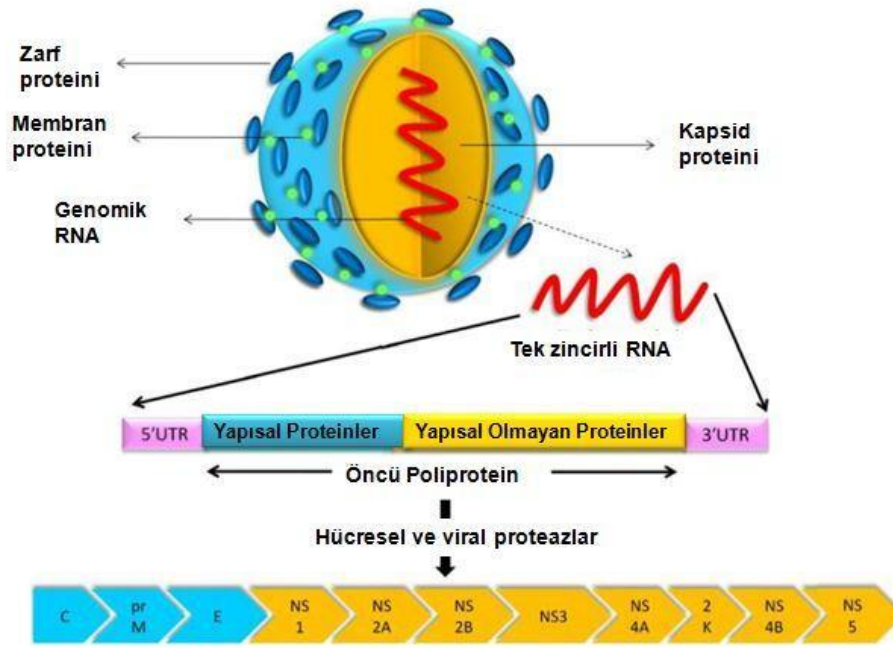
## 2.6. Flavivirüsler

### 2.6.1. Tarihçe

Flavivirüs cinsi, ICTV'nin 2017 yılında yayınlanan 10. raporuna göre *Flaviviridae* ailesi içerisinde yer alır ve elliye aşkın eklem bacaklı kaynaklı virüsü içerir (10). Vektörlerine göre kene kaynaklı ve sivrisinekler kaynaklı olarak gruplandırılan flavivirüslerin prototipi olan sarı humma virüsü ilk kez 1927 yılında Gana'da semptomatik kan örneklerinin makaklara inokülasyonu sonucu izole edilmiştir (57). Sivrisinek kaynaklı flavivirüsler arasında önemli insan patojenlerinden birisi olan Batı Nil virüsü ise, ilk kez Uganda'nın Batı Nil bölgesinde 1937'de bir hastanın kanından izole edilmiştir (58). Akdeniz bölgesinde 18 yy. ortalarında ortaya çıkan salgınlar sonrasında virüsün epidemiyolojisi ve ekolojisi ortaya konmuştur (59). Kene kaynaklı flavivirüsler arasında, en iyi bilinen insan patojeni olan kene kaynaklı ensefalit (Tick-Borne Encephalitis, TBE) virüsüne dair ilk raporlar ise İskandinav kilisenin 18.yy. ait kayıtlarına dayanmakla birlikte ilk kez klinik olarak bildirim, 1931 yılında Avusturya'da ensefalit olgularının izlenmesiyle olmuştur. Virüsün izolasyonu ise 1937'de Rusya'da enfekte bir olgunun beyin dokusundan gerçekleştirilmiştir (60, 61).

### 2.6.2. Genel Özellikleri, Virion ve Genom Yapısı

Flavirüsler tek sarmallı, yaklaşık 9.2-11 kb olan bir RNA genomuna sahiptir. Virüs genomunun 5 've 3' uçlarında, yaklaşık 100 ve 400-700 nükleotidlik UTR'ler bulunmaktadır. Bu bölgeler tek bir ORF bölgesini sınırlandırmaktadır (62).



**Şekil 2.6.** Flavivirüslerin virion ve genom yapısı ((33, 63) no.lu kaynaklardan düzenlenmiştir.).

Viral genom, virüse ait yapısal proteinler kapsid (C), premembran / membran (PM / M) ve zarf (“envelope”, E) proteinleri, ayrıca viral replikasyon enzim ve kofaktörlerini içeren yapısal olmayan proteinleri kodlamaktadır (62). Flavivirüsler arasında genomik RNA’nın yapısal özellikleri korunmasına rağmen, viral genomun dizi kompozisyonu, uzunluğu ve fonksiyonel bölgelerinin yerleşimi, özellikle kene ve sivrisinek kaynaklı virüslerde olmak üzere cinsler arasında farklılık göstermektedir (62, 64).

Flavivirüs virionları 40-60 nm çapında, küresel şekilli olup, lipid zarf içermektedir (10). Flavivirüslerin kapsid yapısı tek bir protein kapsomerinden oluşmaktadır. Olgun virionlar, C- kapsomer (11 kDa) ve E- büyük zarf (50 kDa) proteinlerine sahiptir. Flavivirüslerde NS1 (46 kDa), NS2A (22 kDa), NS2B (14 kDa), NS3 (70 kDa), NS4A (16 kDa), NS4B (27 kDa) ve NS5 (103 kDa) olmak üzere yedi yapısal olmayan protein izlenir (64, 65). Bu proteinlerin ana fonksiyonları viral replikasyon, transkripsiyon ve konak antiviral yanıtının düzenlenmesidir. NS1, viral replikaz için kofaktör aktivitesi gösterir ve kompleman aktivasyonunun regülasyonunu sağlamaktadır. Virüs komponentlerinin bir araya toplanmasında NS2A etkilidir ve bu protein, Batı Nil virüsü gibi bazı virüslerde interferon yanıtının



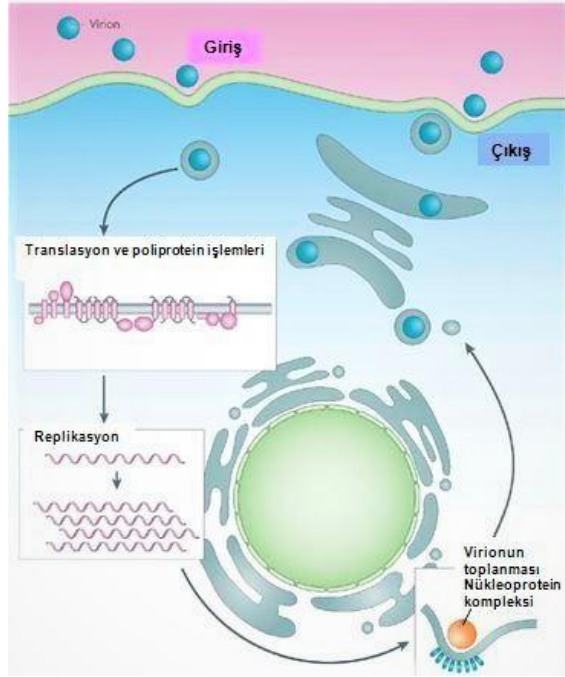
baskılanmasında da rol oynar. Yapısal olmayan proteinlerden NS2B, proteolitik aktivitede kofaktör görevi görmekte, NS3 ise serin proteaz, NTPaz, RNA trifosfataz ve helikaz aktivitesi göstermektedir. ER farklılaşmalarından ve konak savunmasının kontrolünden ise NS4A ve NS4B sorumludur. RNA-bağımlı RNA polimeraz aktivitesi ile virüsün ana replikaz enzimi olan NS5, aynı zamanda viral genomun en iyi korunmuş bölgesidir. Flavivirüslerin tüm cinslerinde genomun benzer bölgelerinden serin proteaz, RNA helikaz ve RNA-bağımlı RNA polimeraz motifleri bulunmaktadır (62, 65, 66).

### **2.6.3. Hücre İçi Replikasyon**

Flavivirüslerin hücre içi replikasyonu, viral hemagglutin özelliği taşıyan E'nin hücre yüzeyindeki özgül reseptöre tutunmasıyla başlar ve reseptör bağımlı endositoz mekanizması aracılığıyla virüs hücre içine alınır. Vezikül içi pH düşüşüne bağlı olarak E proteininde ortaya çıkan konformasyonel değişim sonucu virüs zarfı ile endozomal membran füzyonu gerçekleşir ve nükleokapsid sitoplazmaya geçer (34, 65).

Viral genom replikasyon ve translasyonu ER membran sisteminde gerçekleşir. RNA bağımlı RNA polimeraz enzimi ile viral genoma komplementer RNA sentezlenir ve çift iplikli replikatif yapılar oluşur. Bu moleküllerin kalıp olarak kullanılmasıyla pozitif polariteli yeni viral RNA'lar sentezlenir. Sentezi gerçekleşen yeni RNA'lar ya viral proteinlerin sentezini gerçekleştirir ya da kapsid içerisine paketlenir (34, 65).

Genomik RNA, bunların yanı sıra viral proteinlerin kodlanmasını gerçekleştiren mRNA görevi yapar. Virüse ait yapısal ve yapısal olmayan proteinlerin kodlanması ORF'de gerçekleşir. Viral RNA'nın replikasyonu ve paketlenmesiyle ilgili motifler, genomun 5' ve 3' uçlarındaki kodlamayan bölgelerde bulunmaktadır. Sentezlenen viral poliprotein hücresel ve viral NS2B-NS3 serin proteazlar ile işlenmesi ile olgun yapısal ve yapısal olmayan proteinler meydana gelir (65). ER'de olgunlaşan virüs, trans-golgi ağında taşınır. Bu esnada preM proteinin parçalanmasıyla olgun M proteini oluşur. Sitoplazmik veziküller yoluyla taşımanın ardından olgunlaşan virionlar ekzositoz ile salınır (65).



**Şekil 2.7.** Flavivirüslerin hücre içi replikasyonu ((33) no.lu kaynaktan düzenlenmiştir.).

#### 2.6.4. Hayat Döngüsü, Konaklar ve Yayılım

Genom yapısı ve hücre içi replikasyon aşamaları benzer olmasına rağmen, flavivirüslerin konak ve bulaş yolları türler arasında önemli derecede çeşitlilik göstermektedir (35). Vektör farklılıklarına göre, sivrisinek kaynaklı ve kene kaynaklı olarak gruplanan flavivirüslerin önemli insan ve hayvan patojeni olduğu bilinmektedir (8). Flavivirüslerin yaşam döngüsünde sıklıkla birden fazla konak bulunmakta ve sivrisinekler-omurgalılar ile keneler-omurgalılar arasında süregelmektedir (35).

Flavivirüslerin dolaşımı sıklıkla eklembacaklılar ve konakçı omurgalılar arasında izlenir, bulaşta ise çoğunlukla eklembacaklıların kan emmesi ve konaklara aktarımı etkili olmaktadır. Bulaşmada ayrıca kan ve kan transfüzyonu, organ transplantasyonu, pastörize olmayan süt ve süt ürünlerinin ağız yoluyla ya da aerosoller yoluyla alınımı, enfekte hayvan doku veya kanıyla temas da etkili olabilmektedir (35).

Flavivirüsler içerisinde, insan ve hayvanlarda enfeksiyon etkeni olarak kene kaynaklı flavivirüsler önemli bir yere sahiptir (8). Bunlar arasında TBE virüsü,

Kyasanur orman hastalığı virüsü, Alkhumra kanamalı ateşi virüsü, Omsk kanamalı ateşi virüsü, “Louping ill” virüsü ve Powassan virüs insan veya hayvanlarda önemli enfeksiyon etkenleridir (11, 24, 67). Bu virüslerin vektörleri, konakları ve yayılımları farklılık göstermektedir. Kene kaynaklı flavivirüsler arasındaki en önemli patojenlerden biri olan TBE virüsü, *Ixodes* türleri ile aktarılır ve Avrupa, Asya ve Sibiryada yayılım gösterir (Tablo 2.1) (8). TBE virüsünün konakları arasında büyük omurgalılar, kemiriciler, kuşlar ve insanlar yer almaktadır (61). “Louping ill” virüsünün vektörü *Ixodes ricinus* ve konakları koyun, keçi, sığır, domuz, at, kara tavşanı, orman tavuğu, dağ faresi ve nadiren insandır. Virüs İrlanda, İngiltere, İskoçya, Galler ve Rusya’da yayılım göstermektedir (Tablo 2.1.) (8, 55). Powassan virüsünün vektörü; *Ixodes* türleri ve konakçıları fareler, tarla fareleri, dağ sıçanları, sincaplar, ak kuyruklu geyiklerdir. Amerika Kanada ve Rusya’da virüsün dolaştığı bildirilmiştir (Tablo 2.1.) (68). Amerika New England bölgesinde 1997 yılında, geyik kenesi olarak isimlendirilen *Ixodes scapularis*’ten Powassan virüse genetik benzerliği oldukça yüksek olan bir virüs izole edilmiş ve geyik kene virüsü olarak isimlendirilmiştir. Bu virüs *I. scapularis* ile aktarılmaktadır ve henüz diğer bölgelerde saptanmamıştır (11). Kyasanur orman hastalığı virüsü, vektör *Haemaphysalis spinigera* ile aktarılmakta ve Hindistan’da yayılım göstermektedir (Tablo 2.1.) (8). Ana konağının bazı sıçan türleri olmasıyla birlikte maymunlar ve orman sincapları da konaklarıdır (55, 69). Alkhumra kanamalı ateşi virüsünün, vektörü *Ornithodoros savignyi*, ana konakları ise develer ve koyunlardır (Tablo 2.1.). Virüs Suudi Arabistan’da yayılım göstermektedir (8, 70). Omsk kanamalı ateşi virüsünün ise vektörü *Dermacentor reticulatus* ve ana konağı misk sıçanıdır (Tablo2.1.). Virüsün Rusya ve Batı Sibiryada görüldüğü bildirmiştir (8, 71).

### 2.6.5. Patogenez, Klinik Bulgular ve Tanı

Halk sağlığı açısından önemli olan flavivirüsler gösterdikleri enfeksiyonlarına göre iki grupta toplanmaktadır. Bunlardan ensefalit etkeni olan TBE, “Louping ill” ve Powassan virüslerinin enfeksiyonları nörolojik bulgular ile karakteristiktir (68). TBE ile enfekte kişilerin birçoğunda enfeksiyon asemptomatik seyreder ve enfekte kişilerde immünite gelişir. Semptomların gözlemlendiği kişilerde, prodromal evrede grip benzeri klinik seyir gözlenir. Enfeksiyonun ilerleyen aşamalarında ise menenjit,

meningoensefalit ve miyelit/redikülit görülür. TBE virüsünün inkübasyon süresi 1-2 hafta olmakla birlikte 4 haftaya kadar uzayabilmektedir. Diğer grupta ise Kyasanur orman hastalığı, Alkhumra kanamalı ateşi ve Omsk kanamalı ateşi virüsleri bulunmaktadır. Bu virüslerin etken olduğu enfeksiyonlarda ise kanamalı ateş karakteristiktir (68).

Kene kaynaklı flavivirüslerin patogenizi ile ilgili bilgiler de oldukça kısıtlıdır. Kene ısırığı ile subkütanöz bölgeden vücuda giren virüs makrofaj ve dentrik hücreler ile lenf nodlarına taşınır ve burada replike olur. Replikasyon sonrası virüs lenfatik yolla kan dolaşımına geçer ve birçok organa yayılır (37, 68).

Kene kaynaklı flavivirüslerin tanısı; kan, doku ve BOS örneklerinde virüsün gösterimi, antijen yakalayan ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile gerçekleştirilebilmektedir. Kene kaynaklı flavivirüslerin izolasyonunda yeni doğmuş fareler ve çeşitli hücre kültürleri kullanılmaktadır (37).

Serolojik yöntemler ile kene kaynaklı flavivirüslere karşı oluşan antikor varlığı taranabilir. Fakat TBE virüsü ile diğer flavivirüsler arasında yaygın olarak oluşan çapraz reaksiyonlar sebebiyle sonuçlar dikkatli değerlendirilmelidir. Nötralizasyon testi ise klasik bir yöntemdir ve tipe özgüdür. Akut flaviviral enfeksiyonların tanısında ELISA yardımıyla IgM antikorları gösterilebilir. Tanıda bir diğer yaklaşım ise, IgG antikor seviyesinde dört kat ya da daha fazla titre artışının gözlemlenmesidir (37, 72).

#### **2.6.6. Tedavi ve Korunma**

Arbovirüslerde olduğu gibi flaviviral enfeksiyonların tedavisinde kullanılacak onaylanmış bir antiviral ilaç yoktur (72). Aynı şekilde TBE virüsü için özgül bir antiviral tedavi olmayıp, semptomatik ve destekleyici tedavi uygulanmaktadır (37, 72). Bunların yanı sıra TBE virüsü için yüksek koruyuculuğa sahip aşılar üretilmiştir. Virüs için endemik olan bölgelerde aşılama kene ile temas riski yüksek olan kişilere uygulanmaktadır (37, 61, 73).

Kene kaynaklı flaviviral enfeksiyon etkenlerinden korunmada vektör prevalansının azaltılması amacı ile insektisid uygulaması ve vektörlerin üreme

alanları kontrol altına alınması önemlidir. Aynı zamanda insanlar için aşılama ya da vektör kovucu ilaçların kullanılması gibi önlemler alınmalıdır. Buna karşın, alınan önlemler ile insektisidlere olan direncin artması ve enfeksiyöz artropodların yeni bölgelerde yayılım göstermesi söz konusudur. Bu durum yeni kontrol stratejilerinin gerekliliğine neden olmaktadır (74).

## **2.7.Türkiye’de Kene Kaynaklı Virüsler**

Ülkemizde yapılan çalışmalarla, insanlarda enfeksiyonlara yol açan kene kaynaklı virüslerden yalnızca KKKAV bildirilmiştir. Bunun yanı sıra TBE virüsü açısından çeşitli serolojik veriler de rapor edilmiştir (12). Bunlara ek olarak, son yıllarda yapılan çalışmalar ile enfeksiyon etkeni olarak önemleri açık olmayan çeşitli kene kaynaklı virüslerin bildirimleri de söz konusudur (13-15).

Ülkemizde, KKKA olgusu ilk olarak 2002 yılında Tokat’tan bildirilmiştir (75). Anadolu’da oldukça geniş bir yayılıma sahip olan KKKA olguları, sıklıkla Tokat, Sivas, Yozgat ve Çorum illerinden rapor edilmektedir. T.C. Sağlık Bakanlığı güncel verilerine göre 2002-2017 yılları arasında toplamda 10562 vaka gözlenirken 502 olguda (%4,75) enfeksiyon mortalite ile sonuçlanmıştır. İlk bildiriminden günümüze kadar KKKA, 2008-2009 yıllarında 1315 ve 1318 olgu sayıları ile en yüksek düzeye ulaşmasına karşın, takip eden yıllarda olgu sayıları giderek azalmıştır (76). Vakalar, özellikle kene maruziyeti açısından artmış risk nedeniyle tarım ve hayvancılıkla uğraşan bireyler arasında yoğunlaşmaktadır. Bu doğrultuda, ülkemizde görülen salgınlarda vakaların %90’ı çiftçilerden oluşurken enfeksiyonun görüldüğü kişilerin %60’ında kene ısırma öyküsü bulunmaktadır (77). Enfekte kan ve vücut sıvısı ile bulaş ile en çok etkilenen bir diğer grup ise sağlık çalışanlarıdır ve Türkiye’de bu grupta maruziyet ve fatalite ile sonuçlanan enfeksiyonlar bildirilmiştir (75).

Türkiye’de TBE virüsü çalışmalarının yapıldığı bölgeler benzer iklim ve ekolojik özelliklere sahip olmakla birlikte virüs aktivitesi ile ilgili bilgiler oldukça sınırlıdır (78-81) Bildirilen çalışmalarda, yüksek çapraz reaksiyon gözlenen flavivirüslerden olan TBE virüsünün seropozitifliği hemagglütinasyon inhibisyon ve ELISA testleriyle gösterilmiş olup, nötralizasyon vb. doğrulama testleri ile

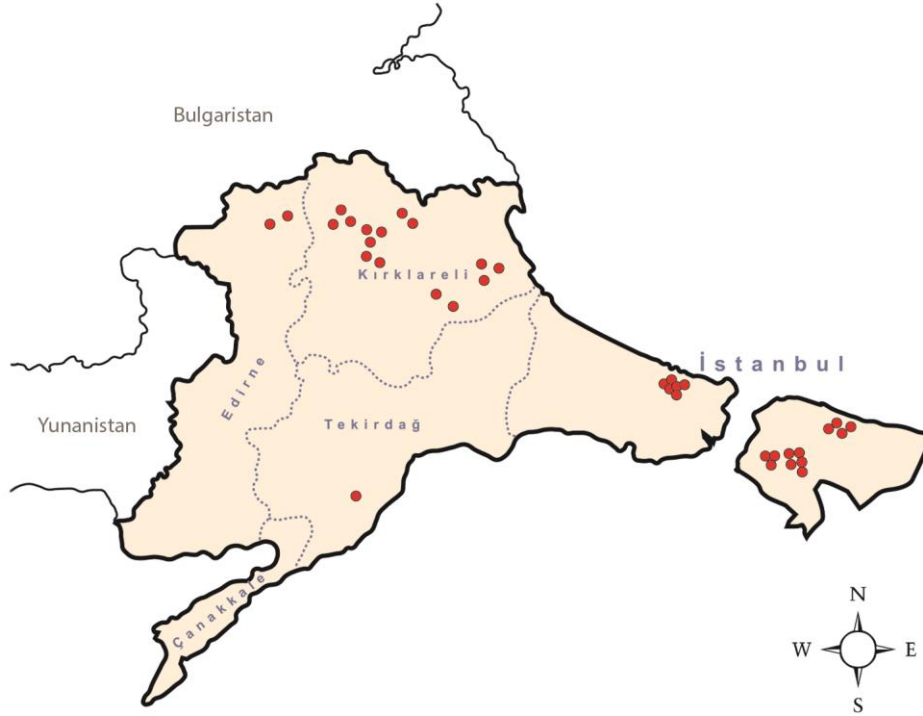
sonuçların kene flavivirüs maruziyetinden kaynaklı olması şüphe uyandırmaktadır. Buna karşın, 2009 yılında Ankara, Konya, Eskişehir ve Zonguldak'tan toplanan 2454 sağlıklı kan donörü ELISA ile TBE virüsü açısından taranmış, bir kişi seropozitif olarak saptanmış ve nötralizasyon testi ile doğrulanmıştır (82).

Son yıllarda ülkemizde yapılan çalışmalarda, kene kaynaklı flebovirüsler ilgili yeni bildirimler bulunmaktadır (13, 14).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Arazi Çalışmaları

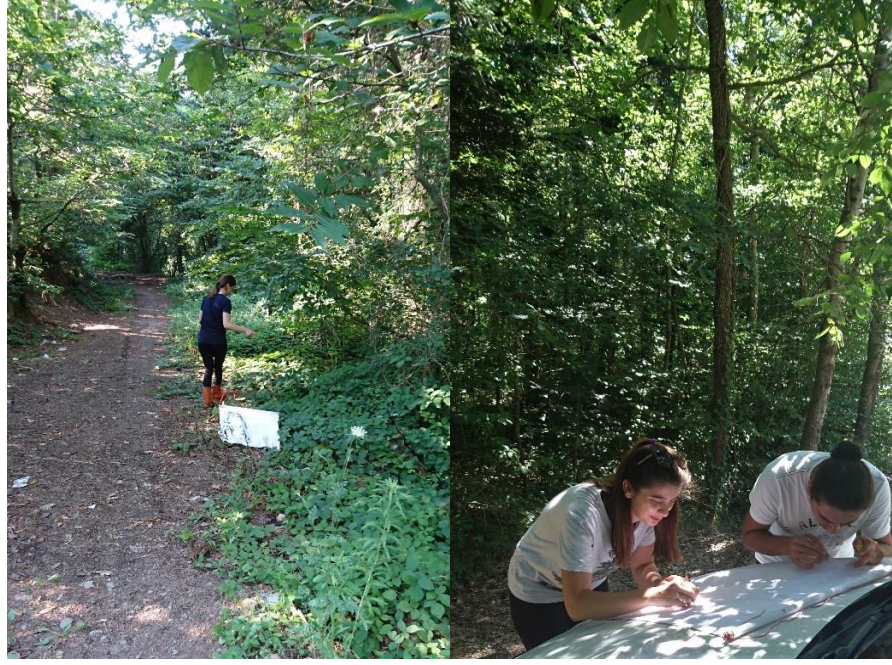
Çalışma kapsamında İstanbul, Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ illeri ve çevresinden toplanmış kene örnekleri değerlendirilmiştir. Arazi çalışmaları İstanbul ilinde 2018 yılı temmuz, ağustos ve kasım aylarında 17 farklı lokasyondan örnek toplanması şeklinde uygulanmıştır. Ayrıca Kırklareli ilinde 2013 yılı nisan ve aralık ayları arası, 2014 yılı ocak ve aralık ayları arası ve 2015 yılı ocak ayında 17 farklı lokasyondan, Edirne ilinde 2014 yılı temmuz ve kasım aylarında 2 farklı lokasyondan ve Tekirdağ ilinde 2013 yılı mayıs ayında 1 lokasyondan Dr. Sırrı Kar tarafından toplanan örnekler incelenmiştir.



**Şekil 3.1.** Örnekleme yapılan lokasyonları gösteren harita (Her bir lokasyon kırmızı nokta ile işaretlenmiştir ve lokasyonlara ait bilgiler EK 1’de verilmiştir.).

İstanbul ilinde yapılan arazi çalışmalarında kenelerin örnekleme amacıyla sürüklenme/bayraklama yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde 75x100 cm beyaz Amerikan bezinden hazırlanmış olan bayrak odak etrafında sürüklenerek konak arayan keneler örnekleme (83). Her odakta bayraklama, iki kişi tarafından 100’er

metre olacak şekilde yapılmış ve bayrak üzerine tutunan keneler pens yardımıyla biyolojik dönemlerine göre ayrı ayrı tüplere alınmıştır (Şekil 3.2.)



**Şekil 3.2.** Kene örneklemesinde kullanılan bayraklama yöntemi.

Kırklareli, Edirne ve Tekirdağ illerinden elde edilen keneler ise, konak örnekleme yaklaşımı ile elde edilmiştir. Örnekleme için koyun, keçi ve sığır konaklar kullanılmıştır. Her iki yöntemle elde edilen keneler biyolojik dönemlerine göre farklı tüplere konulmuştur. Örnekler arazi süreçleri boyunca virüs RNA'sının korunması amacıyla kuru buz bulunan kapalı kutularda saklanmış ve aktarılmıştır.

Arazi çalışmalarında toplanan örneklerin tür teşhisleri, Namık Kemal Üniversitesi Biyoloji Bölümünün ve H.Ü. Biyoloji Bölümü Ekoloji Anabilim Dalı Ekolojik Bilimler Araştırma Laboratuvarı'nda, uygun teşhis anahtarları kullanılarak buz aküleri üzerinde yapılmıştır. Teşhis edilen örneklerde moleküler çalışmalar ise H.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla örnekler odak lokasyonu, tür ve biyolojik evreye göre gruplanarak, birey sayısı en fazla 50 adet olacak şekilde havuzlar oluşturulmuş,  $-80^{\circ}\text{C}$  'de saklanmıştır.



## 3.2. Laboratuvar Çalışmaları

### 3.2.1. Kene Havuzlarında Homojenizasyon ve Nükleik Asit İzolasyonu

Kene havuzlarına buz üzerinde, içeriği %5 fetal dana serumu, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin olan Eagle's MEM (minimal essential medium) vasatı ve 3 adet 7 mm, 5 adet 4.5 mm tungsten boncuklar (QIAgen, Almanya) ilave edilmiştir. Havuzların homojenizasyonları, vorteks (Velp Rx3, İtalya) ile yapılmıştır. Parçalanmış örnekler 4.000 rpm'de 4 dakika santrifüjlenmiş (Hettich Mikro12-24, Almanya), süpernatant alıktanmış ve RNA saflaştırması için kullanılmıştır.

Kene örneklerinden nükleik asit saflaştırılması için, spin-kolon yöntemini temel alan ticari bir sistem olan High Pure Viral Nükleik Asit Kit (Qiagen, Almanya), üreticinin talimatları doğrultusunda uygulanmıştır.

#### High Pure Viral Nükleik Asit Kit (100) (Roche, Almanya) içeriği:

- High Pure Spin Kolonlar, 100 adet
- Tüpler (2ml'lik), 1000 adet
- Poly A, Liyofilize
- Proteinaz K, Rekombinant, Liyofilize
- Binding Buffer
- İnhibitor Removal Buffer
- Wash Buffer
- Elution Buffer

#### High Pure Viral Nükleik Asit Kit (100) (Roche, ALMANYA) Çalışma Protokolü:

1. Liyofilize Poly A tüpüne 500 µl elüsyon tamponu,
2. İnhibitör uzaklaştırma tamponuna 20 ml %96-100 etanol,
3. Yıkama tamponuna 40 ml %96-100 etanol,
4. Liyofize Proteinaz K üzerine 5 ml elüsyon tamponu eklenir.
5. Her bir örnek havuzu için; 400 µl bağlama tamponu, 4 µl Poly A ve 50 µl Proteinaz-K ilave edilerek karışım hazırlanan karışım ters-düz edilerek karıştırılır.

6. Hazırlanan bağlama tamponu içeren Poly A, Proteinaz K karışımı 1,5 ml'lik tüplerin her birine 455 µl olacak şekilde dağıtılır.
7. Kene ekstratları tüplere 200 µl eklenir ve 15 saniye vortekslenir.
8. 72°C de 10 dakika inkübasyon işleminden sonra spin santrifüj yapılır.
9. Santrifüj sonrasında tüplerde bulunan karışım, spin-kolon filtreli tüplerine aktarılır ve her bir spin-kolon tüpüne 500 µl hacimde inhibitör uzaklaştırma tamponu ilave edilir. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir, filtreler temiz tüplere alınır ve kirli tüpler atılır.
10. Üzerine 400 µl yıkama tamponu ilave edilir ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir, filtreler temiz tüplere alınır. Kirli tüpler atılır.
11. 10. basamak tekrar edilir.
12. Alkolü uzaklaştırmak için boş tüpler 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir. Filtreler temiz 1.5 ml'lik tüplere alınır ve kirli tüpler atılır.
13. Filtreli tüplere 50 µl elüsyon tamponu ilave edilir ve 1 dakika inkübe edildikten sonra 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir. Filtreler atılır, tüpe geçen sıvı ekstrakte edilen nükleik asidi içermektedir.

Örnekler daha sonraki çalışmalara kadar -80°C'de saklanabilir. Ancak çalışmalarımızda RNA parçalanmasını minimize etmek için bekletilmeden komplementer DNA sentezi aşamasına geçilmiştir.

### **3.2.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi**

Örneklerden elde edilen RNA ekstraktlarının cDNA'ya çevrilmesi için "RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC, ABD)" ticari kiti kullanılmıştır. cDNA sentezi, elde edilen ürünler ile farklı hedefleri taramak amacıyla, random heksamer primerleri kullanılarak yapılmıştır.

#### Bir Örnek için cDNA Sentezi Protokolü:

Aşağıda "RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC, ABD)" kit içeriği ve bir örnek için kullanılan hacimleri verilmiştir.

Distile su.....	6 µl
Random primer.....	1 µl
RNA.....	6 µl
Reaksiyon Tamponu (5X).....	4 µl
10 mM dNTP.....	2 µl
Ters transkriptaz enzimi.....	1 µl

Yukarıda belirtilen hacimler referans alınarak her bir kene havuzuna uygulanan cDNA sentezinin basamakları şu şekildedir;

- I. Distile su ve Random primerden oluşan “verilen miktarlar X örnek sayısı” kadar karışım hazırlanır ve 0.2 ml’lik tüplere 7’şer µl dağıtılır.
- II. Her bir tüpteki karışım üzerine 6 µl hedef RNA eklenir ve karışım 70°C’de 5 dakika inkübe edilir.
- III. Başka bir tüpte Reaksiyon Tamponu, dNTP ve Ters transkriptaz enzimini içeren karışım hazırlanır ve inkübe edilen karışımın üzerine 7’şer µl dağıtılır.
- IV. Hazırlanan karışımlar termal döngü cihazına yerleştirilir ve 42°C’de 1 saat, 70°C’de 5 dakika inkübe edilir.
- V. Reaksiyon sonucunda elde edilen cDNA’lar, bir sonraki çalışma aşamasına kadar -80°C’de saklanılır.

### 3.2.3. Kene Örneklerinde Nairovirüs RNA’sının Araştırılması

Polimeraz zincir reaksiyonu için örnek başına, 2.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 mM dNTP, TaqPolimeraz 0.3 U/µl, P1 ve P2 primerlerinden 0.8 pmol içeren PCR karışımı 1.5 ml’lik ependorf tüplerinde hazırlanmıştır (Tablo 3.1.). Çalışılacak toplam örnek sayısına göre hazırlanan PCR karışımı, vorteks ile karıştırılıp ardından 3000 rpm’de 10 saniye santrifüj edilmiştir. Karışım, her bir örnek için üzerinde kodları yazılarak hazırlanan steril 0.2 ml’lik PCR tüplerine 27 µl hacimde dağıtılmıştır. Ardından üstlerine 3’er µl CDNA örneği ilave edilip ısı döngü cihazına (Techne<sup>®</sup> TC-3000, Techne Inc., ABD) yerleştirilmiştir (Tablo 3.2.) (84).

**Tablo 3.1.** Nairovirüs PCR için kullanılan jenerik primer dizileri (Y: C veya T, I: İnozin, R: A veya G) (84).

P1	5' -ATGATTGCIAAYAGIAAYTTYAA-3'
P2	5' -ACAGCARTGIATIGGICCCCAAYTT-3'

**Tablo 3.2.** Nairovirüs PCR için karışım içeriği ve reaksiyon koşulları.

İçerik		Koşullar
10X Tampon	3 µl	94°C' de 5 dakika
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.4 µl	
dNTP (10 mM)	0.8 µl	94°C' de 1 dakika 42-50°C' de 1 dakika 72°C' de 3 dakika } 40 döngü
P1 (10 pmol)	0.8 µl	
P2 (1 pmol)	0.8 µl	
Taq Polimeraz (5 U/ µl)	0.3 µl	72°C' de 7 dakika
DH <sub>2</sub> O	18.9 µl	
Kalıp DNA	3 µl	*Her döngüde sıcaklık 0,2°C artmaktadır.
Toplam hacim	30 µl	

PCR işlemlerinde pozitif kontrol olarak, semptomatik bir hastanın kan örneğinden SW-13 hücreleri kullanılarak izole edilmiş, ülkemiz kaynaklı KKKAV Ank-2 izolatına ait cDNA kullanılmıştır (GenBank erişim: MK309333). Pozitif kontrol örneği Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Aykut Özkul tarafından sağlanmıştır.

#### 3.2.4. Kene Örneklerinde Kene Flebovirüs RNA'sının Araştırılması

PCR için örnek başına, 2.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 mM dNTP, Taq Polimeraz 0.3 U/µl, HRT-F ve HRT-R primerlerini 0.6 pmol içeren PCR karışımı 1.5 ml'lik ependorf tüplerinde hazırlanmıştır (Tablo 3.3.). Çalışılacak toplam örnek sayısına göre hazırlanan PCR karışımı, vorteks ile karıştırılıp ardından 3000 rpm'de 10 saniye santrifüj edilmiştir. Karışım, her bir örnek için üzerinde kodları yazılarak hazırlanan steril 0.2 ml'lik PCR tüplerine 27 µl hacimde dağıtılmıştır. Ardından üstlerine 3'er µl cDNA örneği ilave edilip ısı döngü cihazına (Techne<sup>®</sup> TC-3000, Techne Inc., ABD) yerleştirilmiştir (Tablo 3.4.) (46).

**Tablo 3.3.** Kene Flebovirüs PCR için kullanılan jenerik primer dizileri (I:İnozin, Y: C veya T, R: A veya G, W:A veya T ) (46).

HRT-F	5' -CAGCATGGIGGIYTIAGRGAATYATATGT-3'
HRT-R	5' -GAWGTRWARTGCAGGATICCYTGCATCAT-3'

**Tablo 3.4.** Kene Flebovirüs PCR için karışım içeriği ve reaksiyon koşulları.

İçerik		Koşullar
10X Tampon	3 µl	94°C' de 5 dakika 94°C' de 1 dakika 50°C' de 3 dakika 72°C' de 1 dakika 72°C' de 10 dakika <b>40 döngü</b>
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.4 µl	
dNTP (10 mM)	0.6 µl	
HRT-F (10 pmol)	0.6 µl	
HRT-R (10 pmol)	0.6 µl	
Taq Polimeraz (5 U/ µl)	0.3 µl	
DH <sub>2</sub> O	19.5 µl	
1.tur PCR ürünü	3 µl	
Toplam hacim	30 µl	

PCR işlemlerinde, Vero hücrelerinde (ATCC CCL81) çoğaltılmış olan Toskana virüs ISS.Phl.3 izolatu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (13).

### 3.2.5. Kene Örneklerinde Flavivirüs RNA'sının Araştırılması

Flavivirüs polimeraz zincir reaksiyonu iki turda gerçekleşmektedir. Birinci tur PCR için örnek başına, 2.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 mM dNTP, Taq Polimeraz 0.3 U/µl, NS1 ve NS2 primerlerinden 0.6 pmol içeren PCR karışımı 1.5 ml'lik ependorf tüplerinde hazırlanmıştır (Tablo 3.5.). Çalışılacak toplam örnek sayısına göre oluşturulan PCR karışımı, vorteks ile karıştırılıp ardından 3000 rpm'de 10 saniye santrifüj edilmiştir. Karışım, her bir örnek için üzerine her biri bir örnek havuzunu temsil eden kodlar yazılarak hazırlanan steril 0.2 ml'lik PCR tüplerine 27 µl hacimde

dağıtılmıştır. Ardından 3'er µl cDNA örneği ilave edilip ısı döngü cihazına (Techne<sup>®</sup> TC-3000, Techne Inc., ABD) yerleştirilmiştir (Tablo 3.6.). İkinci tur PCR karışımı ise birinci turdan farklı olarak ikinci tur primerleri olan NS3 ve NS4 primerleri kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan 2. tur PCR karışımı, her bir örnek için 27 µl olacak şekilde PCR tüplerine dağıtılmıştır. Her bir tüpün üzerine 3 µl 1.tur PCR ürünü konulmuştur (Tablo 3.7). PCR protokolünün birinci ve ikinci turları aynı sıcaklık döngüleri ile gerçekleştirilmiştir (85).

**Tablo 3.5.** İki turlu Flavivirüs PCR için kullanılan jenerik primer dizileri (Y: C veya T, W: A veya T, N: C veya G, R: A veya G) (85).

<b>1.TUR</b>	<b>NS1</b>	<b>5' - GCATCTAYAWCAYNATGGG – 3'</b>
	<b>NS2</b>	<b>5' - CCANACNYNRTTCCANAC – 3'</b>
<b>2.TUR</b>	<b>NS3</b>	<b>5' - GCNATNTGGTWTYATGTGG - 3'</b>
	<b>NS4</b>	<b>5' - CATRTCTTCNGTNGTCATCC – 3'</b>

**Tablo 3.6.** İki turlu flavivirüs 1.tur PCR için karışım içeriği ve reaksiyon koşulları.

İçerik		Koşullar
<b>10X Tampon</b>	<b>3 µl</b>	<b>94°C' de 5 dakika</b> <b>94°C' de 1 dakika</b> <b>50°C' de 3 dakika</b> <b>72°C' de 1 dakika</b>
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	<b>2.4 µl</b>	
<b>dNTP (10mM)</b>	<b>0.6 µl</b>	
<b>NS1 (10pmol)</b>	<b>0.6 µl</b>	
<b>NS2 (10pmol)</b>	<b>0.6 µl</b>	<b>40 döngü</b> <b>72°C' de 10 dakika</b>
<b>Taq Polimeraz(5U/ µl)</b>	<b>0.3 µl</b>	
<b>DH<sub>2</sub>O</b>	<b>19.5 µl</b>	
<b>Kalıp DNA</b>	<b>3 µl</b>	
<b>Toplam hacim</b>	<b>30 µl</b>	

**Tablo 3.7.** İki turlu flavivirüs 2.tur PCR için karışım içeriği ve reaksiyon koşulları.

İçerik		Koşullar
10X Tampon	3 µl	94°C' de 5 dakika 94°C' de 1 dakika 50°C' de 3 dakika 72°C' de 1 dakika 72°C' de 10 dakika
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.4 µl	
dNTP (10 mM)	0.6 µl	
NS3 (10 pmol)	0.6 µl	
NS4 (10 pmol)	0.6 µl	
Taq Polimeraz (5 U/ µl)	0.3 µl	
DH <sub>2</sub> O	19.5 µl	
1.tur PCR ürünü	3 µl	
Toplam hacim	30 µl	

PCR işlemlerinde pozitif kontrol olarak Vero hücreleri (ATCC CCL81)'nde çoğaltılmış Batı Nil virüsü NY99-4132 izolatu kullanılmıştır.

### 3.2.6. Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi

Stok 50X TAE (Tris-Baz-Asetik Asit-EDTA) solüsyonunun hazırlanması:

- Tris -Base 242 g (Applichem, Almanya)
- Asetik Asit 57,1 ml (Merck, Almanya)
- EDTA 100 ml 0,5 M (pH= 8.0) (Applichem, Almanya)

Distile su içerisinde (600 ml), tris ve asetik asit çözdürülerek içerisine 100 ml 0,5 M EDTA eklenmiş ve karışımın toplam hacmi distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Hazırlanan 50X TAE otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Stok solüsyonu 50X TAE agaroz jel hazırlanması ve yürütme tamponu olarak kullanılması aşamalarında 1X'e dönüştürülerek kullanılmıştır.

Agaroz Jelin Hazırlanması ve Agaroz Jel Elektrofrez:

1. 20 ml 50X TAE, 80 ml distile su içerisinde seyreltilerek 1X TAE hazırlanmıştır.
2. Jel için 1 g agaroz tartılarak üzerine 50 ml 1X TAE eklenmiş, tampon içerisinde agarozun erimesi için karışım mikrodalga fırında ısıtılmıştır.

3. Agarozun erirken çok fazla kaynamamasına dikkat edilmiş, ısındıktan sonra 45-50°C'ye soğutulmuş ve içerisine 2 µl etidyum bromür (10 mg/ml) çözeltilisi eklenmiştir.
4. Jel, düz bir zeminde jelin dökülmesi için hazırlanan kalıba dökülmüş ve jelin katılaşması için oda sıcaklığında 20 dk bekletilmiştir.
5. Jel katılaştıktan sonra kalıp içindeki taraklar ve kalıbın iki ucundaki aparatlar çıkartılmış ve elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Elektroforez tankı, jel yüzeyi örtülecek şekilde 1X TAE tamponu ile doldurulmuştur.
6. Örneklerden 5 µl alınarak 1.5 µl yükleme tamponu (Orange G, DNA loading dye) ile pipetaj yapılarak karıştırılmış ve son kuyucuk hariç her bir kuyucuğa örnekler yüklenmiştir.
7. Son kuyucuğa, moleküler ağırlık belirteci olarak 100-1500 baz çifti aralığına sahip "DNA ladder" yüklenmiştir. Ladder görüntüleme ölçek olarak kullanılmıştır.
8. Yürütme işlemi güç kaynağının (Owl Lightning Volt OSP-300, ABD) 100 Voltt 25-30 dk çalıştırılması ile yapılmıştır.
9. Yürütme işlemi bittikten sonra jel distile su ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırılmış ve ultraviyole ışık altında görüntülenmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

### **3.2.7. Kenelerde Tespit Edilen Falvivirus, Nairovirus ve Kene Fleboviruslerinin Tanımlanması**

Elektroforez PCR ürünü tespit edilen örneklerde tanımlama, amplikonların her iki amplifikasyon primeri ile çift yönlü DNA dizi analizi ile gerçekleştirilmiştir. DNA dizi analizi çalışmaları hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ham dizilerin birleştirilmesi, işlenmesi ve analizinde açık erişim yazılımlar olan Bioedit (versiyon 7.0.9.0) (86) ve MEGA X (87) programları kullanılmıştır. Nükleotid ve kodlanan protein taramaları, Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüleri Gen Bankası (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) veritabanı ve araçları kullanılarak yapılmıştır. Dizi benzerlik çalışmaları için Amerika Birleşik

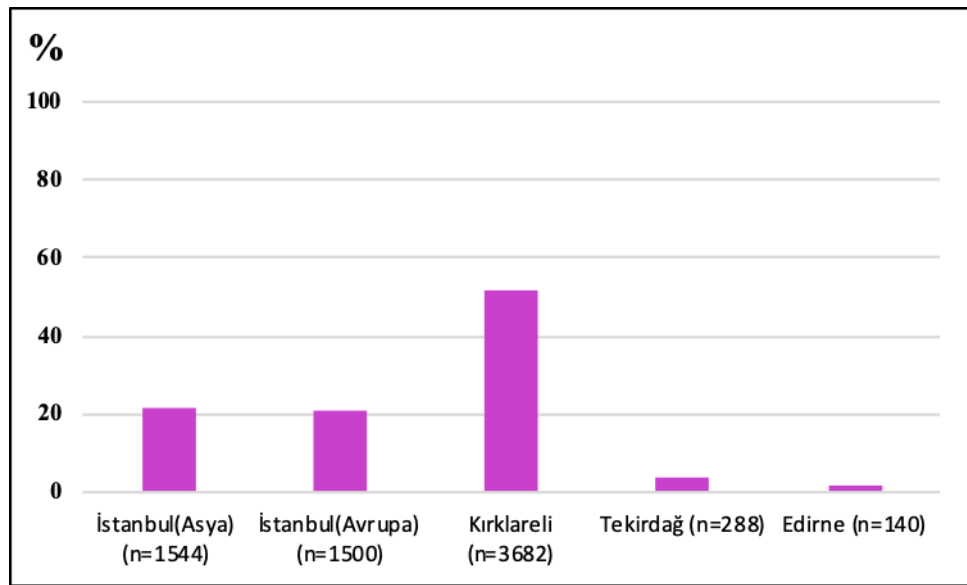


Devletleri Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon web sitesinden BLAST algoritmaları BLASTn, MEGABLAST, BLASTx ve BLASTp kullanılmıştır (88). Nükleotid ve protein hizalamaları ve dizi karşılaştırmaları, Bioedit paketinde bulunan CLUSTAL W yazılımı (89) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Filogenetik ve moleküler evrimsel analizler için en uygun modellerin belirlenmesi amacıyla, MEGA yazılımı kapsamında bulunan “Find best DNA/protein-substitution model” aracı kullanılmıştır. Buna göre filogenetik analizlerde “Maximum likelihood” yöntemi kullanılmıştır. nükleotid bazlı ağaçlar “general time reversible (GTR) model, gamma distributed with invariant sites (G+I)” modeli kullanılarak, 500 replikasyon için “bootstrap” analizi ile oluşturulmuştur.

## 4. BULGULAR

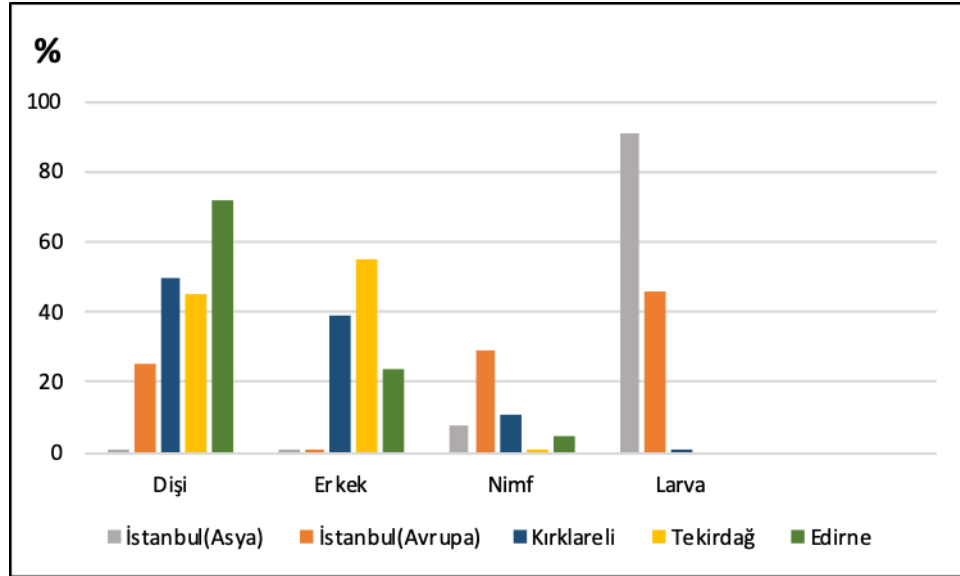
### 4.1. Toplanan Örnek Sayısı ve Dağılımı

Çalışmada toplam 7154 kene örneği incelenmiştir. 2018 yılı Temmuz, Ağustos ve Kasım aylarında İstanbul ilinde 17 farklı lokasyondan yapılan örneklemelelerde, 3044 kene toplanmıştır. Bu kenelerin cinsiyet ve biyolojik yaşam evresine göre dağılımları 397 dişi, 13 erkek, 549 nimf ve 2085 larva olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Kene örneklerinin illere göre dağılımı.

Kırklareli, Edirne ve Tekirdağ illerinde, konaklar üzerinden yapılan örneklemelemler sonucu 4110 kene toplanmıştır. Kırklareli ilinde 2013, 2014 ve 2015 yıllarında farklı aylarda 17 farklı lokasyondan 3682 kene toplanmış, bunların dağılımları; 1840 dişi, 1442 erkek, 391 nimf ve 9 larva olarak belirlenmiştir. Tekirdağ ilinde 2013 yılı Mayıs ayında tek lokasyondan toplanan kene sayısı 288 olup, 129 dişi, 158 erkek ve 1 nimf olarak kaydedilmiştir. Edirne ilinde 2014 yılı Temmuz ve Kasım aylarında 2 farklı lokasyondan yapılan örneklemede 140 kene toplanmış, 101'i dişi, 33'ü erkek ve 6'sı nimf olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.2.** Kene örneklerinin biyolojik evre ve illere göre dağılımı.

Yapılan morfolojik incelemelerde, en sık *Ixodes* sp. (2212/7154, %30,92) türü keneler saptanmıştır. Bunu takip eden türler sırasıyla *Hyalomma marginatum* (1022/7154, %14,29), *Hyalomma scupense* (962/7154, %13,45), *Haemaphysalis parva* (673/7154, %9,40) ve *Rhipicephalus turanicus* (584/7154, %8,17) olmuştur. Örneklerin tümüne ait tiplendirme verileri ve dağılımları Tablo 4.1’de verilmektedir. Elde edilen 7154 kene örneği, 572 havuz içinde toplanarak, hedef virüsler açısından incelenmiştir.

**Tablo 4.1.** Kene örneklerinin tür, toplama bölgesi ve biyolojik evreye göre dağılımı

Türler	İstanbul (Asya)				İstanbul (Avrupa)				Kırklareli				Tekirdağ				Edirne			
	♀	♂	Nimf	Larva	♀	♂	Nimf	Larva	♀	♂	Nimf	Larva	♀	♂	Nimf	Larva	♀	♂	Nimf	Larva
<i>Dermacentor marginatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	21	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dermacentor sp.</i>	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Haemaphysalis inermis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	231	42	0	0	0	0	0	0	49	5	0	0
<i>Haemaphysalis parva</i>	0	0	0	0	375	0	0	0	113	185	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Haemaphysalis punctata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	36	37	0	0	0	0	0	0	12	8	0	0
<i>Haemaphysalis sp.</i>	0	0	8	0	0	0	404	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hyalomma marginatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	347	356	292	0	3	20	1	0	2	1	0	0
<i>Hyalomma scupense</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	533	429	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ixodes ricinus</i>	17	10	0	0	5	3	0	0	155	32	0	0	0	0	0	0	32	18	0	0
<i>Ixodes sp.</i>	0	0	108	1390	0	0	29	684	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhipicephalus bursa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	198	240	0	0	0	0	0	0	5	1	0	0
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	206	113	0	0	126	138	0	0	1	0	0	0
<i>Rhipicephalus sp.</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	96	9	0	0	0	0	0	0	6	0
<b>Toplam</b>	<b>17</b>	<b>10</b>	<b>116</b>	<b>1401</b>	<b>380</b>	<b>3</b>	<b>433</b>	<b>684</b>	<b>1840</b>	<b>1442</b>	<b>391</b>	<b>9</b>	<b>129</b>	<b>158</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>101</b>	<b>33</b>	<b>6</b>	<b>0</b>
<b>Havuz Sayısı</b>	<b>185</b>								<b>357</b>				<b>15</b>				<b>15</b>			

## 4.2. Kene Örneklerinde Nairovirüs İncelemeleri

Kene örnekleri, 572 havuzda toplanmış ve tüm havuzlar nairovirüs varlığı açısından PCR ile taranmıştır. Jel elektroforezi sonucu, ~500 bç büyüklüğünde bant tespit edilen 4 havuz (4/572, %0,7) nairovirüs PCR pozitif olarak değerlendirilmiştir. PCR pozitiflikleri ikisi *H. marginatum* havuzlarında olup, diğerleri ise *Hae. scupense* ve *R. bursa* havuzlarında tespit edilmiştir (Tablo 4.2.).

**Tablo 4.2.** Nairovirüs pozitif olarak izlenen havuzların özellikleri.

Havuz Kodları	Konum	Tür	İçerik	Konak	GenBank Erişim Kodu
19	Kırklareli	<i>H. marginatum</i>	30♀	<i>Bos taurus</i>	MN811039
20	Kırklareli	<i>H. marginatum</i>	25♀	<i>Bos taurus</i>	MN811040
44	Kırklareli	<i>R. bursa</i>	8♀	<i>Bos taurus</i>	MN811041
45	Kırklareli	<i>Hae. scupense</i>	10♂	<i>Bos taurus</i>	MN811042

Pozitif PCR ürünlerinden, DNA dizi analizi sonucu 491-494 bç' lik diziler elde edilmiştir. Saptanan dizilerde nükleotit ve amino asit dizileri sırasıyla %79,1-99,8 ve %98,1-100 benzerlik göstermiştir. BLAST algoritmaları kullanılarak diziler, Gen Bank veri tabanı ile karşılaştırılmıştır ve Gen Bank girişleri Türkiye'den KKKAV izolatu (13), Yunanistan'dan KKKAV AP92 izolatu (90) ve Yunanistan Pentalofos'tan KKKAV izolatu (91) olarak bildirilmiş olan dizilerle aynı olduğunu göstermiştir.

Dizilere ait nükleotit ve amino asit hizalamaları Şekil 4.3 ve 4.4'te gösterilmiştir. Nükleotid ve amino asit benzerlik karşılaştırmaları ise Tablo 4.3. ve 4.4.te verilmiştir.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
19  TCAAATGATTTGCGAATAGGAATTTCAATGTCCTGCAAGAGATTGACTGGAAGGAGTACCGGAGAGAGGCTTCCAAGAAGTGTGAGAAGCAAGGTCATTTAT
20  -----T-----T-----T-----G-----A-----C-----A-----A-----C-----T-----G-----T-----A-----C
44  -----T-----T-----G-----A-----C-----A-----A-----C-----T-----G-----T-----A-----C
45  -----T-----T-----G-----A-----C-----A-----A-----C-----T-----G-----T-----A-----C

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
19  GAGATGGTAAAACTAGTAGGTGAGACAGGCATGGCAATCTTCAACAATTAGCTTTGACAGGCACATAAATTACGAACACCGTTCTATGCAGTTTGG
20  -----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A
44  ..A.....G...G...A..G.....C...C..G..G...G..C.....A..G..T.....T..C..T.....GC...
45  ..A.....A..G...A..G.....C...C..G..G...G..C.....A..G..T.....T..C..T.....GC...

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
19  CACCTAAGGCACAGCTAGGAGGAGCAAGAGATCTGTTAGTGCAAGAGACTGGGACTAAAGTCATGCATGCCAACACTGAGATGTTGAGTAAACCTCTT
20  -----G-----A-----A-----T-----T-----A-----A-----T-----T-----A-----A-----T-----C-----G-----T-----T
44  ..A..A.....T..G..T..T.....CT...G...G...T...A...T.....T..C...A...T..C..G...T..T...
45  ..A..A.....T..G..T..T.....CT...G...G...T...A...T.....T..C...A...T..C..G...T..T...

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
19  AAAAAACAATCAGATGATGGCCTTACTAACCCCATCTTAAGGAACAATCCCTTAATGTGGCTTGTAGACTGCTTACCAACATGCCGAATCTTGTATGGA
20  -----C-----A-----A-----G-----C-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A
44  G.....C..T.....T..C.....A...C..A...C..T..G.....GC...T..C.....A..A..C.....G
45  G.....C..T.....T..C.....A...C..A...C..T..G.....GC...T..C.....A..A..C.....G

      410     420     430     440     450     460     470     480     490
19  AAGCCCAATAAGTGAAGGTAGCAACCTGGTCAATTTCTACAAGTCATATGTATCTCGGGTGATAACACTAAATGGGGCCCCATCCACTGCT---
20  -----T-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A
44  ..A...T.....C...T..A..T.....T..T..C...C..A...C..G.....A..A...GTT
45  ..A...T.....C...T..A..T.....T..T..C...C..A...C..G.....A..A...GTT

```

Şekil 4.3. KKKAV nükleik asit dizi hizalama sonuçları.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
19+2 QMIANRNFNVCKRLTGRSTGERLPRSVRSKVIYEMVKLVGETGMALIQQLAFAQALNVEHREFYAVLAPKAQLGGARDLLVQETGKVMHATTEMFSRNL
20+1 -----
44+1 -----
45+1 -----

      110     120     130     140     150     160
19+2 KTTSDDGLTNPHLKETILNVGLDCLTNMRNLDGKPISEGSNLVNFYKVICISGDNTKWGPIHC-
20+1 .....P.C
44+1 .....C
45+1 .....C

```

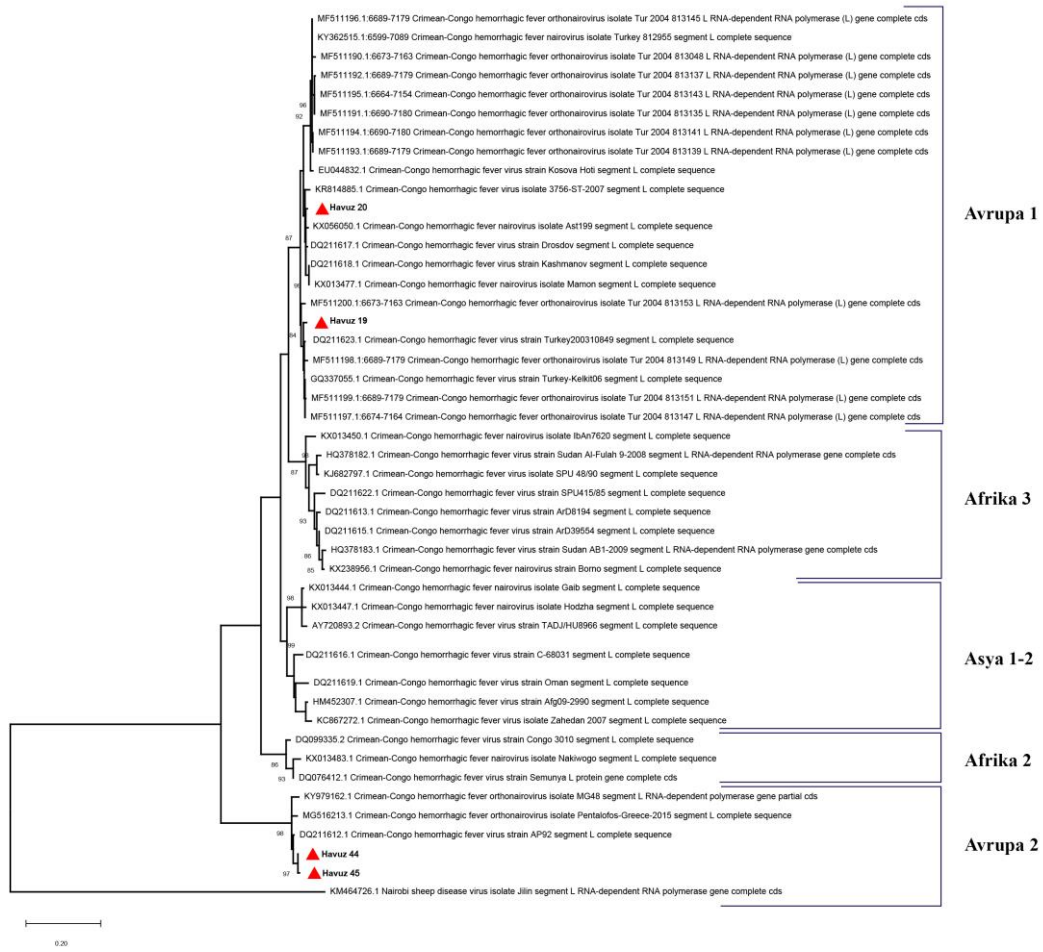
Şekil 4.4. KKKAV aminoasit dizilimi

**Tablo 4.3.** Çalışmada saptanan Nairovirüs dizilerinin nükleotit (475 bç) karşılaştırma matrisi. Benzerlikler yüzde olarak verilmektedir (MG48: KKKAV izolat MG48 (KY979162.1); AP92: KKKAV izolat AP92 (DQ211612.1); Pentalofos: KKKAV izolat Pentalofos-Yunanistan 2015 (MG516213.1)).

	Havuz 19	Havuz 20	Havuz 44	Havuz 45	MG48	AP92	Pentalofos
Havuz 19	ID	0,957	0,816	0,825	0,833	0,821	0,821
Havuz 20	0,957	ID	0,818	0,827	0,831	0,818	0,818
Havuz 44	0,816	0,818	ID	0,991	0,966	0,978	0,964
Havuz 45	0,825	0,827	0,991	ID	0,957	0,97	0,955
MG48	0,833	0,831	0,966	0,957	ID	0,97	0,964
AP92	0,821	0,818	0,978	0,97	0,97	ID	0,976
Pentalofos	0,821	0,818	0,964	0,955	0,964	0,976	ID

**Tablo 4.4.** Çalışma saptanan Nairovirüs dizilerinin amino asit (158 aa) karşılaştırma matrisi. Benzerlikler yüzde olarak verilmektedir (MG48: KKKAV izolat MG48 (KY979162.1); AP92: KKKAV izolat AP92 (DQ211612.1); Pentalofos: KKKAV izolat Pentalofos-Yunanistan 2015 (MG516213.1)).

	Havuz 19	Havuz 20	Havuz 44	Havuz 45	MG48	AP92	Pentalofos
Havuz 19	ID	0,993	1	1	0,993	0,993	0,987
Havuz 20	0,993	ID	0,993	0,993	0,987	0,987	0,981
Havuz 44	1	0,993	ID	1	0,993	0,993	0,987
Havuz 45	1	0,993	1	ID	0,993	0,993	0,987
MG48	0,993	0,987	0,993	0,993	ID	1	0,993
AP92	0,993	0,987	0,993	0,993	1	ID	0,993
Pentalofos	0,987	0,981	0,987	0,987	0,993	0,993	ID



**Şekil 4.5.** 19, 20, 44 ve 45 kodlu havuzlarda saptanan nairovirüs nükleotit dizilerinin analizi. Filogenetik ağaç “Maximum likelihood” yöntemi ve “general time reversible (GTR) model, gamma distributed with invariant sites (G+I)” modeli ile oluşturulmuştur. “Bootstrap” değerleri ağaçta gösterilmiş ve 500 replikasyon için hesaplanmıştır. Karşılaştırmada kullanılan virüsler GenBank erişim kodları ve izolat isimleri ile belirtilmiştir. (Kırmızı üçgen: Çalışmada elde edilen dizileri göstermektedir.).



### 4.3. Kene Örneklerinde Flebovirüs İncelemeleri

572 kene havuzu, kene flebovirüsleri açısından PCR ile taranmış, sonucunda elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez görüntülemelerinde ~530 bp büyüklüğünde bant saptanan, 19 havuz kene flebovirüs açısından PCR pozitif kabul edilmiştir. PCR pozitifliklerinin 11 *R. turanicus*, 4 *R. bursa*, 2 *H. scupense* ve 2 *Hae. punctata* havuzlarından olduğu saptanmıştır (Tablo 4.4.).

**Tablo 4.5.** Flebovirüs pozitif olarak izlenen havuzların özellikleri.

Örnek numaraları	Konum	Tür	İçerik	Konak	GenBank Erişim Kodu
21	Tekirdağ	<i>R. turanicus</i>	26♀	<i>Bos taurus</i>	MN069013
22	Tekirdağ	<i>R. turanicus</i>	23♂	<i>Bos taurus</i>	MN069014
23	Tekirdağ	<i>R. turanicus</i>	33♂	<i>Bos taurus</i>	MN069015
24	Tekirdağ	<i>R. turanicus</i>	20♀	<i>Bos taurus</i>	MN069016
25	Tekirdağ	<i>R. turanicus</i>	17♂	<i>Bos taurus</i>	MN069017
26	Tekirdağ	<i>R. turanicus</i>	15♀	<i>Bos taurus</i>	MN069018
27	Kırklareli	<i>R. turanicus</i>	4♀	<i>Bos taurus</i>	MN069019
29	Kırklareli	<i>R. turanicus</i>	31♀	<i>Bos taurus</i>	MN069020
30	Kırklareli	<i>R. turanicus</i>	11♀	<i>Bos taurus</i>	MN069020
31	Kırklareli	<i>R. turanicus</i>	2♂	<i>Bos taurus</i>	MN069021
32	Kırklareli	<i>R. turanicus</i>	6♂	<i>Ovis aries</i>	MN069021
37	Kırklareli	<i>H. scupense</i>	27♀	<i>Bos taurus</i>	MN069022
38	Kırklareli	<i>H. scupense</i>	38♂	<i>Bos taurus</i>	MN069022
40	Kırklareli	<i>R. bursa</i>	5♂	<i>Bos taurus</i>	MN069023
41	Kırklareli	<i>R. bursa</i>	4♀	<i>Bos taurus</i>	MN069024
42	Kırklareli	<i>R. bursa</i>	17♀	<i>Bos taurus</i>	MN069025
43	Kırklareli	<i>R. bursa</i>	20♀	<i>Bos taurus</i>	MN069026
47	Kırklareli	<i>Hae. punctata</i>	1♀	<i>Bos taurus</i>	MN069027
48	Kırklareli	<i>Hae. punctata</i>	5♂	<i>Bos taurus</i>	MN069027

Kırklareli ve Tekirdağ illerinden toplanan, kene flebovirüs PCR pozitifliği saptanmış olan 19 havuzdan DNA dizi analizi ile 508-539 bp'lik kene flebovirüs dizileri saptanmıştır. Saptanan dizilerde nükleotid ve amino asit dizileri sırasıyla %79,1-99,8 ve %94-100 benzerlik göstermiştir. BLAST algoritmaları kullanılarak diziler, Gen Bank veri tabanı ile karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda saptanan dizilerin, Gen Bank girişleri Türkiye'den olan Kene flebovirüs Anadolu 1 (14) ve kene flebovirüs izolatları (13, 14) ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Elde edilen dizilerin nükleotid ve amino asit hizalamaları Şekil 4.6. ve 4.7.'de, benzerlik karşılaştırmaları Tablo 4.6. ve Tablo 4.7.'de verilmiştir.

```

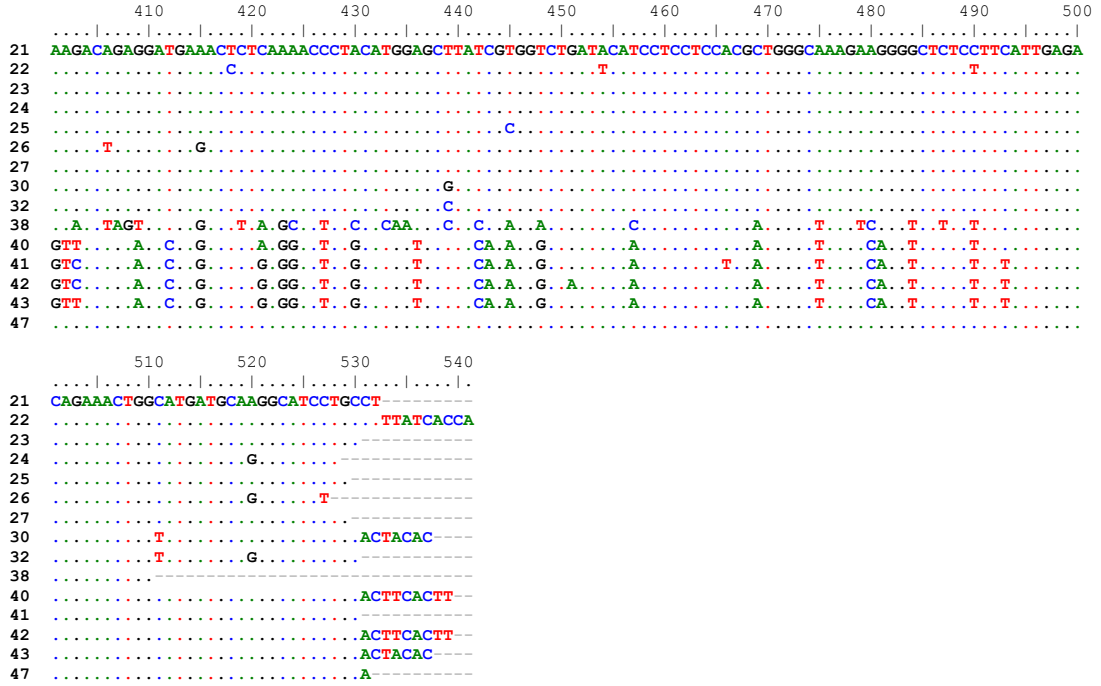
      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
21  TCAGCATGGGGGTTGAGGGAAATTTATGCTTGGGTCAGAAAGAGAGAAATTGTCCAAGCTGCCCTTGAGACCATCGCCAGCAAGTTTGTGTGGATTTC
22  .....
23  .....
24  .....G.....
25  .....
26  .....
27  .....
30  .....G.....
32  .....G.....
38  .....G.....T.G.....T..A.T..GTTG.GA..G...A...GA..G..CAGAA..
40  .....C.T.G.....G...A.G.A..TT.G..A.G..T..A.GA..G...CA..
41  .....TC.T.G.....G...A.G.A..TT.G..A.G..T..A.GA..G...CA..
42  .....TC.T.G.....G...A.G.A..TT.G..A.G..T..A.GA..G...CA.G..
43  .....C.T.G.....G...A.G.A..TT.G..A.G..T..A.GA..G...CA..
47  .....G.....

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
21  AAGTCAGAGACACTCACAAAACCCCAAATGAAGACAAAGATCCAGAAACTCATGGCAAGAGAGCAAGGGCCCTGTCAAGCCAAAGACCTGGTCAACACTA
22  .....
23  .....G..G.....
24  .....G.....
25  .....T..G.....
26  .....A.....
27  .....A.....G.....
30  .....A.....
32  .....A.....
38  .....A..A..T..A..T..T..TG.TCA..GA.....C..A.G..T.....T..A..T..TAA.T.ATC.GGG..
40  .....A..T..A.....T..T..G.....A..G..G..A..C..A.....A.....C.....A.....C.....TG..C
41  .....A..T..A.....T..T..G.....A..G..G.....A.....A.....C.....A.....C.....TG..C
42  .....A..TT..A.....T..T..G.....A.....G..G.....A.....A.....C.....A.....C.....TG..C
43  .....A..T..A.....T..T..G.....A..G..G..G.....A.....A.....C.....A.....C.....TG..C
47  .....G.....

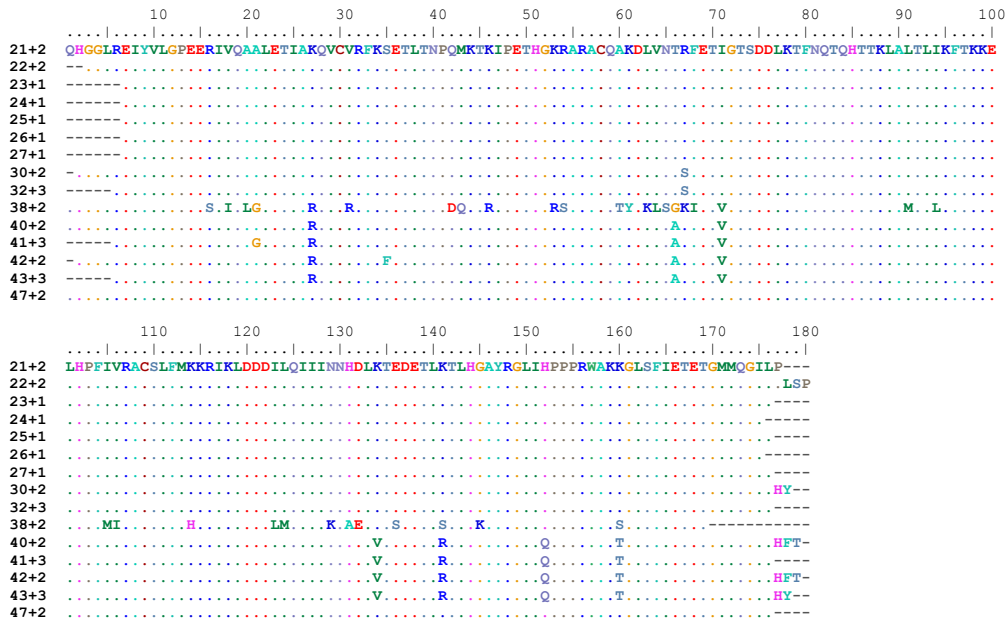
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
21  GATTTGAGACAAATGGAAACATCTGACGACCTCAAGACCTTTAAACAGACTCAACACACCACCAAGTTGGCACTCACACTGATAAAGTTCACAAAGAAGGA
22  .....
23  .....
24  .....
25  .....
26  .....C.....
27  .....C.....C.....
30  .....T.....
32  .....T.....
38  AGA.....G...C..T..A..T..TT.G.....C..T..A.....T...AC...GA.G..CT.AT.G.....T...A..
40  .....T.....TG...C..C..A..T..TT.G.....C.....G...G...AC.T.T..T..A..C..A.....
41  .....T.....TG...C..C..A..T..TT.A.....C.....G...G...AC.T.T..T..T..A..C..A.....
42  .....T.....TG...C..C..A..T..TT.A.....C.....G...G...AC.T.T..T..T..A..C..A.....
43  .....T.....TG...C..C..A..T..TT.A.....C.....G...G...AC.T.T..T..T..A..C..A.....
47  .....

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
21  GTTGCAATCCCTTCATGTTCAGAGCTTGAGCCCTTTCATGAAAAAGAGAAATCAAGCTTGATGATGACATCCTGCAGATCATATCAACAATCATGATCTC
22  .....
23  .....
24  .....C.....
26  .....
27  .....A.....
30  .....
32  .....
38  .....T.....GA..C..G..C.....T..T.....C..C..A.....C..GA.....A..A..G..CGCC..G..
40  .....C..C..C..G.....G.....T.....G.....G.....T..A..C.....T.....A..C.....C..T
41  .....C..C..C..G.....G.....T.....G.....G.....T..A..C.....T.....A..C.....C..T
42  .....C..C..C..G.....G.....T.....G.....G.....T..A..C.....T.....A..C.....C..T
43  AC.C..C..G.....G.....T.....G.....G.....T..A.....T.....A..C.....C..T
47  .....

```



Şekil 4.6. Flebovirüs nükleik asit dizi hizalama sonuçları.



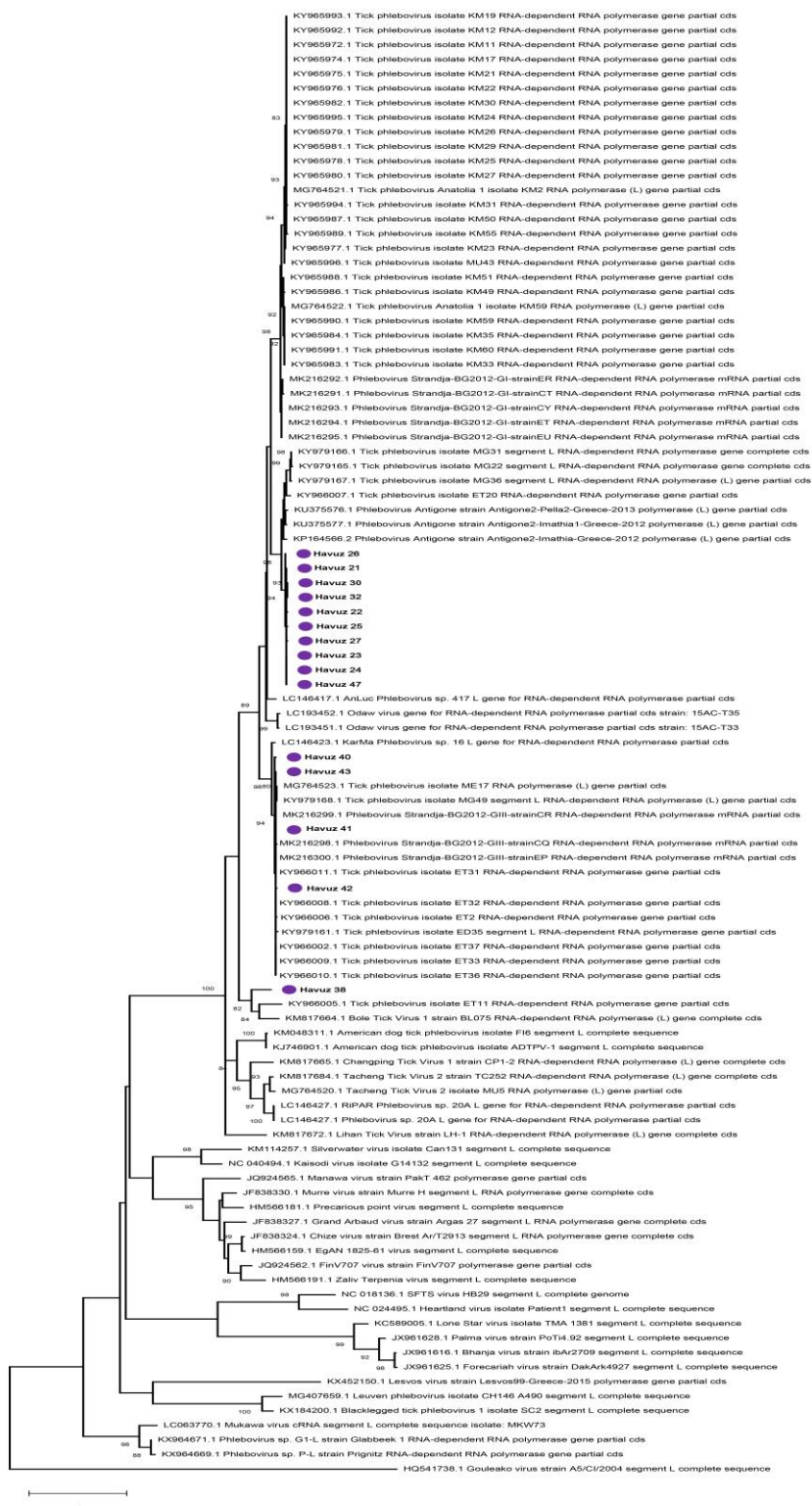
Şekil 4.7. Flebovirüs aminoasit dizilimi.

**Tablo 4.6.** Çalışmada elde edilen Flebovirüs dizilerinin nükleotit (508 bp) karşılaştırma matrisi. Benzerlikler yüzde olarak verilmektedir (KM2: Kene flebovirüs Anadolu 1 izolat KM2 (MG764521.1); KM59: Kene flebovirüs Anadolu 1 izolat KM59 (MG764522.1); MG22: Kene flebovirüs izolat MG22 (KY979165.1); MG31: Kene flebovirüs izolat MG31 (KY979166.1); MG36: Kene flebovirüs izolat MG36 (KY979167.1); MG49: Kene flebovirüs izolat MG49 (KY979168.1); ME17 Kene flebovirüs izolat ME17 (MG764523.1)).

	Havuz 21	Havuz 22	Havuz 23	Havuz 24	Havuz 25	Havuz 26	Havuz 27	Havuz 30	Havuz 32	Havuz 40	Havuz 41	Havuz 42	Havuz 43	Havuz 47	KM2	KM59	MG22	MG31	MG36	MG49	ME17
Havuz 21	ID	0,994	0,996	0,994	0,992	0,988	0,99	0,99	0,988	0,807	0,803	0,799	0,805	0,996	0,824	0,818	0,899	0,899	0,909	0,799	0,801
Havuz 22	0,994	ID	0,99	0,988	0,986	0,982	0,984	0,984	0,982	0,805	0,801	0,797	0,803	0,99	0,82	0,816	0,897	0,897	0,903	0,797	0,799
Havuz 23	0,996	0,99	ID	0,994	0,992	0,984	0,99	0,986	0,984	0,809	0,805	0,801	0,807	0,996	0,82	0,816	0,899	0,899	0,909	0,801	0,803
Havuz 24	0,994	0,988	0,994	ID	0,99	0,986	0,988	0,984	0,986	0,807	0,803	0,799	0,805	0,998	0,818	0,814	0,893	0,893	0,903	0,803	0,805
Havuz 25	0,992	0,986	0,992	0,99	ID	0,98	0,986	0,982	0,98	0,803	0,799	0,795	0,801	0,992	0,818	0,814	0,893	0,893	0,903	0,795	0,797
Havuz 26	0,988	0,982	0,984	0,986	0,98	ID	0,978	0,978	0,98	0,807	0,801	0,797	0,803	0,984	0,826	0,82	0,897	0,899	0,909	0,805	0,807
Havuz 27	0,99	0,984	0,99	0,988	0,986	0,978	ID	0,98	0,978	0,811	0,807	0,803	0,809	0,99	0,82	0,816	0,893	0,893	0,903	0,799	0,801
Havuz 30	0,99	0,984	0,986	0,984	0,982	0,978	0,98	ID	0,996	0,807	0,803	0,799	0,805	0,986	0,82	0,816	0,893	0,893	0,903	0,799	0,801
Havuz 32	0,988	0,982	0,984	0,986	0,98	0,98	0,978	0,996	ID	0,805	0,801	0,797	0,803	0,984	0,818	0,812	0,891	0,891	0,901	0,801	0,803
Havuz 40	0,807	0,805	0,809	0,807	0,803	0,807	0,811	0,807	0,805	ID	0,976	0,972	0,984	0,809	0,803	0,795	0,801	0,801	0,799	0,972	0,972
Havuz 41	0,803	0,801	0,805	0,803	0,799	0,801	0,807	0,803	0,801	0,976	ID	0,984	0,988	0,805	0,801	0,789	0,793	0,793	0,791	0,976	0,976
Havuz 42	0,799	0,797	0,801	0,799	0,795	0,797	0,803	0,799	0,797	0,972	0,984	ID	0,984	0,801	0,803	0,789	0,791	0,791	0,789	0,972	0,972
Havuz 43	0,805	0,803	0,807	0,805	0,801	0,803	0,809	0,805	0,803	0,984	0,988	0,984	ID	0,807	0,807	0,795	0,795	0,795	0,793	0,984	0,984
Havuz 47	0,996	0,99	0,996	0,998	0,992	0,984	0,99	0,986	0,984	0,809	0,805	0,801	0,807	ID	0,82	0,816	0,895	0,895	0,905	0,801	0,803
KM2	0,824	0,82	0,82	0,818	0,818	0,826	0,82	0,82	0,818	0,803	0,801	0,803	0,807	0,82	ID	0,935	0,811	0,811	0,814	0,809	0,807
KM59	0,818	0,816	0,816	0,814	0,814	0,82	0,816	0,816	0,812	0,795	0,789	0,789	0,795	0,816	0,935	ID	0,814	0,814	0,814	0,797	0,795
MG22	0,899	0,897	0,899	0,893	0,893	0,897	0,893	0,893	0,891	0,801	0,793	0,791	0,795	0,895	0,811	0,814	ID	0,994	0,974	0,797	0,799
MG31	0,899	0,897	0,899	0,893	0,893	0,899	0,893	0,893	0,891	0,801	0,793	0,791	0,795	0,895	0,811	0,814	0,994	ID	0,976	0,797	0,799
MG36	0,909	0,903	0,909	0,903	0,903	0,909	0,903	0,903	0,901	0,799	0,791	0,789	0,793	0,905	0,814	0,814	0,974	0,976	ID	0,795	0,797
MG49	0,799	0,797	0,801	0,803	0,795	0,805	0,799	0,799	0,801	0,972	0,976	0,972	0,984	0,801	0,809	0,797	0,797	0,797	0,795	ID	0,996
ME17	0,801	0,799	0,803	0,805	0,797	0,807	0,801	0,801	0,803	0,972	0,976	0,972	0,984	0,803	0,807	0,795	0,799	0,799	0,797	0,996	ID

**Tablo 4.7.** Çalışma elde edilen Flebovirüs dizilerinin amino asit (169 aa) karşılaştırma matrisi. Benzerlikler yüzde olarak verilmektedir (KM2: Kene flebovirüs Anadolu 1 izolat KM2 (MG764521.1); KM59: Kene flebovirüs Anadolu 1 izolat KM59 (MG764522.1); MG22: Kene flebovirüs izolat MG22 (KY979165.1); MG31: Kene flebovirüs izolat MG31 (KY979166.1); MG36: Kene flebovirüs izolat MG36 (KY979167.1); MG49: Kene flebovirüs izolat MG49 (KY979168.1); ME17 Kene flebovirüs izolat ME17 (MG764523.1)).

	Havuz 21	Havuz 22	Havuz 23	Havuz 24	Havuz 25	Havuz 26	Havuz 27	Havuz 30	Havuz 32	Havuz 40	Havuz 41	Havuz 42	Havuz 43	Havuz 47	KM2	KM59	MG22	MG31	MG36	MG49	ME17
Havuz 21	ID	1	1	1	1	1	1	0,994	0,994	0,958	0,952	0,952	0,958	1	0,97	0,964	1	1	0,994	0,958	0,952
Havuz 22	1	ID	1	1	1	1	1	0,994	0,994	0,958	0,952	0,952	0,958	1	0,97	0,964	1	1	0,994	0,958	0,952
Havuz 23	1	1	ID	1	1	1	1	0,994	0,994	0,958	0,952	0,952	0,958	1	0,97	0,964	1	1	0,994	0,958	0,952
Havuz 24	1	1	1	ID	1	1	1	0,994	0,994	0,958	0,952	0,952	0,958	1	0,97	0,964	1	1	0,994	0,958	0,952
Havuz 25	1	1	1	1	ID	1	1	0,994	0,994	0,958	0,952	0,952	0,958	1	0,97	0,964	1	1	0,994	0,958	0,952
Havuz 26	1	1	1	1	1	ID	1	0,994	0,994	0,958	0,952	0,952	0,958	1	0,97	0,964	1	1	0,994	0,958	0,952
Havuz 27	1	1	1	1	1	1	ID	0,994	0,994	0,958	0,952	0,952	0,958	1	0,97	0,964	1	1	0,994	0,958	0,952
Havuz 30	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	ID	1	0,952	0,946	0,946	0,952	0,994	0,97	0,964	0,994	0,994	0,988	0,952	0,946
Havuz 32	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	1	ID	0,952	0,946	0,946	0,952	0,994	0,97	0,964	0,994	0,994	0,988	0,952	0,946
Havuz 40	0,958	0,958	0,958	0,958	0,958	0,958	0,958	0,952	0,952	ID	0,994	0,994	1	0,958	0,946	0,94	0,958	0,958	0,958	1	0,994
Havuz 41	0,952	0,952	0,952	0,952	0,952	0,952	0,952	0,946	0,946	0,994	ID	0,988	0,994	0,952	0,94	0,934	0,952	0,952	0,952	0,994	0,988
Havuz 42	0,952	0,952	0,952	0,952	0,952	0,952	0,952	0,946	0,946	0,994	0,988	ID	0,994	0,952	0,94	0,934	0,952	0,952	0,952	0,994	0,988
Havuz 43	0,958	0,958	0,958	0,958	0,958	0,958	0,958	0,952	0,952	1	0,994	0,994	ID	0,958	0,946	0,94	0,958	0,958	0,958	1	0,994
Havuz 47	1	1	1	1	1	1	1	0,994	0,994	0,958	0,952	0,952	0,958	ID	0,97	0,964	1	1	0,994	0,958	0,952
KM2	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,946	0,94	0,94	0,946	0,97	ID	0,994	0,97	0,97	0,97	0,946	0,94
KM59	0,964	0,964	0,964	0,964	0,964	0,964	0,964	0,964	0,964	0,94	0,934	0,934	0,94	0,964	0,994	ID	0,964	0,964	0,964	0,94	0,934
MG22	1	1	1	1	1	1	1	0,994	0,994	0,958	0,952	0,952	0,958	1	0,97	0,964	ID	1	0,994	0,958	0,952
MG31	1	1	1	1	1	1	1	0,994	0,994	0,958	0,952	0,952	0,958	1	0,97	0,964	1	ID	0,994	0,958	0,952
MG36	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,988	0,988	0,958	0,952	0,952	0,958	0,994	0,97	0,964	0,994	0,994	ID	0,958	0,952
MG49	0,958	0,958	0,958	0,958	0,958	0,958	0,958	0,952	0,952	1	0,994	0,994	1	0,958	0,946	0,94	0,958	0,958	0,958	ID	0,994
ME17	0,952	0,952	0,952	0,952	0,952	0,952	0,952	0,946	0,946	0,994	0,988	0,988	0,994	0,952	0,94	0,934	0,952	0,952	0,952	0,994	ID



**Şekil 4.8.** 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 32, 38, 40, 41, 42, 43 ve 47 kodlu havuzlarda saptanan flebovirüs nükleotit dizilerinin analizi. Filogenetik ağaç “Maximum likelihood” yöntemi ve “general time reversible (GTR) model, gamma distributed with invariant sites (G+I)” modeli ile oluşturulmuştur. “Bootstrap” değerleri ağaçta gösterilmiş ve 500 replikasyon için hesaplanmıştır. Karşılaştırmada kullanılan virüsler GenBank ulaşım kodları ve izolat isimleri ile belirtilmiştir. (Mor daire: Çalışmada elde edilen flebovirüs dizilerini göstermektedir.).

### **4.3. Kene Örneklerinde Flavivirüs İncelemeleri**

Çalışmamıza dahil edilen kene örneklerinin toplandığı 572 havuz, kene kaynaklı flavivirüslerin tespit edilmesi amacıyla iki farklı flavivirüs PCR ile taranmıştır. Ancak yapılan PCR’lar sonucu hiçbir havuzda pozitif bant (~960 bp uzunluğunda) gözlenmemiştir. Bu doğrultuda tüm havuzlar için kene kaynaklı flavivirüs sonuçları negatif olarak değerlendirilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Keneler, tüm dünyada geniş bir dağılım göstermekte ve birçok enfeksiyon hastalığının insan ve diğer duyarlı türlere aktarımında vektör rolü oynamaktadır (23). Arbovirüslerden kene kaynaklı virüslerin birçoğu *Nairoviridae*, *Fleboviridae* ve *Flaviviridae* aileleri içerisinde yer almaktadır (8, 10, 11). Tüm dünyada, insan ve hayvan sağlığı açısından önemli etkenler arasında bulunan virüslerin bazıları KKKAV, NKHV, SFTSV, HRTV, TBE ve “Louping ill” virüsleridir (11). Kene kaynaklı enfeksiyonların endemik olarak buldukları bölgelerin, küresel ısınma gibi iklimsel etkenler, ticaret ağlarının genişlemesi, seyahat imkanlarının artması gibi faktörlerle genişlediği ve genişlemeye devam ettiği bildirilmektedir (92, 93). Bu faktörlere bağlı olarak artan kene aktivitesi sonucu kene kaynaklı enfeksiyonların insidansında da artış gözlenmektedir (92). Kene kaynaklı viral enfeksiyonların hemen hiçbirinin özgül antiviral tedavisi olmaması nedeniyle, bu virüslerin coğrafi dağılım alanlarının belirlenmesi ve enfeksiyonların oluşabileceği bölgelerin öngörülebilmesi, vektör kontrolü ve/veya farklı korunma tedbirlerinin zamanında alınabilmesi için önem taşımaktadır (32). Çalışmamızda, kene kaynaklı virüsler açısından kısıtlı veri bulunan Trakya bölgesinden toplanan kene örneklerinde, PCR yöntemi ile nairovirüs, flebovirüs ve flavivirüs varlığı araştırılmış, tespit edilen virüsler DNA dizi analizi ile tanımlanarak elde edilen bulgular tartışılmıştır.

Türkiye’de, uygun ekolojik nişlerin ve geniş bir kene faunasının bulunması birçok kene kaynaklı virüsün varlığına işaret etmektedir (12, 25, 94). Ülkemiz için endemik olan KKKAV ile ilgili çalışmalar olmasında karşın diğer kene kaynaklı virüslere ilişkin çalışmalar oldukça kısıtlıdır.

Nairovirüsler içerisinde yer alan KKKAV Asya, Afrika ve Güney Afrika’nın birçok ülkesinde geniş bir coğrafik alanda yayılım göstermektedir. KKKAV’nün insanlara bulaşı genellikle kene ısırması ile olmakla birlikte viremik hayvan veya hastalara ait kan veya enfekte doku ile doğrudan temas ile olabilmektedir. İnsan sağlığı için ciddi bir tehdit olan KKKA için farklı ülkelere bildirilen vakalarda mortalite oranları %5’ten %80’lere kadar çıkmaktadır (95, 96). Türkiye’de özellikle İç Anadolu ve Karadeniz bölgelerinden 2002’den bu yana 10.000’den fazla



doğrulanmış KKKAV olgusu rapor edilmiş ve diğer ülkelere kıyasla görece düşük mortalite oranı (%4,6) bildirilmiştir (96).

KKKAV, birçok ülkeden otuzdan fazla kene türünde tespit edilmesine karşın ana vektörünün *Hyalomma* cinsi içerisindeki *H. marginatum* türü keneler olduğu kabul edilmektedir (29, 30). Ülkemizde kenelerde KKKAV'nün tarandığı ilgili çalışmalarda, Tokat ilinin kırsal bölgesinde yapılan örneklemeler sonucunda *H. marginatum* ve *H. detritum* türlerinin bulunduğu havuzlarda KKKAV tespit edilmiştir (7, 97). Aynı yıl, Orta Anadolu ve Karadeniz bölgeleri arasında bir geçiş bölgesi olan Kelkit vadisinde 9 farklı lokasyonda geviş getiren omurgalılar üzerinden toplanan kene havuzlarının taranması ile *H. marginatum* ve *R. bursa* kenelerinde KKKAV saptanmıştır (98). Bu çalışmalar ışığında, ülkemizde de KKKAV epidemileri ile ilişkili kene türünün *H. marginatum* olduğu belirlenmiş ancak farklı bölgelerde farklı kene türlerinin de vektör potansiyeline sahip olabileceğine dair bildirimler yapılmıştır (7, 98, 99). Çalışmamızda Trakya bölgesinde Kırklareli ilinde sığırlar üzerinden toplanan *H. marginatum*, *Hae. scupense* ve *R. bursa* kene türlerinde erişkin dişi ve erkeklerde KKKAV ve KKKAV-AP92 virüsleri tespit edilmiştir (Tablo 4.2.). Çalışmamızda kenelerin nimf ve larva biyolojik dönemlerinde herhangi bir virüs pozitifliğinin saptanamamış olmasının enfekte türlerin nimf/larva sayısının az olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Trakya bölgesinde daha önceki çalışmalarda *H. marginatum* ve *R. bursa* kenelerinde KKKAV pozitifliği bildirilmiştir (100). Kene örneklemelerinin yapıldığı Trakya bölgesine komşu olan Bulgaristan'da KKKAV ilk kez 1952 yılında bildirilmiş olup, bugüne kadar 1500'ün üzerinde vaka rapor edilmiş, KKKAV'nün vektörlerinin ise *H. marginatum* ve *R. sanguineus sensu lato* türü keneler olduğu bildirilmiştir (96). Bölgeye komşu olan diğer bir ülke Yunanistan'da ise 2008 yılında KKKAV ilişkin tek bir olgu bildirim yapılmıştır. Yunanistan'da KKKAV vektörünün *R. sanguineus* ve *R. bursa* kenelerinin olabileceği ileri sürülmesine karşın farklı çalışmaların yapılması gerekliliği vurgulanmıştır (95).

KKKAV bilinen tüm suşlarından ayrılan AP92 suşu ilk kez 1975 yılında Yunanistan'da enfekte keçilerden toplanan *R. bursa* kene türünden izole edilmiştir (101). AP92 ve ilişkili virüslerin Balkan Yarımadası ve İran gibi KKKAV açısından

endemik olan bölgelerde dolaşımında olduğu bildirilmiştir (101-106). Türkiye’de KKKAV-AP92 şusu Trakya bölgesinde kenelerde ilk kez, Edirne ve Kırklareli illerinden toplanan *R. bursa* ve *H. marginatum* türlerinde saptanmıştır (100). Bu bölgeden ayrıca KKKAV-AP92 virüsüne ilişkin ilk insan vaka bildirimini de yapılmıştır (107). Bunlara ek olarak Karadeniz bölgesinde Bayburt’tan toplanan *H. marginatum* kenelerinde saptanan KKKAV-AP92 virüsünün neredeyse tam genom dizilemesi yapılmıştır (13). Çalışmamızda Kırklareli ilinden toplanan *R. bursa* ve *Hae. scupense* kene havuzlarında KKKAV-AP92 virüsüne ilişkin diziler tespit edilmiştir. Dünya’da yapılan çalışmalarda AP92 ile ilişkili diziler Bulgaristan’da *R. sanguineus* complex, Yunanistan ve Kosova’da *R. bursa* (102, 105), Cezayir’de *H. aegyptium* (104) kenelerinde saptanmıştır. KKKAV-AP92 suşunun, etkilenen bireylerde daha hafif seyreden enfeksiyonlara neden olduğu ileri sürülmüş olmasına karşın İran’da ölümle sonuçlanan bir hemorajik ateş vakasının bildirilmesi ciddi enfeksiyonların da ortaya çıkabileceğini göstermektedir (106).

KKKAV’nün genetik çeşitlilik gösterdiği, nükleik asit dizi analizi yöntemlerinin gelişmesi sonucu ortaya konmuştur. Virüsün tiplendirilmesinde S segmentindeki varyasyonlar esas alınmasına karşın son zamanlarda M segmenti temel alarak nükleik asit dizi analizleri gerçekleştirilmektedir (31). Filogenetik analizlerle genetik çeşitliği belirlenen KKKAV coğrafik kökeni ile ilişkili olarak 7 genetik klada (Avrupa I-II, Asya I-II ve Afrika I-II-III) ayrılmıştır. Avrupa I kladı, KKKAV’nün Arnavutluk, Bulgaristan, Yunanistan, Kosova, Rusya ve Türkiye izolatlarını, Avrupa II kladı ise Yunanistan izolatu olarak da anılan AP92 ve AP92 benzeri suşları içermektedir. Asya I kladında Orta Doğu izolatları, Asya II kladında Çin, Özbekistan, Kazakistan ve Tacikistan izolatları bulunmaktadır. Afrika I kladı Senegal izolatu; Afrika II kladı Kongo ve Uganda izolatlarını; Afrika III kladı Nijerya, Güney Afrika ve Moritanya izolatlarını içermektedir (108, 109). Türkiye’de KKKA salgınlarının ortaya çıkmasıyla yapılan ilk çalışmalarda KKKAV’nün izolasyonu gerçekleştirilmiş ve filogenetik analizler sonucu, Kosova ve Rusya KKKAV izolatlarıyla birlikte kümelendikleri saptanmıştır (110). Takip eden yıllarda gerçekleştirilen, farklı bölgelerde, hasta örnekleri ve araziden toplanan kene örneklerinde yapılan taramalarda KKKAV saptanmış, elde edilen dizilerin filogenetik analizleri sonucunda Rusya, Kosova, Bulgaristan izolatlarıyla birlikte Avrupa I

kladında da kümelenmeleri bildirilmiştir (13, 98, 99, 111-114). Trakya bölgesinde KKKK olguları ilk kez, 2007 yılında İstanbul'da kene ısırması ile hastaneye başvuran Çorum, Giresun, Gümüşhane, Kastamonu, Kırklareli, Rize, Tokat ve Yozgat illerinden gelen hastalarda saptanmıştır (115). Bu çalışmada elde edilen izolatların Avrupa I kladında yer aldıkları belirlenmiştir. Bir başka çalışmada, Trakya bölgesinde *H. marginatum* ve *R. bursa* kenelerinde saptanan KKKAV dizilerinin de Avrupa I kladında buldukları bildirilmiştir (100). Bölgede yapılan bir başka çalışmada ilk kez, 2 hastada AP92 benzeri bir virüse rastlanmış ve Avrupa II kladında yer aldığı belirtilmiştir (107). Çalışmamızda kene havuzlarında PCR pozitiflikleri ile saptanan virüslerin filogenetik analizleri yapılmış, bu doğrultuda, *H. marginatum* havuzlarından elde edilen KKKAV ait dizilerin Avrupa I kladında; *R. bursa* ve *Hae. scupense* havuzlarından saptanan KKKAV-AP92 suşlarının Yunanistan izolatlarıyla birlikte Avrupa II kladında kümelenmeleri belirlenmiştir. Trakya bölgesinin özellikle Bulgaristan ve Yunanistan ile olan coğrafik yakınlığı, bölgeden Avrupa I ve II izolatlarının birlikte saptanmasına olanak sağladığı düşünülmektedir (100).

Flebovirüs cinsi içerisinde sınıflandırılan virüsler, insan ve hayvan sağlığı açısından önem taşıyan birçok etkeni içermektedir. Patojenik flebovirüslerin vektörleri arasında yer alan keneler, omurgalılara aktarımında önemli bir role sahiptir. Flebovirüslerin keneler ile aktarımı nairovirüslerde olduğu gibi kene ısırması ve enfekte insan veya hayvan kan ve dokuları ile temas sonucunda gerçekleşmektedir (32). Kene kaynaklı flebovirüsler, Çin'de SFTSV ve Amerika Birleşik Devletleri'nde HRTV ortaya çıkana kadar, insanlarda enfeksiyon etkeni olarak büyük ölçüde göz ardı edilmiştir (51). Her geçen yıl kene kaynaklı flebovirüslerin dolaşımı ile insanlarda şiddetli enfeksiyon bulguları bildirilmesine karşın SFTSV ve HRTV insanlar için patojenik olduğu saptanan kene kaynaklı flebovirüslerin tek temsilcileri olarak kalmıştır (15). *Bunyavirales* takımında yapılan taksonomik düzenlemeler ile kene kaynaklı flebovirüsler içerisinde yeni 6 virüs türü tanımlanmıştır; Heartland banyangvirüs, Huangpi kabutovirüs, Kabuto dağı kabutovirüsü, Frijoles flebovirüsü, Mukawa flebovirüsü ve Uukuniemi flebovirüsü. Buna karşın, azımsanmayacak miktarda kene kaynaklı flebovirüs hala sınıflandırılmamıştır (8). SFTSV ve HRTV dışındaki (51, 54, 116) kene kaynaklı flebovirüslerin epidemiyolojisi, dağılımı ve insanlarda patojenitelerine dair bilgiler

oldukça kısıtlıdır (15). İnsan veya hayvan maruziyetlerinde ve semptomatik enfeksiyonlarda belirli kene kaynaklı flebovirüs izolatları saptanmış olmasına karşın şimdiye kadar herhangi bir bölgeden salgın rapor edilmemiştir (44, 117).

Artan sürveyans çalışmaları ve gelişen dizi analizi teknikleri kenelerde yeni virüslerin saptanmasını hızlandırmıştır (14, 46, 118). Bunların sonucunda son birkaç yılda tanımlanan yeni izolatlar ile kene kaynaklı flebovirüslerin sayısı artmıştır (119-123). Türkiye’de son birkaç yıla kadar kene kaynaklı flebovirüsler ile ilgili bildirim bulunmamasına karşın yapılan DNA dizi analizi çalışmaları ile Anadolu’da yeni bir kene flebovirüs kümesi tanımlanmıştır (13-15).

Ülkemiz ’de Akdeniz, Ege, Doğu, Güneydoğu ve İç Anadolu bölgelerindeki 6 ilden toplanan kenelerde, 48 havuzda kene flebovirüs PCR pozitifliği saptanmıştır. Flebovirüs pozitif havuzlar, *R. sanguineus* complex, *R. bursa*, *H. marginatum*, *H. aegyptium*, *H. excavatum* ve *Hae. parva* kene türlerinden oluşmaktadır (13). Akdeniz, Ege ve İç Anadolu bölgesinde yapılan başka bir çalışmada 10 kene havuzunda kene flebovirüs PCR pozitifliği belirlenmiştir. Flebovirüs pozitifliği, *R. sanguineus* sensu lato, *R. bursa* ve *H. marginatum* kene türlerini içeren havuzlarda tespit edilmiştir (14). Yine Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yapılan örnekleme çalışmaları ile toplanan kenelerde, *R. sanguineus* sensu lato ve *R. bursa* türlerinin bulunduğu havuzlarda flebovirüs PCR pozitifliği tanımlanmıştır. Çalışmamızda Trakya bölgesinden toplanan kenelerde 19 havuzda kene flebovirüs PCR pozitifliği saptanmıştır (Tablo 4.5.). Kene flebovirüs pozitifliği saptanan havuzlar Kırklareli ilinden *R. bursa*, *R. turanicus*, *Hae. punctata* ve *H. scupense*, Tekirdağ ilinden *R. turanicus* türlerini içermektedir. Örneklemeimizde çok sayıda nimf ve larva bulunmasına karşın (Tablo 4.1.) yalnızca erişkin dişi ve erkek kenelerde kene flebovirüs nükleik asitleri tespit edilmiştir. Daha önce Akdeniz, Ege, Doğu, Güneydoğu ve İç Anadolu bölgelerinde yapılan çalışmada ise erişkin ve nimflerin birlikte bulunduğu havuzlarda kene flebovirüsü saptanmıştır (13). Bulgaristan’da yapılan bir çalışmada, *Rhipicephalus* sp., *R. sanguineus* sensu lato, *R. bursa*, *H. marginatum*, *H. aegyptium*, *Hae. punctata*, *D. marginatus* ve *I. ricinus* türlerinde larva, nimf, erişkin dişi ve erkek kenelerde kene flebovirüsü saptanmıştır (123). Portekiz ve İspanya’da yapılan başka bir çalışmada ise *R. sanguineus* sensu

lato, *R. bursa*, *H. marginatum* ve *H. lusitanicum* türlerinde yumurta, nimf, erişkin dişi ve erkek kene örneklerinde kene flebovirüsü tespit edilmiştir (124). Bu çalışmalarda yumurta, larva, nimf ve erişkin formlarında viral dizilerin elde edilmesi virüsün vertikal olarak aktarıldığını öne sürmektedir. Daha önceki raporların aksine çalışmamızda, viral dizilerin nimf ve larvalarda saptanamamış olması ise virüslerin saptandığı enfekte kene türlerin nimf ve larvalarının az olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Avrupa’da *Dermacentor* ve *Ixodes* kenelerinde kene flebovirüs bildirimleri olmasına (119, 122, 125) karşın çalışmamızda ve ülkemizden bildirilen diğer çalışmalarda bu türlerde yapılan taramalarda virüs saptanamamıştır. Benzer şekilde İber Yarımadası’nda yapılan taramalarda *Dermacentor* ve *Ixodes* kenelerinde kene flebovirüsüne ait pozitiflik tespit edilememiştir (124). Bu durum virüse karşı kene türleri arasındaki duyarlılık farklılığını işaret etmektedir.

Türkiye’de kene kaynaklı flebovirüs taramasının yapıldığı Dinçer ve ark. çalışmasında farklı kene flebovirüs suşları saptanmış ve filogenetik analizlerle farklı kladlar içerisinde yer aldıkları bildirilmiştir (13). Çalışmada elde edilen dizilerin, dördü Yunanistan’dan bildirilmiş olan Antigone virüsünün yer aldığı Antigone kladında (120), ikisi Yunanistan Levos adasında tespit edilen Levos virüsünün bulunduğu Levos kladında (121), sekizi Portekiz’de tanımlanmış olan virüsün bulunduğu KarMa kladında (122), yedisi ise Çin’de saptanmış olan Bole kene virüsünü içeren Bole kene kladında (119) kümelenmiştir. Bunların yanı sıra elde edilen diğer diziler, AnLuc kladı ile ortak atayı paylaşan yeni bir klad oluşturmuştur. Antigone ve Lesvos kladlarında Yunanistan’dan bildirilen virüsler sırasıyla *R. sanguineus* complex ve *Hae. parva* kenelerinde saptanmış olmasına karşın çalışmada sırasıyla *R. bursa* ve *R. sanguineus* complex kenelerinde tespit edilmiştir. KarMa kladında yer alan virüsler ilk olarak *R. sanguineus* complex ve *H. marginatum* kenelerinde saptanmış, çalışmada ise bu kladda kümelenen virüsler *R. bursa* ve *H. marginatum* türlerinde tanımlanmıştır. Bole kene kladında yer alan Bole kene virüsü ilk kez *H. marginatum* kenelerinde bildirilirken, Dinçer ve ark. bu kladda yer alan virüsleri *Hyalomma* spp. türünde saptamıştır. Çalışmada yeni bir klad oluşturan diziler içerisinde, *R. sanguineus* sensu lato kenelerinden yeni bir virus olan “Anadolu Kene Flebovirüsü” tanımlanmış ve virüse ait S ve L segmentleri saptanmıştır (13). 2018 yılında yayınlanan başka bir çalışmada içerisinde Mersin’de köpeklerden

toplanan *R. sanguineus* sensu lato kenelerinde tespit edilen “Anadolu Kene Flebovirüsü”nün de bulunduğu Anadolu’da daha önce saptanan kene flebovirüs kümesi ile benzerlik gösteren kısmi diziler bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada Muğla’da sığırlardan toplanan *H. marginatum* kenelerinden, daha önce bildiriimi ilk kez Çin’de *D. marginatus* kenelerinden (119) yapılmış olan “Tacheng tick virus 2” ile benzerlik gösteren diziler tanımlanmıştır ve virüsün Anadolu dahil olmak üzere daha geniş alanda dolaştığı ön görülmüştür (14). *R. sanguineus* sensu lato kenelerinden izole edilen kene flebovirüs ve “Anadolu Kene Flebovirüsü” virüslerinin L segment dizileri Dinçer ve ark. Anadolu’da yeni bir kene flebovirüsünün dolaştığı bildirimini desteklemiştir. Çalışmamızda Trakya bölgesinden toplanan kene havuzlarının 19’unda flebovirüs nükleik asitleri tespit edilmiştir. Örnekleme, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinden toplanan kene örnekleri de dahil edilerek yapılan taramalar sonucu toplamda 609 havuzun 26’sında kene flebovirüs nükleik asitleri saptanmıştır. Pozitif havuzlar Kırklareli, Edirne, Mersin ve Şanlıurfa illerinden toplanan *R. bursa*, *R. sanguineus* sensu lato, *R. turanicus*, *H. scupense* ve *Hae. punctata* kene örneklerinden oluşmaktadır. Dizi analizi ile elde edilen L segmentine ait kısmi dizilerin çeşitlilik gösterdiği tespit edilmiş, bu dizilerin, daha önce Anadolu’dan bildirilen kene flebovirüsünün neredeyse tamamı dizilenmiş L segmenti ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Filogenetik analizler ile dizilerin coğrafik orjininden bağımsız olarak kene türlerine göre kümenlenme gösterdikleri tespit edilmiştir. Filogenetik analizler ile bu L segment dizilerinin Yunanistan (120) ve Bulgaristan’dan (123) bildirilen kene flebovirüslerinin de içinde bulunduğu 3 farklı klad veya genotipi temsil ettiği belirlenmiştir. Çalışmamızda saptanan dizilerin ve Avrupa’nın farklı bölgelerinden bildirilen dizilerin yer aldığı tanımladığımız kene flebovirüs grubunun SFTSV, Bhanja virüsü, Uukuniemi virüsü ve Kaisodi virüs gruplarından ayrıldığı, Asya ve Amerika’da bildirilen virüsler ile ortak bir atayı paylaştıkları belirlenmiştir. Filogenetik olarak bu grup Xinjiang kene virüsü ve Bole kene virüsü izolatları ile ilişkilidir. Mevcut bulgular Anadolu ve Balkanlar’da tespit edilen dizilerin oluşturduğu genotiplere sahip yeni bir kene flebovirüsünün varlığını işaret etmektedir. Ayrıca kısmi dizi analizlerine göre genotipler farklı kene cins veya türlerine adaptasyon göstermiş olabileceği düşünülmektedir (15). Bulgaristan, Yunanistan, Türkiye ve Portekiz kaynaklı farklı

flebovirüs kladlarının filogenetik olarak ilişkili olduğu ve belirli kene türlerinde tespit edildiği bildirilmiştir (13, 14, 120, 122-124), çalışmamızda elde edilen bulgular bu bildirimleri destekler nitelik taşımaktadır.

Kene kaynaklı flebovirüslerden SFTSV ve HRTV insanda enfeksiyon etkeni olduğuna dair bildirimler (54, 116, 126-128) bulunmakla birlikte bu virüslerin sığır, koyun, domuz, köpek, keçi ve tavuk gibi çeşitli hayvanları da enfekte ettiği bildirilmiştir (54, 116) Bhanja virüsü, çoğunlukla hayvanlar için patojenik olmakla birlikte, insanlarda da ateşli hastalığa neden olduğu bildirilmiştir (117, 129, 130) Finlandiya'da sığırlarda Uukuniemi virüsüne maruziyet gösterilmiştir (131). Örneklemimize eklenen ve 47 kişiden elde edilen 59 klinik örnekte (47 serum ve 12 BOS) flebovirüs taraması yapılmıştır. Bu serum örneklerinin içerisinde KKKAV pozitif, kene ısırması olan ve kene ısırması olmamasına rağmen ateşli hastalık gözlenen hastaların örnekleride bulunmasına karşın herhangi bir pozitiflik saptanmamıştır (15). Çalışmamızda dahil olmak üzere yeni tanımlanmış olan kene flebovirüslerinin patojenitelerine dair henüz kesin bir kanı söz konusu değildir.

Arbovirüsler içerisinde yer alan flavirüsler sivrisinekler, kum sinekleri ve keneler ile aktarılmakta ve hem insanlar hem de hayvanlar için ciddi enfeksiyon etkenleri olarak önem teşkil etmektedirler (32). Kene ile bulaşan flavivirüsler içerisinde Gadget'lar Gully virüsü, Kadam virüsü, Karshi virüsü, Kyasanur orman hastalığı virüsü, Langat virüsü, "Louping ill" virüsü, Meaban virüsü, Omsk kanamalı ateşi virüsü, Powassan virüsü, Royal Farm virüsü, Saumarez Reef virüsü, TBE virüsü ve Tyuleniy virüsü yer almaktadır. Bunlar arasında memelilerde tıbbi öneme sahip olan türler ise Karshi virüsü, Kyasanur orman hastalığı virüsü, Langat virüsü, "Louping ill", Omsk kanamalı ateşi virüsü, Powassan virüsü ve TBE virüsüdür (68).

Kene kaynaklı flavivirüsler arasında, en iyi bilinen insan patojeni olan TBE virüsü Avrupa'nın batısından Japonya'nın doğu kıyılarına kadar geniş bir yayılım göstermektedir. Dünya üzerinde her yıl 10.000'den fazla olgu bildirilen TBE virüsü, nörotropik flavivirüsler içerisinde Japon ensefalitinden sonra en yüksek morbidite oranına sahiptir (61).

Türkiye’de TBE virüsüne ilişkin ilk bulgular 1968 yılında, İzmir’den bildirilmiş ve sebebi bilinmeyen MSS enfeksiyonu bulunan üç hastanın serumunda hemaglutinasyon inhibisyon (HI) testiyle yüksek TBE virüsü antikor titresi tespit edilmiştir (78). Ege Bölgesi’nden yapılan başka bir bildirimde, 1980 yılında 1074 sağlıklı kişi ile gerçekleştirilen seroprevalans çalışmasında 13 kişide TBE virüsü seropozitifliği HI testiyle saptanmıştır (80). 2006 yılında Ege, Karadeniz, Marmara, İç ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinden toplanan öykülerinde kene ısırması olan 145 hasta serumunda ELISA testi ile örneklerin %1,4 (4/145)’ünde TBE virüsü IgG pozitifliği belirlendiği bildirilmiştir (132). Ergünay ve ark. tarafından 2007 yılında Güneydoğu Anadolu’da, Şanlıurfa ve Siverek’te toplanan 181 serum örneğinde ELISA ile TBE virüsü IgG pozitifliği %10,5 (19/181), TBE virüsü IgM pozitifliği ise %5 (9/181) olarak saptanmıştır (81). 2009 yılında Ankara, Konya, Eskişehir ve Zonguldak’tan kan donörlerinden toplanan 2454 serum örneğini ELISA ve IIFT taranmış ve 47 örnekte (%1,9) TBE virüsü IgG antikoruna saptanmıştır. Aynı çalışmada Zonguldak’ta orman işçisi olan bir kişinin pozitif örneği nötralizasyon testi ile doğrulanmıştır (82). 2010 yılında Sinop’ta toplanan 273 serumda IFA ile %2,6 (7/273)’sında TBE virüsü IgG antikoruna tespit edilmiştir (133). 2012 yılında Samsun’unda TBEV seroprevalansını belirlemek için yapılan bir çalışmada, 419 sağlık kişiden toplanan serum örnekleri ELISA ile taranmış ve iki örnekte IgG bir örnekte ise IgM pozitifliği saptanmış ancak bu örneklerin hiçbiri nötralizasyon testi ile doğrulanamıştır (134). Mersin’de 2014 yılında bir araştırmada 920 sağlıklı kan donöründen alınan örneklerin ikisinde TBE virüsü IgG antikoruna saptanmış ancak nötralizasyon testi sonucunda negatif olarak bildirilmiştir (135).

TBE virüsü, Avrupa, Sibiryaya ve Uzakdoğu olmak üzere üç alt tipe sahiptir. Avrupa alt tipinin vektörü *I. ricinus* iken Sibiryaya ve Uzakdoğu alt tiplerinin vektörü *I. persulcastus*’tur. Bunların yanı sıra TBE virüsünün olası vektörleri arasında *I. hexagonus*, *Haemaphysalis* ve *Dermacentor* cinslerinin olduğu saptanmıştır. Türkiye’de *I. ricinus*’ un özellikle yoğun yağış oranının etkisiyle Karadeniz başta olmak üzere Akdeniz, Ege, Marmara ve Doğu Anadolu bölgelerinde geniş bir yayılım gösterdiği bildirilmiştir (94). Ancak ülkemizde vektörü geniş yayılıma sahip olmasına karşın daha önce TBE virüsünün kenelerde gösterilmesine yönelik bir bildirim bulunmamaktadır.



Çalışmamızda İstanbul, Kırklareli ve Edirne illerinden *I. ricinus* (272 dişi ve erkek), *Ixodes* sp. (2212 larva ve nimf) ve *H. parva*, *H. punctata*, *H. inermis* (1093 dişi ve erkek) ve *Haemaphysalis* sp. (412 nimf); Kırklareli ve Edirne illerinden *Dermacentor marginatus* (29 dişi ve erkek) ve *Dermacentor* sp. (8 nimf) topladık. Bu ve diğer kene türlerinin gruplandığı 572 havuzda kene kaynaklı flavivirüs saptanması amacıyla iki aşamalı PCR ile taranmış ancak viral RNA saptanamamıştır. Çalışmamızın sonuçları 2013, 2014, 2015 ve 2018 yıllarında örnekleme yapılan alanlarda TBE virüsü veya diğer flavivirüslerin bulunmadığını ya da enfeksiyon oranlarının düşük olması sebebiyle taranan örneklem kapsamında saptanamadığını düşündürmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Arbovirüsler, epidemiyolojik özelliklerin değişmesi ve küreselleşen dünyada hızlı seyahat ve ticaret gibi imkanların artması ile halk sağlığı açısından ciddi tehditler oluşturmaya devam etmektedir. Ülkemiz elverişli iklim koşulları ve coğrafi özellikleriyle pek çok arbovirüs için uygun koşullara sahiptir. Özellikle son yıllarda konuyla ilgi bildirimler artmakla birlikte, özellikle kene kaynaklı virüslerin, etken olabilecekleri enfeksiyonların yayılımının öngörülmesi, oluşabilecek risklerin değerlendirilmesi ve uygun tedbirlerin alınması için yeterli değildir. Viral patojen vektörü olan veya olası vektör potansiyeline sahip kenelerin dağılımın ve taşıdıkları etkenlerin saptanması, dolaşımında bulunan kene kaynaklı hastalık etkeni virüslerin ve kene kaynaklı hastalıkların epidemiyolojisinin belirlenmesi için kritik öneme sahiptir.

Çalışmamızda, İstanbul, Kırklareli, Edirne ve Tekirdağ illerinden sahadan ve hayvanlar üzerinden toplanan kenelerin tanımlanmış, taşıdıkları olası patojenik ve non-patojenik virüsler çeşitli nairovirüsü, flebovirüsü ve flavivirüsü saptayabilen, literatürde tanımlanmış olan yüksek duyarlılığa sahip PCR yöntemleri ile taranmıştır. Çalışma 2013, 2014, 2015 ve 2018 yıllarında 37 lokasyonda yapılmış ve toplamda 7154 kene örneği elde edilmiştir. Toplanan kene örneklerinin %34,48'i (2467/7154) dişi, %23'ü (1646/7154) erkek, %13,24'ü (947/7154) nimf ve %29,28'i (2095/7154) larva olarak belirlenmiştir; tür dağılımları ise en sık *Ixodes* sp. %30,92 (2212/7154), *H. marginatum* %14,29 (1022/7154), *H. scupense* %13,45 (962/7154), *Hae. parva* %9,40 (673/7154) ve *R. turanicus* %8,17 (584/7154) olarak tespit edilmiştir. Nairovirüs, flebovirüs ve flavivirüs nükleik asit taramaları; toplanan kene örneklerinin lokasyon ve türlere göre gruplandığı toplam 572 havuzda gerçekleştirilmiştir. Yapılan taramalar sonucunda havuzların %0,7'sinde (4/572) nairovirüs ve %3,3'ünde (19/572) flebovirüs RNA'sı saptanırken, havuzlarda flavivirüs RNA'sı saptanamamıştır.

Çalışmamızda ortaya çıkan temel sonuçlar aşağıda belirtilmiş ve önem verilmesi gereken noktalara dikkat çekilmiştir:

1. Örnekleme alanlarında, kene kaynaklı nariovirüsler, flebovirüsler ve flavivirüsler için vektör potansiyeline sahip olan kene türleri saptanmıştır. Bu sonuçlar, virüslerin alandaki aktivitelerini sürdürdüğünü ve/veya aynı türler ile aktarılan diğer kene kaynaklı virüslerin de alanda bulunabileceklerini işaret etmektedir.
2. Sürveyans verileri ve olgu bildirimleri, kene kaynaklı nairovirüsler içerisinde halk sağlığı için önemli bir yere sahip olan KKKAV örnekleme alanında varlığını göstermektedir. Bununla birlikte, bölgede KKKAV ve KKKAV-AP92 izolatını saptadık. Bu sonuçlar, KKKA vakaları veya oluşabilecek muhtemel salgınlar için gerekli önemlerin alınması gerekliliğine işaret etmektedir.
3. Örnekleme alanında, ülkemizden daha önce bildirilmiş olan yeni kene kaynaklı flebovirüslere dair veriler elde ettik. Bu veriler kene kaynaklı flebovirüsler ile ilgili bölgeden yapılmış olan ilk bildirimlerdir. Bu virüslerin insan ya da hayvanlar üzerindeki etkilerine dair bildirimler henüz bulunmamasına karşın kene kaynaklı flebovirüsler içerisinde insanlarda önemli enfeksiyon etkeni olan başka virüslerin bildirimleri söz konusudur. Bu doğrultuda ülkemizde yeni tanımlanmış ve farklı bölgelerden bildirimleri olan bu virüslerin enfeksiyon etkeni olma potansiyelleri araştırılmalıdır.
4. İncelenen örneklerde flavivirüslere ait bulgular saptanamamıştır. Ancak çalışmamız, özellikle flavivirüsler içerisinde dünyada geniş bir yayılıma sahip olan ve ülkemizde oldukça sınırlı bildirmiş olan TBE virüsünün vektör kene türlerinde varlığının araştırıldığı ilk çalışmadır. TBE virüsünün saptanamamış olması bölgede virüsün aktivitesinin düşük olduğuna ya da dolaşmadığına işaret ediyor olabilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Kuno G, Chang GJ. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clinical microbiology reviews*. 2005;18(4):608-37.
2. Gould E, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, de Lamballerie X. Emerging arboviruses: Why today? One health (Amsterdam, Netherlands). 2017;4:1-13.
3. Gubler DJ. The global resurgence of arboviral diseases\* *TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE* 1996:449-51
4. Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of medical research*. 2002;33(4):330-42.
5. Horak IG, Camicas JL, Keirans JE. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Experimental & applied acarology*. 2002;28(1-4):27-54.
6. Anderson JF, Magnarelli LA. Biology of ticks. *Infectious disease clinics of North America*. 2008;22(2):195-215, v.
7. A. G. KENELERİN VEKTÖRLÜĞÜ VE TÜRKİYE’DE DURUM. *ANKEM*. 2009;23:249-52.
8. Abudurexiti A, Adkins S, Alioto D, Alkhovsky SV, Avsic-Zupanc T, Ballinger MJ, et al. Taxonomy of the order Bunyavirales: update 2019. *Archives of virology*. 2019;164(7):1949-65.
9. Amarasinghe GK, Ayllon MA, Bao Y, Basler CF, Bavari S, Blasdel KR, et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2019. *Archives of virology*. 2019;164(7):1967-80.
10. Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *The Journal of general virology*. 2017;98(1):2-3.
11. Shi J, Hu Z, Deng F, Shen S. Tick-Borne Viruses. *Virologica Sinica*. 2018;33(1):21-43.
12. Inci A, Yildirim A, Duzlu O, Doganay M, Aksoy S. Tick-Borne Diseases in Turkey: A Review Based on One Health Perspective. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(12):e0005021.
13. Dincer E, Brinkmann A, Hekimoglu O, Hacıoglu S, Foldes K, Karapinar Z, et al. Generic amplification and next generation sequencing reveal Crimean-Congo hemorrhagic fever virus AP92-like strain and distinct tick phleboviruses in Anatolia, Turkey. *Parasites & vectors*. 2017;10(1):335.
14. Brinkmann A, Dincer E, Polat C, Hekimoglu O, Hacıoglu S, Foldes K, et al. A metagenomic survey identifies Tamdy orthonairovirus as well as divergent phlebo-, rhabdo-, chu- and flavi-like viruses in Anatolia, Turkey. *Ticks and tick-borne diseases*. 2018;9(5):1173-83.
15. Emanet N, Kar S, Dincer E, Brinkmann A, Hacıoglu S, Farzani TA, et al. Novel Tick Phlebovirus Genotypes Lacking Evidence for Vertebrate Infections in Anatolia and Thrace, Turkey. *Viruses*. 2019;11(8).
16. Nuttall PA. Tick-borne viruses. In: Roe DESaRM, editor. *Biology of ticks 2*. New York: NY: Oxford University Press; 2014. p. 180–210.
17. Bichaud L, de Lamballerie X, Alkan C, Izri A, Gould EA, Charrel RN. Arthropods as a source of new RNA viruses. *Microbial pathogenesis*. 2014;77:136-41.
18. Stockman SS. Louping-ill. *The Journal Of Comparative Pathology And Therapeutics*. 1918;31:137-93.
19. Chen G-CPaW-J. Arboviral Encephalitis. In: Tkachev S, editor. *Encephalitis: InTech*; 2013.

20. Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada-Peña A, Horak IG, et al. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *ZOOTAXA*. 2010;2528:1–28.
21. Estrada-Pena A. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 2015;34(1):53-65.
22. Mansfield KL, Jizhou L, Phipps LP, Johnson N. Emerging Tick-Borne Viruses in the Twenty-First Century. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017;7:298.
23. Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology*. 2004;129 Suppl:S3-14.
24. Labuda M, Nuttall PA. Tick-borne viruses. *Parasitology*. 2004;129 Suppl:S221-45.
25. Bursali A, Keskin A, Tekin S. A review of the ticks (Acari: Ixodida) of Turkey: species diversity, hosts and geographical distribution. *Experimental & applied acarology*. 2012;57(1):91-104.
26. Lasecka L, Baron MD. The molecular biology of nairoviruses, an emerging group of tick-borne arboviruses. *Archives of virology*. 2014;159(6):1249-65.
27. E M. On a tick-borne gastro-enteritis of sheep and goats occurring in British East Africa. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*. 1917;30:28-57.
28. Holzer B, Bakshi S, Bridgen A, Baron MD. Inhibition of interferon induction and action by the nairovirus Nairobi sheep disease virus/Ganjam virus. *PloS one*. 2011;6(12):e28594.
29. Hoogstraal H. The Epidemiology of Tick-Borne Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Asia, Europe, and Africa. *Journal of medical entomology*. 1979;15(4):307-417.
30. Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral research*. 2004;64(3):145-60.
31. Ergonul O. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *The Lancet Infectious diseases*. 2006;6(4):203-14.
32. Chris A. Whitehouse JHK, Jiro Wada , and Koray Ergunay. Family Bunyaviridae. In: Paul Shapshak JTS, Charurut Somboonwit, Jens H. Kuhn, editor. *Global Virology I - Identifying and Investigating Viral Diseases*. New York, USA: Springer, New York; 2015. p. 199-246.
33. Koçak AA. Investigation of Enteroviruses, Herpesviruses (1, 2, 6, 7), Flaviruses And Phleboviruses in Patients with Atypical Meningitides/Encephalitis by Polymerase Chain Reaction [Ph.D. thesis]: Gazi University; 2017.
34. Bernard N Fields DMK, Peter M Howley. *Fields virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007. 0 p.
35. Weaver SC, Barrett AD. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature reviews Microbiology*. 2004;2(10):789-801.
36. Maes P, Alkhovsky SV, Bao Y, Beer M, Birkhead M, Briese T, et al. Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018. *Archives of virology*. 2018;163(8):2295-310.
37. Us D, Ergunay, K. *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*. Ankara Bilimsel Tıp Kitabevi; 2012.
38. Pick A. Zur Pathologie und Therapie einer eigenthümlichen endemischen Krankheitsform. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 1886;33:1141-5.
39. Sabin AB. Recent advances in our knowledge of dengue and sandfly fever. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1955;4(2):198-207.
40. Alkan C, Bichaud L, de Lamballerie X, Alten B, Gould EA, Charrel RN. Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral research*. 2013;100(1):54-74.

41. Verani P, Lopes M, Nicoletti L, Balducci M. Studies on Phlebotomus-transmitted viruses in Italy. I. Isolation and characterization of a sandfly fever Naples-like virus. *Arboviruses in the Mediterranean countries* Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. 1980:195-201.
42. Ehrnst A, Peters C, Niklasson B, Svedmyr A, Holmgren B. Neurovirulent Toscana virus (a sandfly fever virus) in Swedish man after visit to Portugal. *The Lancet*. 1985;325(8439):1212-3.
43. Calisher C, Weinberg A, Muth D, Laznick J. Toscana virus infection in United States citizen returning from Italy. *The Lancet*. 1987;329(8525):165-6.
44. Saikku P, Brummer-Korvenkontio M. Arboviruses in Finland. II. Isolation and characterization of Uukuniemi virus, a virus associated with ticks and birds. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1973;22(3):390-9.
45. Palacios G, Savji N, Travassos da Rosa A, Guzman H, Yu X, Desai A, et al. Characterization of the Uukuniemi virus group (Phlebovirus: Bunyaviridae): evidence for seven distinct species. *Journal of virology*. 2013;87(6):3187-95.
46. Matsuno K, Weisend C, Kajihara M, Matysiak C, Williamson BN, Simuunza M, et al. Comprehensive molecular detection of tick-borne phleboviruses leads to the retrospective identification of taxonomically unassigned bunyaviruses and the discovery of a novel member of the genus phlebovirus. *Journal of virology*. 2015;89(1):594-604.
47. Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, Liu Y, Li JD, Sun YL, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *The New England journal of medicine*. 2011;364(16):1523-32.
48. McMullan LK, Folk SM, Kelly AJ, MacNeil A, Goldsmith CS, Metcalfe MG, et al. A new phlebovirus associated with severe febrile illness in Missouri. *The New England journal of medicine*. 2012;367(9):834-41.
49. Bouloy M. Molecular Biology of Phleboviruses. In: Alexander Plyusnin RME, editor. *Bunyaviridae: Molecular and Cellular Biology*: Caister Academic Press 2011. p. 95-128.
50. Hornak KE, Lanchy JM, Lodmell JS. RNA Encapsidation and Packaging in the Phleboviruses. *Viruses*. 2016;8(7).
51. Elliott RM, Brennan B. Emerging phleboviruses. *Current opinion in virology*. 2014;5:50-7.
52. Elliott RM. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nature reviews Microbiology*. 2014;12(10):673-85.
53. Luo LM, Zhao L, Wen HL, Zhang ZT, Liu JW, Fang LZ, et al. Haemaphysalis longicornis Ticks as Reservoir and Vector of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus in China. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(10):1770-6.
54. Brault AC, Savage HM, Duggal NK, Eisen RJ, Staples JE. Heartland Virus Epidemiology, Vector Association, and Disease Potential. *Viruses*. 2018;10(9).
55. Lani R, Moghaddam E, Haghani A, Chang LY, AbuBakar S, Zandi K. Tick-borne viruses: a review from the perspective of therapeutic approaches. *Ticks and tick-borne diseases*. 2014;5(5):457-65.
56. Mendoza CA, Ebihara H, Yamaoka S. Immune Modulation and Immune-Mediated Pathogenesis of Emerging Tickborne Banyangviruses. *Vaccines*. 2019;7(4).
57. Stokes A, Bauer JH, HUDSON X. Experimental transmission of yellow fever to laboratory animals. *American Journal of Tropical Medicine*. 1928;8(2).
58. SMITHBURN KC, HUGHES, T. P. , BURKE, A. W. , PAUL, J. H. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1940;20:471-92.
59. Murgue B, Murri S, Triki H, Deubel V, Zeller HG. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;951:117-26.

60. Ternovoi VA, Protopopova EV, Chausov EV, Novikov DV, Leonova GN, Netesov SV, et al. Novel variant of tickborne encephalitis virus, Russia. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(10):1574.
61. Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet (London, England)*. 2008;371(9627):1861-71.
62. Ng WC, Soto-Acosta R, Bradrick SS, Garcia-Blanco MA, Ooi EE. The 5' and 3' Untranslated Regions of the Flaviviral Genome. *Viruses*. 2017;9(6).
63. Öncü C. Identification And Partial Genomic Characterization Of Mosquito Flaviviruses In Thrace Region [M.Sc. thesis]: Hacettepe University; 2017.
64. Barrows NJ, Campos RK, Liao KC, Prasanth KR, Soto-Acosta R, Yeh SC, et al. Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chem Rev*. 2018;118(8):4448-82.
65. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in virus research*. 2003;59:23-61.
66. Lopez-Denman AJ, Mackenzie JM. The IMPORTance of the Nucleus during Flavivirus Replication. *Viruses*. 2017;9(1).
67. Hubalek Z, Rudolf I. Tick-borne viruses in Europe. *Parasitology research*. 2012;111(1):9-36.
68. Kemenesi G, Banyai K. Tick-Borne Flaviviruses, with a Focus on Powassan Virus. *Clinical microbiology reviews*. 2019;32(1).
69. Shah SZ, Jabbar B, Ahmed N, Rehman A, Nasir H, Nadeem S, et al. Epidemiology, Pathogenesis, and Control of a Tick-Borne Disease- Kyasanur Forest Disease: Current Status and Future Directions. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2018;8:149.
70. Carletti F, Castilletti C, Di Caro A, Capobianchi MR, Nisii C, Suter F, et al. Alkhurma hemorrhagic fever in travelers returning from Egypt, 2010. *Emerging infectious diseases*. 2010;16(12):1979-82.
71. Ruzek D, Yakimenko VV, Karan LS, Tkachev SE. Omsk haemorrhagic fever. *Lancet (London, England)*. 2010;376(9758):2104-13.
72. Rust RS. Human arboviral encephalitis. *Seminars in pediatric neurology*. 2012;19(3):130-51.
73. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine*. 2012;30(29):4301-6.
74. E A Gould TS. Pathogenic flaviviruses. *The Lancet*. 2008;371(9611):500-9.
75. Leblebicioglu H, Ozaras R, Irmak H, Sencan I. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey: Current status and future challenges. *Antiviral research*. 2016;126:21-34.
76. KKKA İstatistik verileri T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı 2019 [Available from: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/zoonotikvektorel-kkka/zoonotikvektorel-kkka-istatistik>].
77. ERGÖNÜL Ö. KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ. *ANKEM Derg*. 2009;23:234-40.
78. Serter F. Tick-borne meningo-encephalitis cases in Izmir area. *EU Tıp Fak Mec*. 1968;7(1):1-13.
79. Radda A. Antibodies against group A and B Arboviruses in domestic animals from Turkey. *EU Tıp Fak Mec*. 1971;10:227-30.
80. Serter D. Present status of arbovirus sero-epidemiology in the Aegean region of Turkey. *Zentralbl Bakteriologie*. 1980;9:155-61.
81. Ergunay K, Ozer N, Us D, Ozkul A, Simsek F, Kaynas S, et al. Seroprevalence of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in southeastern Turkey: first evidence for tick-borne encephalitis virus infections. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, NY)*. 2007;7(2):157-61.
82. Ergunay K, Saygan MB, Aydogan S, Litzba N, Sener B, Lederer S, et al. Confirmed exposure to tick-borne encephalitis virus and probable human cases of tick-borne

- encephalitis in Central/Northern Anatolia, Turkey. *Zoonoses and public health*. 2011;58(3):220-7.
83. de Mendonca PG. Impact of Flag Texture on Tick Sampling Efficiency. *Journal of arthropod-borne diseases*. 2018;12(4):421-5.
84. Honig JE, Osborne JC, Nichol ST. The high genetic variation of viruses of the genus Nairovirus reflects the diversity of their predominant tick hosts. *Virology*. 2004;318(1):10-6.
85. Vazquez A, Sanchez-Seco MP, Palacios G, Molero F, Reyes N, Ruiz S, et al. Novel flaviviruses detected in different species of mosquitoes in Spain. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, NY)*. 2012;12(3):223-9.
86. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT,. *Nucleic Acids Symposium Series No41*. 1999:95-8.
87. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*. 2018;35(6):1547-9.
88. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. 1990;215(3):403-10.
89. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*. 1994;22(22):4673-80.
90. Deyde VM, Khristova ML, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *Journal of virology*. 2006;80(17):8834-42.
91. Papa A, Papadopoulou E, Tsioka K, Kontana A, Pappa S, Melidou A, et al. Isolation and whole-genome sequencing of a Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strain, Greece. *Ticks and tick-borne diseases*. 2018;9(4):788-91.
92. Kilpatrick AM, Randolph SE. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *Lancet (London, England)*. 2012;380(9857):1946-55.
93. Barzon L. Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2018;107:38-47.
94. Aydin L, Bakirci S. Geographical distribution of ticks in Turkey. *Parasitology research*. 2007;101 Suppl 2:S163-6.
95. Papa A, Weber F, Hewson R, Weidmann M, Koksai I, Korukluoglu G, et al. Meeting report: First International Conference on Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral research*. 2015;120:57-65.
96. Spengler JR, Bente DA, Bray M, Burt F, Hewson R, Korukluoglu G, et al. Second international conference on Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral research*. 2018;150:137-47.
97. Whitehouse CA HH, Vatansever Z et al. Molecular detection of Crimean Congo hemorrhagic fever virus in ticks from Turkey. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene 55 Annual Meeting Proceedings Book, Atlanta*. 2006.
98. Tonbak S, Aktas M, Altay K, Azkur AK, Kalkan A, Bolat Y, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: genetic analysis and tick survey in Turkey. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(11):4120-4.
99. Orkun O, Karaer Z, Cakmak A, Nalbantoglu S. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks in Turkey: A broad range tick surveillance study. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2017;52:59-66.
100. Gargili A, Midilli K, Ergonul O, Ergin S, Alp HG, Vatansever Z, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever in European part of Turkey: genetic analysis of the virus strains from



ticks and a seroepidemiological study in humans. *Vector borne and zoonotic diseases* (Larchmont, NY). 2011;11(6):747-52.

101. Papadopoulos Ot, Koptopoulos G. Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) in Greece: isolation of the virus from *Rhipicephalus bursa* ticks and a preliminary serological survey. *Zentbl Bakteriolog Hyg.* 1980;1(Suppl 9):189-93.

102. Papa A, Chaligiannis I, Kontana N, Sourba T, Tsioka K, Tsatsaris A, et al. A novel AP92-like Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strain, Greece. *Ticks and tick-borne diseases.* 2014;5(5):590-3.

103. Panayotova E, Papa A, Trifonova I, Christova I. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus lineages Europe 1 and Europe 2 in Bulgarian ticks. *Ticks and tick-borne diseases.* 2016;7(5):1024-8.

104. Kautman M, Tiar G, Papa A, Siroky P. AP92-like Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in *Hyalomma aegyptium* Ticks, Algeria. *Emerging infectious diseases.* 2016;22(2):354-6.

105. Sherifi K, Cadar D, Muji S, Robaj A, Ahmeti S, Jakupi X, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus clades V and VI (Europe 1 and 2) in ticks in Kosovo, 2012. *PLoS neglected tropical diseases.* 2014;8(9):e3168.

106. Salehi-Vaziri M, Baniasadi V, Jalali T, Mirghiasi SM, Azad-Manjiri S, Zarandi R, et al. The First Fatal Case of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Caused by the AP92-Like Strain of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Japanese journal of infectious diseases.* 2016;69(4):344-6.

107. Midilli K, Gargili A, Ergonul O, Elevli M, Ergin S, Turan N, et al. The first clinical case due to AP92 like strain of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus and a field survey. *BMC infectious diseases.* 2009;9:90.

108. Hewson R. Molecular epidemiology, genomics, and phylogeny of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: Springer; 2007.* p. 45-55.

109. Anagnostou V, Papa A. Evolution of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Infection, Genetics and Evolution.* 2009;9(5):948-54.

110. Karti SS, Odabasi Z, Korten V, Yilmaz M, Sonmez M, Caylan R, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. *Emerging infectious diseases.* 2004;10(8):1379.

111. Ozdarendeli A, Aydin K, Tonbak S, Aktas M, Altay K, Koksali I, et al. Genetic analysis of the M RNA segment of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains in Turkey. *Archives of virology.* 2008;153(1):37-44.

112. Ozkaya E, Dincer E, Carhan A, Uyar Y, Ertek M, Whitehouse CA, et al. Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Turkey: occurrence of local topotype. *Virus research.* 2010;149(1):64-70.

113. Kalaycioglu AT, Durmaz R, Uyar Y, Unaldi O, Aksekili E, Ozkul A, et al. Lack of genetic diversity in Crimean-Congo hemorrhagic fever viruses in Turkey: assessment of present and future patterns of disease. *Journal of medical virology.* 2012;84(3):471-8.

114. Say Coskun US, Asik Z. Genotypic analysis of S segment of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Turkey. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica.* 2019;66(1):79-89.

115. Midilli K, Gargili A, Ergonul O, Sengoz G, Ozturk R, Bakar M, et al. Imported Crimean-Congo hemorrhagic fever cases in Istanbul. *BMC infectious diseases.* 2007;7:54.

116. Silvas JA, Aguilar PV. The Emergence of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2017;97(4):992-6.

117. Hubalek Z. Biogeography of tick-borne bhanja virus (bunyaviridae) in Europe. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases.* 2009;2009:372691.

118. Matsuno K, Kajihara M, Nakao R, Nao N, Mori-Kajihara A, Muramatsu M, et al. The Unique Phylogenetic Position of a Novel Tick-Borne Phlebovirus Ensures an Ixodid Origin of the Genus Phlebovirus. *mSphere*. 2018;3(3).
119. Li CX, Shi M, Tian JH, Lin XD, Kang YJ, Chen LJ, et al. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *eLife*. 2015;4.
120. Papa A, Kontana A, Tsioka K, Chaligiannis I, Sotiraki S. Novel phleboviruses detected in ticks, Greece. *Ticks and tick-borne diseases*. 2016;7(5):690-3.
121. Papa A, Kontana A, Tsioka K, Saratsis A, Sotiraki S. Novel phlebovirus detected in *Haemaphysalis parva* ticks in a Greek island. *Ticks and tick-borne diseases*. 2017;8(1):157-60.
122. Pereira A, Figueira L, Nunes M, Esteves A, Cota AJ, Vieira ML, et al. Multiple Phlebovirus (Bunyaviridae) genetic groups detected in *Rhipicephalus*, *Hyalomma* and *Dermacentor* ticks from southern Portugal. *Ticks and tick-borne diseases*. 2017;8(1):45-52.
123. Ohlendorf V, Marklewitz M, Kopp A, Yordanov S, Drosten C, Junglen S. Huge diversity of phleboviruses in ticks from Strandja Nature Park, Bulgaria. *Ticks and tick-borne diseases*. 2019;10(3):697-703.
124. Pimentel V, Afonso R, Nunes M, Vieira ML, Bravo-Barriga D, Frontera E, et al. Geographic dispersal and genetic diversity of tick-borne phleboviruses (Phenuiviridae, Phlebovirus) as revealed by the analysis of L segment sequences. *Ticks and tick-borne diseases*. 2019;10(4):942-8.
125. Prinz M, Fuchs J, Ehrmann S, Scherer-Lorenzen M, Kochs G, Panning M. Molecular identification of novel phlebovirus sequences in European ticks. *Ticks and tick-borne diseases*. 2017;8(5):795-8.
126. Liu M-m, Lei X-Y, Yu X-j. Meta-analysis of the clinical and laboratory parameters of SFTS patients in China. *Virology journal*. 2016;13(1):198.
127. Cui N, Liu R, Lu Q-B, Wang L-Y, Qin S-L, Yang Z-D, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus-related human encephalitis. *Journal of Infection*. 2015;70(1):52-9.
128. Kim UJ, Kim D-M, Ahn JH, Kang S-J, Jang H-C, Park K-H, et al. Case report Successful treatment of rapidly progressing severe fever with thrombocytopenia syndrome with neurological complications using intravenous immunoglobulin and corticosteroid. *Antiviral therapy*. 2016;21:637-40.
129. Calisher CH, Goodpasture HC. Human infection with Bhanja virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1975;24(6):1040-2.
130. Vesenjakk-Hirjan J, Calisher C, Beus I, Marton E. First natural clinical human Bhanja virus infection. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 1980:297-301.
131. Saikku P. Arboviruses in Finland. 3. Uukuniemi virus antibodies in human, cattle, and reindeer sera. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1973;22(3):400-3.
132. Uyar Y, Akcali A, Carhan E, Ozkaya, and M. Ertek. Seroprevalence of Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV) Among Cases with Tick Bite History in Turkey. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 2007;64(2):21-5.
133. Gunes T, Poyraz O, Atas M, Alim A. [Seroprevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) among the residents of rural areas in Sinop, central Black-Sea region, Turkey]. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2010;44(4):585-91.
134. Aslan Basbulut E, Gozalan A, Sonmez C, Coplu N, Korhasan B, Esen B, et al. [Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* and tick-borne encephalitis virus in a rural area of Samsun, Turkey]. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2012;46(2):247-56.

135. Tezcan S, Kizildamar S, Ulger M, Aslan G, Tiftik N, Ozkul A, et al. [Flavivirus seroepidemiology in blood donors in Mersin province, Turkey]. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2014;48(4):606-17.