



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**SİĞİRLARDAN TOPLANAN KENELERDE LYME  
HASTALIĞININ ETKENİ *BORRELIA BURGDORFERI* (*SENSU  
LATO*) VARLIĞININ MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİYLE  
BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Evrin GENÇ**

**Samsun  
Haziran-2017**





ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**SİĞİRLARDAN TOPLANAN KENELERDE LYME  
HASTALIĞININ ETKENİ *BORRELIA BURGDORFERI* (*SENSU  
LATO*) VARLIĞININ MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİYLE  
BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Evrım GENÇ**

**Danışman**

**Doç.Dr. Özlem BÜYÜKTANIR YAŞ**

**Samsun  
Haziran-2017**

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Evrım GENÇ tarafından Doç.Dr. Özlem BÜYÜKTANIR YAŞ Danışmanlığında hazırlanan “Sığırlardan toplanan kenelerde Lyme hastalığının etkeni *Borrelia burgdorferi* (*sensu lato*) varlığının moleküler tanı yöntemleriyle belirlenmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 15/06/2017 tarihinde yapılan sınav ile Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Müjgan İZGÜR,  
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi AbD

Üye : .. Prof. Dr. Oktay GENÇ,  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi AbD

Üye : Doç. Dr. Özlem BÜYÜKTANIR YAŞ,  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi AbD

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / .... / .....

**Prof. Dr. Ahmet UZUN**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitim boyunca engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, her zaman ilgi ve desteğiyle yanımda olan saygıdeğer danışman hocam Doç.Dr. Özlem BÜYÜKTANIR YAŞ'a, kenelerin sağlanmasında önemli katkısı olan, her fırsatta bilgi ve tecrübelerini paylaşan ve manevi yönden desteğini esirgemeyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalı öğretim üyesi sayın hocam Prof.Dr. Oktay GENÇ'e, kenelerin tanımlanmasında bilgilerinden yararlandığım Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Prof.Dr. Mustafa AÇIÇI'ya ve kenelerin toplanmasında bana yardımcı olan arkadaşım Veteriner Hekim Ali SERDAR'a, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalı öğretim üyeleri Prof.Dr. Timur GÜLHAN, Doç.Dr. Alper ÇİFTÇİ ve Doç.Dr. Arzu FINDIK'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca ve tüm eğitimim süresince maddi ve manevi yönden destekleriyle her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, PYO.VET.1904.16.010 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

## ÖZET

### SİĞİRLARDAN TOPLANAN KENELERDE LYME HASTALIĞININ ETKENİ *BORRELIA BURGDORFERI (SENSU LATO)* VARLIĞININ MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİYLE BELİRLENMESİ

**Amaç:** Bu çalışmada, Samsun ve Ordu illerinde yetiştirilen sığırlardan toplanan *Ixodes ricinus* türü kenelerde Lyme hastalığı etkeni *Borrelia burgdorferi sensu lato* kompleksi türlerinin *16S rDNA* ve *flaB* genlerine dayalı PZR yöntemi ile belirlenmesi hedeflendi.

**Materyal ve Metot:** Çalışmada, Samsun ve Ordu illerinde yetiştirilen sığırlara tutunan keneler toplandı ve tanımlandı. *I. ricinus* türü kenelerin genomik DNA'ları elde edildi. Kene DNA'larında *16S rDNA* ve *flaB* genleri PZR yöntemiyle çoğaltıldı. *Borrelia burgdorferi sensu lato* kompleksi dahilinde, *B. burgdorferi*, *B. afzelii* ve *B. garinii* türleri referans suşlarına ait DNA'lar pozitif kontrol olarak kullanıldı. PZR koşulları optimize edildi ve PZR ürünlerini saptama limiti belirlendi. DNA örneklerinin PZR ürünlerine ait bantlar yatay elektroforezde referans suşlar ve DNA marker'ler ile karşılaştırmalı olarak tanımlandı. Sonuçları doğrulamak amacıyla, *flaB* geni pozitif bulunan PZR ürünlerine dizi analizi yaptırıldı.

**Bulgular:** Bu çalışmada toplanan 369 kenenin 289'unun (%78) *I. ricinus* türüne ait olduğu saptandı. Kene DNA örneklerinin *flaB* ve *16S rDNA* genlerini hedefleyen PZR ile analizleri sonucunda, *Borrelia* referans suşlarıyla karşılaştırmalı olarak yatay elektroforezde sırasıyla 150 bç ve 1360 bç civarında bant oluşturan örnekler pozitif olarak değerlendirildi. *I. ricinus* türü kenelerde *Borrelia* prevalansı *flaB* geni ile %17,24, *16S rDNA* ile %15,51 oranlarında saptandı. *flaB* genine ait DNA dizi analizi sonuçları homoloji yönünden karşılaştırıldı ve yalnızca *B. burgdorferi sensu lato*'ya ait türlerle %87-95 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi.

**Sonuç:** Samsun ve Ordu illerinde yaygın olduğu saptanan *I. ricinus* türü kenelerde *B. burgdorferi sensu lato* varlığı, *flaB* ve *16S rDNA* genlerine dayalı PZR ile belirlendi. Bu bölgede, *Ixodes* cinsi kenelerin Lyme hastalığı etkenini taşıdıklarının belirlenmesi, halk sağlığı ve hayvan sağlığı yönünden önemli bir risk faktörünü oluşturmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Borrelia*; Lyme; *Ixodes*; *flaB*; *16S rDNA*; PZR

Evrin GENÇ, Yüksek Lisans Tezi  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Haziran-2017

## ABSTRACT

### IDENTIFICATION OF *BORRELIA BURGENDORFERI (SENSU LATO)*, CAUSATIVE AGENT OF LYME DISEASE FROM TICKS COLLECTED FROM CATTLE USING MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES

**Aim:** The aim of this study was to determine the *Borrelia* species within *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex, causative agent of Lyme disease, from *Ixodes ricinus* ticks collected from cattle in various parts of Samsun and Ordu provinces.

**Material and Method:** In this study, ticks were collected from cattle reared in Samsun and Ordu and the tick species were identified. Genomic DNA from *I. ricinus* were obtained. *16S rDNA* and *flaB* genes from tick DNA's were amplified using PCR. DNA's from reference strains of *B. burgdorferi*, *B. afzelii* and *B. garinii* were used as positive control. PCR was optimized and limit of detection in PCR was detected. Electrophoresis bands that belong to PCR products of the sample DNA's were identified in comparison with the reference DNA's and the DNA Ladders. DNA sequencing was done for *flaB* gene-based PCR products so as to confirm the results.

**Results:** 289 out of 369 ticks (78%) collected in this study were identified as *I. ricinus*. As a result of *flaB* and *16S rDNA* based PCR analysis of tick DNA samples, the samples with the sizes of 150 bp and 1360 bp electrophoresis bands respectively were determined as positive in comparison with *Borrelia* reference strains. *Borrelia* prevalence in *I. ricinus* ticks based on *flaB* and *16S rDNA* genes were detected as 17,24 % and 15,51% respectively. Homology comparison of DNA sequences for *flaB* gene was done and high similarity with only *B. burgdorferi sensu lato* species was determined.

**Conclusion:** *B. burgdorferi sensu lato* was detected in *I. ricinus* ticks that are prevalent in Samsun and Ordu by using PCR targeting *flaB* and *16S rDNA* genes. Determination of the causative agent of Lyme disease in *Ixodes* species in this region is an important risk factor for human and animal health.

**Keywords:** *Borrelia*; *Ixodes*; Lyme; *flaB*; *16S rDNA*; PCR

Evrin GENÇ, Master Thesis  
Ondokuz Mayıs University - Samsun, June-2017

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                    |  |
|--------------------|--|
| <b>µg</b>          | :Mikrogram                                   |
| <b>µl</b>          | : Mikrolitre                                 |
| <b>µm</b>          | : Mikrometre                                 |
| <b>µM</b>          | : Mikromol                                   |
| <b>ABD</b>         | : Amerika Birleşik Devletleri                |
| <b>BSK</b>         | :Barbour-Stoenner-Kelly                      |
| <b>BLAST</b>       | : Basic Local Alignment Search Tool          |
| <b>bç</b>          | : Baz çifti                                  |
| <b>CDC</b>         | : Centers for Disease Control and Prevention |
| <b>dk</b>          | :Dakika                                      |
| <b>DNA</b>         | : Deoksiribonükleik Asit                     |
| <b>ELISA</b>       | : Enzyme Linked Immunosorbent Assay          |
| <b><i>flaB</i></b> | : flagellin geni                             |
| <b>g</b>           | : Gram                                       |
| <b>IFA</b>         | : Floresan Antikor Testi                     |
| <b>kDa</b>         | : Kilodalton                                 |
| <b>LB</b>          | :Lyme Borreliosis                            |
| <b>MKP</b>         | :Modifiye Kelly medium                       |
| <b>m</b>           | :Metre                                       |
| <b>mg</b>          | :Miligram                                    |



|             |  |
|-------------|--|
| <b>mm</b>   | :Milimetre   |
| <b>ml</b>   | :Mililitre   |
| <b>mM</b>   | : Milimolar  |
| <b>NCBI</b> | : National Center for Biotechnology Information    |
| <b>ng</b>   | : Nanogram   |
| <b>OspA</b> | : Outer surface protein A                          |
| <b>OspB</b> | : Outer surface protein B                          |
| <b>OspC</b> | : Outer surface protein C                          |
| <b>pg</b>   | : Pikogram   |
| <b>pmol</b> | : Pikomol  |
| <b>PZR</b>  | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu                      |
| <b>°C</b>   | : Santigrat derece                                 |
| <b>rDNA</b> | : Ribozomal DNA                                    |
| <b>rpm</b>  | : Rotation per minute (Dakikadaki Rotasyon Sayısı) |
| <b>rRNA</b> | :Ribozomal RNA                                     |
| <b>sn</b>   | : Saniye   |
| <b>spp</b>  | : Alt Türleri (subspecies)                         |
| <b>TBE</b>  | : Tris-Borik Asit-EDTA                             |
| <b>VlsE</b> | : Yüzey Lipoprotein E                              |
| <b>WB</b>   | : Western blot                                     |

## İÇİNDEKİLER

|   |      |
|---|------|
| ÖZET .....  | iv   |
| ABSTRACT .....  | v    |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                           | vi   |
| İÇİNDEKİLER .....                                       | viii |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....                                   | 1    |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....                          | 1    |
| 2.1. Tarihçe .....                                      | 1    |
| 2.2. Etiyoloji .....                                    | 2    |
| 2.3. Bakteri Genomunun Yapısı .....                     | 3    |
| 2.4. Patogenez .....                                    | 3    |
| 2.5. Vektör Keneler .....                               | 4    |
| 2.5.1. <i>Ixodes</i> Cinsi Kenelerin Tanımlanması ..... | 5    |
| 2.5.2. Yaşam Döngüsü .....                              | 5    |
| 2.6. Epidemiyoloji .....                                | 7    |
| 2.6.1. Kuzey Amerika .....                              | 8    |
| 2.6.2. Avrupa .....                                     | 8    |
| 2.6.3. Türkiye .....                                    | 8    |
| 2.7. Lyme Hastalığına Bağlı Klinik Belirtiler .....     | 9    |
| 2.7.1. İnsanlarda Klinik Belirtiler .....               | 9    |
| 2.7.2. Evcil Hayvanlarda Klinik Belirtiler .....        | 10   |
| 2.8. Tanı .....   | 10   |
| 2.9. Kontrol .....                                      | 11   |
| 2.10. Tedavi .....                                      | 12   |
| <b>3. MATERYAL VE METOD</b> .....                       | 13   |
| 3.1. Materyal .....                                     | 13   |
| 3.1.1. Kenelerin Toplanması .....                       | 13   |
| 3.1.2. Kenelerin Tanımlanması .....                     | 14   |
| 3.1.3. Örnek Toplanan İlçelerin Coğrafi Konumu .....    | 14   |
| 3.1.4. Meteorolojik Veriler .....                       | 14   |
| 3.1.5. Kullanılan Malzemeler .....                      | 15   |
| 3.2. Metod .....  | 16   |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.1. DNA Ekstraksiyonu.....   | 16        |
| 3.2.2. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) .....  | 17        |
| 3.2.3. PZR Ürünlerinin Analizi.....   | 18        |
| 3.2.4. PZR ile Çoğaltılan Hedef Gen Konsantrasyonunu Saptama Limitinin Belirlenmesi.....          | 19        |
| 3.2.5. DNA Örneklerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması.....  | 19        |
| 3.2.6. Dizi Analizi .....   | 19        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>   | <b>20</b> |
| 4.1. Kenelerin Toplanması .....   | 20        |
| 4.2. Kenelerin Tanımlanması .....   | 20        |
| 4.3. Örnek Toplanan İlçelerin Coğrafi Konumu .....  | 21        |
| 4.4. Meteorolojik Veriler .....   | 22        |
| 4.5. DNA Ekstraksiyonu .....  | 22        |
| 4.6. Hedef DNA'ların Saptanma Limitinin Belirlenmesi .....  | 23        |
| 4.7. <i>I. ricinus</i> Türü Kene Örneklerinde <i>B. burgdorferi</i> Varlığının Belirlenmesi ..... | 25        |
| 4.7.1. Örneklerde <i>B. burgdorferi flaB</i> geninin PZR ile Saptanması.....                      | 25        |
| 4.7.2. Örneklerde <i>B. burgdorferi 16S rDNA</i> geninin PZR ile Saptanması.....                  | 26        |
| 4.8. Referans ve Örnek DNA'lara ait Dizi Analizi .....  | 30        |
| 4.8.1. Referans DNA'ya ait <i>flaB</i> geni Dizi Analizi. ....                                    | 30        |
| 4.8.2. <i>flaB</i> geni Kene DNA Örneklerine ait Dizi Analizi.....                                | 31        |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>  | <b>39</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>  | <b>40</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>  | <b>48</b> |

## 1. GİRİŞ

Lyme hastalığı (Lyme borreliosis), dünyada en yaygın kuzey Amerika'da, Avrupa ve Asya'da endemik seyreden kene kaynaklı, deri, sinir sistemi, eklemler ve kalp gibi birçok organı etkileyen multisistemik bir enfeksiyöz hastalıktır (Steere, 1989; Pfister ve ark., 1994; Steere, 2001; Stanek ve Strle, 2003; Marques, 2010; Chomel, 2015). Hastalığın etkeni *Borrelia* cinsine ait *Borrelia burgdorferi sensu lato* kompleksinde yer alan spiroket şekilli bakteriler olup, *Ixodes* cinsi sert kenelerin ısırması ile kan yoluyla canlılara bulaştırılmaktadır (Steere, 2001; Marques, 2010; Chomel, 2015). Bu kompleks dahilinde *Borrelia* cinsine ait 18 tür bulunmaktadır. Bu türlerden, *B. burgdorferi*, *B. garinii* ve *B. afzelii*'nin yaygın olarak, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. valaisiana* ve *B. bissettii*'nin de nadir olarak Lyme hastalığına yol açtığı bildirilmiştir (Anderson, 1991; Wang ve ark., 1999; Steere, 2001; Wilske, 2003; Steere, 2006; Fingerle ve ark., 2008; Rudenko ve ark., 2011). Kuzey Amerika'da hastalığa neden olan tür genel olarak *B. burgdorferi* olup, Avrupa'da yaygın olan türler *B. afzelii*, *B. garinii* ve *B. burgdorferi*'dir.

Lyme hastalığı vektörleri ağırlıklı olarak Amerika'nın kuzey doğusunda *I. scapularis* (*I. dammini*), kuzey batısında *I. pacificus*, Avrupa'da *I. ricinus*, Asya'da *I. persulcatus* türleridir (Gray, 1998; Chomel, 2015; CDC, 2017). Keneler doğada kemiricilerde yaşam döngülerinin bir bölümünü geçirerek, larva, nimf ve ergin hale dönüşürler. Raslantısal olarak insan ve köpek, at, sığır gibi memelilere tutunan keneler, kan emme sırasında enfekte canlılardan hastalık etkenini alarak bir sonraki canlıya aktarırlar. Lyme hastalığı kenelerin doğadaki yaşam döngülerine bağlı olarak en sık bahar ve yaz mevsimlerinde görülmektedir (Marques, 2010; Chomel, 2015).

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

Lyme hastalığı ilk olarak 1977 yılında ABD'nin Connecticut eyaleti Lyme kasabasında romatoid artriti olduğu düşünülen çocuklarda tanımlanmıştır. Olgular kırsal alanda yoğunlaşmış ve hastalığın bir özelliği olarak eritema migrans tanımlanarak bu hastalığın bir vektör yoluyla iletildiği gösterilmiştir (Steere, 1989).

İlk kez Willy Burgdorfer ve arkadaşları tarafından 1982 yılında *Ixodes scapularis*'ten Lyme hastalığına neden olan bakteri izole edildi (Burgdorfer ve ark., 1982). Daha sonra bu izolat *Borrelia* cinsinin yeni bir türü olarak tanımlandı ve 1984 yılında *Borrelia burgdorferi* olarak adlandırıldı (Johnson ve ark., 1984).

## 2.2. Etiyoloji

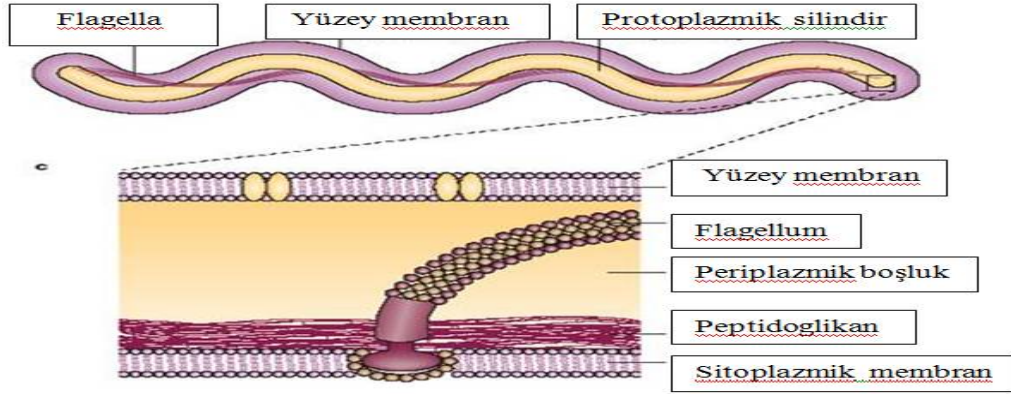
*Borrelia* cinsi, Gram negatif *Leptospira* ve *Treponema* cinslerini de içeren Spirochaetacea ailesinin bir üyesidir. Spiral biçimli, 11-39 µm uzunluğunda ve 0,2 µm genişliğinde bir mikroorganizmadır (Şekil 1). Spiroketler kıvrımlı bir vücuda sahip olup, iç ve dış membranlara ve esnek bir hücre duvarına sahiptir. Bakterinin hücre membranının altında protoplazması yer alır. Hücrenin flagella'sı (aksial filament) iç ve dış membranlar arasında periplazmada bulunur (Şekil 2). Flagella ile hücre silindiri arasındaki etkileşimler hücrenin yüksek düzeyde viskoz sıvılarda hareket edebilmesini sağlar (Charon ve ark., 1992; Brooks ve ark., 1998). Bu adaptasyon bakterinin enfekte konak veya vektöre ait dokularda yayılabilmesini sağlamaktadır. Giemsa ve Warthin-Stary boylarıyla iyi boyanmaktadır. Boyanmamış spiroketler ışık mikroskobunda gözlenemez, ancak karanlık saha veya faz kontrast mikroskobunda görülür (Şekil 1) (Johnson ve ark., 1984).



Şekil 1. *Borrelia burgdorferi*'nin karanlık saha mikroskobu altındaki görünümü

(<https://www.envita.com/lyme-disease/lyme-disease-treatment-a-primer-on-monitoring-recovery>)

*B. burgdorferi*, Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) (Barbour ve ark., 1983; Barbour, 1984) veya modifiye Kelly medium (MKP) (Preac-Mursic ve ark., 1986) besiyerlerinde 33-34°C'de mikroaerobik ortamda ürer. Bu besiyerleri kompleks yapıda olup, amino asitler, vitaminler, inorganik tuzlar, serum albümini, tavşan serumu, jelatin, N-asetil glukozamin içermektedir.



Şekil 2. Spiroketin yapısı (<http://lymediseaseguide.net/lyme-disease-morphology>)

### 2.3. Bakteri Genomunun Yapısı

*B. burgdorferi*'nin sahip olduğu bir adet linear kromozomu 910 725 baz çifti uzunluğundadır. Bu kromozomda yaklaşık 853 gen DNA replikasyonu, transkripsiyon, translasyon ve ayrıca taşıma ve metabolik sistemler gibi görevleri yerine getirmek için kodlanmaktadır. Bakteride 21 adet linear ve sirküler plazmid DNA'nın varlığı belirlenmiştir. Böylelikle, bakteride kromozoma ilave olarak 533 000 baz çifti DNA bulunmaktadır. *B. burgdorferi*'nin genomu plazmid sayısının fazla olması nedeniyle benzersiz bir yapıya sahiptir. Virulensten sorumlu genlerin çoğu bu plazmidlerde yer almaktadır (Fraser ve ark.,1997).

### 2.4. Patogenez

*B. burgdorferi*'nin canlılara aktarılması kenenin canlı üzerinde beslenmesi esnasında tükürüğünü deriye enjekte etmesi yoluyla olur. Bakterinin canlıya aktarılabilmesi için enfekte kenenin genellikle en az 36-48 saat beslenmesi gerekmektedir. Enfekte canlıdan bakteriyi kan emme yoluyla alan kenenin orta bağırsağında bakteri canlı kalır ve buradan hemolenf yoluyla tükürük bezlerine geçer. Kene sokması ağrısız olduğu için birçok hasta kene ile temas ettiğinin farkına varmaz (Chomel, 2015; CDC, 2017).

Bakterinin canlılara aktarılmasında dış yüzey proteinleri önemli rol oynamaktadır. Bunlardan OspA (outer surface protein A), OspB ve OspC ön plana çıkmaktadır. Etkenin keneden konakçıya iletilmesi sırasında bakteride farklı dış membran proteinlerini kodlayan genler eksprese olmaktadır (Schwan ve ark., 1995; de Silva ve Fikrig, 1997). Henüz daha kan emmemiş kenelerin bağırsağında yaşayan *B. burgdorferi* OspA proteinini sentezlerken, OspC proteinini sentezleyememektedir (Schwan ve Piesmen, 2000). Keneler kan ile beslenmeye başladığında OspA proteininin sentezi baskılanır ve OspC proteini enfekte memelilerde çoğalan *B. burgdorferi*'de sentezlenir (Schwan ve ark., 1995). Diğer dış membran proteinleri

p39, OspD (28 kDa) (Lam ve ark., 1994), OspE (19 kDa) ve OspF (26 kDa)'dir (Norris ve ark., 1992).

Memeli vücuduna kenenin tükürüğü yoluyla giren spiroketler, hem hücrel hem de humoral immün yanıtların oluşmasına rağmen canlılıklarını sürdürebilirler (Strle ve ark., 2009). Memeli vücudunda oluşan immün yanıtı karşı OspC ve yüzey lipopolisakariti olan VISe virülens faktörleri olarak rol oynarlar (Yemişen ve ark.,2012). Bu virülens faktörleri memelinin bağışıklık sistemini geçtikten sonra vücudun birçok bölgesine yayılır ve konak yangısal yanıtının neden olduğu doku hasarına sebep olur (Strle ve ark., 2009).

## 2.5. Vektör Keneler

Keneler dünya çapında en önemli kan emici artropodlar arasında bulunmaktadır. İnsanlarda, evcil hayvanlarda ve vahşi yaşamda ölüme ve hastalığa neden olan çeşitli patojenleri taşırlar. Keneler konak seçiminde, omurgalı hayvanın kanını emme, çiftleşme, hayatta kalma ve üremeyi kolaylaştırmak için çeşitli morfolojik özelliklere ve fizyolojik mekanizmalara sahiptirler (Anderson ve Magnarelli, 2008). Türkiye'nin kene faunası temelde 2 aileye ait, 10 cins ve 32 türden oluşmaktadır. Bu türler memeliler, sürüngenler ve kuşları enfeste etmektedir (Aydın ve Bakırcı, 2007).

Türkiye'de özellikle Karadeniz bölgesinde kene faunasının çok zengin olduğu ve pek çok kene türünün bulunduğu tespit edilmiştir. Bu türler *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis spp.* (*H. punctata*, *H. sulcata*, *H. concinna*, *H. parva*), *Hyalomma spp.* (*H. marginatum*, *H. anatolicum excavatum*, *H. detritum*), *Rhipicephalus spp.* (*R. bursa*, *R. turanicus*, *R. bursa*, *R. sanguineus* ve *R.(Boophilus) annulatus*)'tur (Açııcı ve Celep, 1997; Acici ve ark., 2008; Kar ve ark., 2013; Orkun ve ark., 2014).

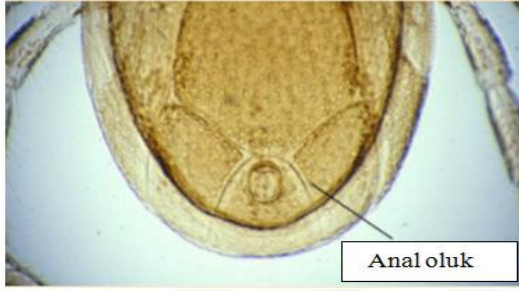
Keneler yaşam sürelerinin % 95'ini doğada geçirirler ve sadece kanla beslenirler. Isı ve nem konak arama ve bekleme sürelerini etkiler. Konak bulamadıkları durumlarda yavaş hareket ederler ve gelişimlerini yavaşlatırlar. Su kaybı konak arama süresini etkiler. Özellikle *Ixodes* türleri kuraklığa hassas oldukları için yüksek nemin olduğu ormanlıklarda yaygındır (Xu ve ark., 2003; Vatansever, 2008; Chomel, 2015).

*Borrelia* türlerini taşıyan vektör keneler Amerika'da *I. pacificus* (Postic ve ark., 1998; Rudenko ve ark., 2009c), *I. scapularis* (Postic ve ark., 1998), Avrupa'da *I. ricinus* (Postic ve ark., 1998; Richter ve ark., 2006; Margos ve ark., 2009), Japonya'da *I. ovatus* (Kawabata ve ark., 1993), *I. tanuki*, *I. turdus* (Fukunaga ve ark., 1996) ve Çin'de *I. ovatus* (Masuzawa ve ark., 2001)'tur.

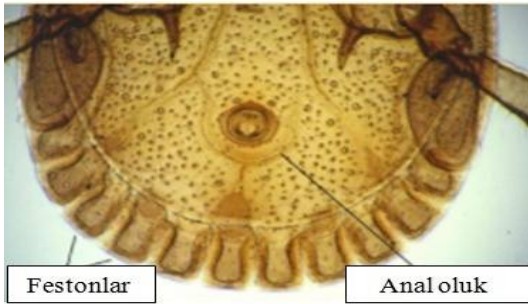
Türkiye'nin belli bölgelerinde yapılan çalışmalarda *Ixodes* türleri tarafından taşınan, Lyme hastalığı etkeni *B. burgdorferi*'nin yanı sıra Babesiosis etkeni *Babesia* spp. (Kalkan ve ark., 2010), Anaplasmosis etkeni *Anaplasma phagocytophilum* (Gokce ve ark., 2008), kene ensefaliti etkeni *Flaviviridae* (Ergünay ve ark., 2011) ve Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı virus'ünde (Tuncer ve ark., 2014) taşıdığı tespit edilmiştir.

### 2.5.1. *Ixodes* Cinsi Kenelerin Tanımlanması

*Ixodidae* ailesine bağlı soylarda ayırım, kenelerin ağız organellerinin uzun ya da kısa olmasına ve anal oluğun önden veya arkadan kuşatmasına göre yapılmaktadır (Yukarı ve Eren, 2004). *Ixodes* cinsine ait üyelerin festonları yoktur ve anal oluk anüsü önden kuşatır (Şekil 3). *Ixodes* olmayan cinsler festonlara sahiptir ve anüsü arkadan kuşatan bir anal oluğa sahiptir (Şekil 4).



Şekil 3. *Ixodes* kene görünümü (<http://www.k-state.edu/parasitology/625tutorials/Tick02.html>)



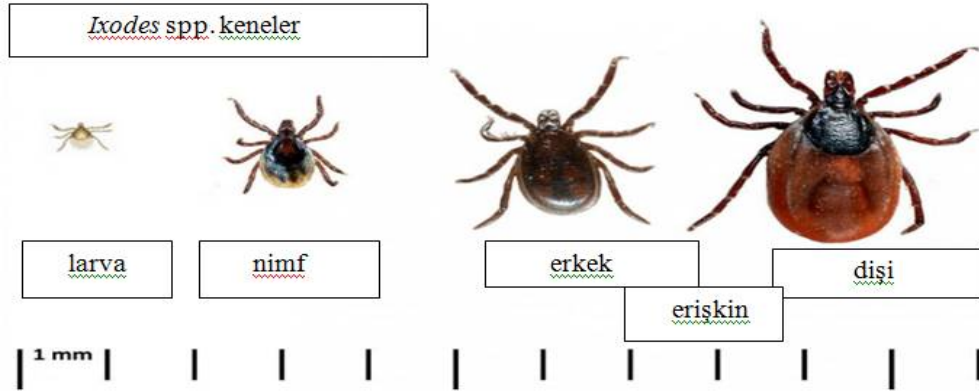
Şekil 4. *Ixodes* cinsine ait olmayan kene görünümü

(<http://www.k-state.edu/parasitology/625tutorials/Tick02.html>)

### 2.5.2. Yaşam Döngüsü

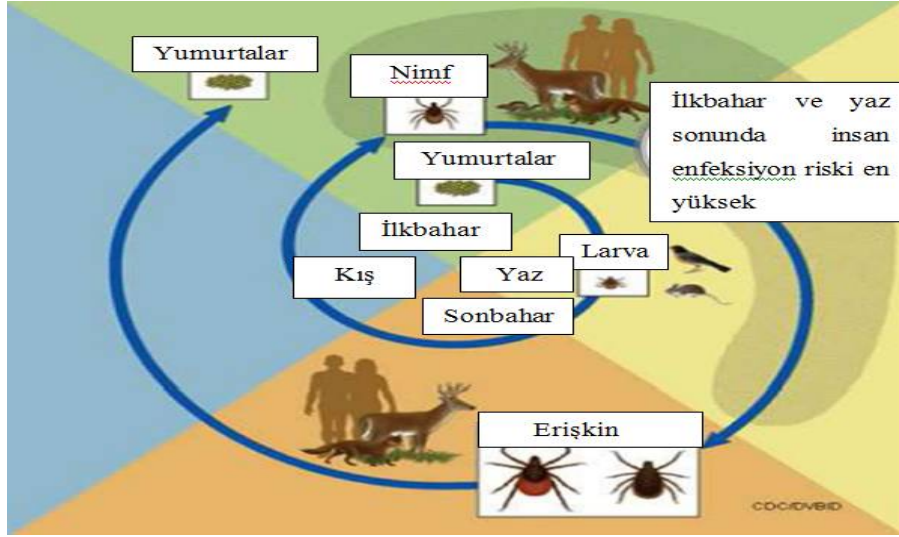
*Ixodes* cinsi kenelerin gelişim aşamaları larva, nimf ve erişkin olmak üzere üç safhadan oluşmaktadır. *Ixodes* cinsi keneleri yaşam siklusundaki bu üç safhayı üç ayrı konakta geçirirler. Larvadaki nimfe, nimften erişkinine iki gömlek değiştirirler (Şekil 5) (Aktaş, 2008).





Şekil 5. *Ixodes* spp. kenelerin gelişim aşamaları (<http://www.merckvetmanual.com/generalized-conditions/lyme-borrelia/overview-of-lyme-borrelia>)

Yaşam döngüsü erkek kenenin dişi keneye çiftleşmesiyle başlar (Aktaş, 2008). Doymuş kene konağı terk eder ve ilkbahar mevsiminde yumurtlar. Yumurtalar yaz mevsiminde larvalara dönüşür. Larvalar yazın *B. burgdorferi* ile enfekte konakçılar üzerinde de beslenir. *Ixodes* cinsi kenelerin rezervuarları Kuzey Amerika'da *Peromyscus leucopus* (beyaz ayaklı fare) (Güner ve ark., 2005), Avrupa'da *Apodemus (Ap.) sylvaticus* (tahta faresi), *Ap. Flavicollis* (sarı boyunlu fare), *Clethrionomys glareolus* (bank vole) (Hu ve ark., 1997; Gern ve ark., 1998) gibi küçük kemiricilerdir. Kış boyunca ve baharı takiben infeksiyonu bulaştırma yönünden en olası aşamada yani nimf aşamasında ortalığa çıkar (Nadelman ve ark., 2001). Nimfler sonbaharda ergin olmak için gömlek değiştirir. Ergin dişiler genellikle kışı koyun veya geyik gibi hayvanlara tutunarak (dolayısıyla koyun veya geyik kenesi olarak adlandırılırlar) geçirirler, ilkbaharı takiben keneler tam doymuş hale geldikten ve çiftleştikten sonra toprağa düşer ve ölmeden önce yumurtlarlar ve larvalar yumurtadan çıkar (Şekil 6). Larvalar Ağustos ve Ekim aylarında, nimfler Mayıs ve Haziran ayları boyunca, ergin keneler de bahar aylarında aktiftir (Marques, 2010; Murray ve Shapiro, 2010; Kar ve ark., 2013; Özdemir ve İnce, 2014). Larvalar 3 çift ayaklıdır, gömlek değiştirdikten sonra, nimfe dönüşür ve 4 çift ayaklı olur. Nimflerin de genital organları larvalarda olduğu gibi gelişmemiştir. Aç nimfler kan emer doyar ve gömlek değiştirdikten sonra kan emmeye hazır aç olgun hale gelir. Dişi kenelerin kan emmesi esnasında, erkekler ve dişiler çiftleşirler (Yukarı ve Eren, 2004).



Şekil 6. Kenelerin Yaşam döngüsü(murray ve shapiro 2010)

Evcil hayvanların kulak kepçesi içinde ve dışında, boyun altında, karın, anal ve perianal bölgeler ile sırt ve kuyruk üzerinde bulunurlar (Yukarı ve Eren, 2004). *I. ricinus* dişi kenelerinin sığırlarda yapışmayı tercih ettiği yerler perineum, kasık ve koltuk altıdır (Walker ve ark., 2007).

## 2.6. Epidemiyoloji

Lyme hastalığının enzootik yaşam döngüsünde insanlar ve evcil hayvanlar yer almamakta olup, etken *B. burgdorferi sensu lato* *Ixodes* cinsi keneler tarafından insanlara rastlantısal olarak aktarılmaktadır. İnsanlarda genel olarak Lyme hastalığına neden olan 3 tür vardır. Bunlar; *B. burgdorferi*, *B. garinii* ve *B. afzelii*'dir. Avrupa'da bu üç tür, Afrika'da *B. garinii* ve *B. afzelii*, Amerika'da sadece *B. burgdorferi* gözlenmektedir. *B. garinii* ve *B. afzelii* antijenik olarak *B. burgdorferi*'den farklıdır. Bu farklılıklar coğrafi bölgelerde farklı klinik belirtilerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Marques, 2010).

Hastalığın yayılışı kenelerin dağılımıyla ilişkilidir (Talleklint ve Jaenson, 1996). *B. burgdorferi* etkenini taşıyan vektörler ve hastalığın görülme sıklığında coğrafi dağılım etkili olmaktadır (Marques, 2010; Chomel, 2015). Vektör kene başlıca ormanlık alan, parklar gibi nemli doğal ortamlarda ve aynı zamanda deniz iklimlerinde otlar üzerinde daha sıklıkla yaşamını sürdürmektedir (İnci ve Düzlü, 2009; Aslan Başbulut ve ark., 2012; İnci ve ark., 2013). Yürütülen epidemiyolojik çalışmalarda keneler insanlar, sığırlar, rezervuar fareler veya sahada otların üzerinden bayrak metodu yoluyla toplanmaktadır (Falco ve Fish, 1992; Gern ve Falco, 2000).

Lyme hastalığının 30'dan fazla ülkede gözleendiği bildirilmiş olup, Kuzey Amerika, Avrupa ve Türkiye'deki epidemiyolojisi ile ilgili bilgiler aşığında sunulmaktadır.

### **2.6.1. Kuzey Amerika**

Lyme hastalığının yaygın olarak görüldüğü Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Kanada'da en önemli vektör kaynaklı hastalıklardandır. ABD'de son yıllara kadar Sağlık Bakanlığı'na bağlı CDC (Center for Diseases Control and Prevention; Hastalıkların Kontrolü ve Korunma Merkezi) tarafından tutulan kayıtlarda yıllık vaka sayısı her yıl artış göstererek 30 000 olarak bildirilmiştir. Ancak 2011 yılında yürütölen bir serosörveyans çalışması sonucuna göre her yıl ortaya çıkan Lyme hastalığı vaka sayısı 300 000 olarak güncellenmiştir (Kuehn, 2013; CDC, 2017). Geyiklerin önemli bir rezervuar olarak rol oynadığı vakaların çoğunluğu ülkenin kuzey doğusunda bildirilmiştir.

Köpeklerde hastalığın coğrafi dağılımı da insanlardaki dağılım ile aynıdır. Köpeklerde anti-*B. burgdorferi* antikorlarına dayalı olarak elde edilen pozitif sonuçların bölgelere göre % dağılımları incelendiğinde en yüksek yüzdenin kuzey doğu bölgesinde saptandığı ve insan vakalarıyla uyumlu olduğı gösterilmiştir (Smith ve ark., 2012; Little ve ark., 2014).

### **2.6.2. Avrupa**

Avrupa'da yılda yaklaşık 65 500 Lyme hastalığı bildirilmiştir (Rizzoli ve ark.,2011). Hastalık, *I. ricinus* türü kenelerin bulunduğı bölgelerde dağılım göstermektedir (Rizzoli ve ark.,2011). Avrupa'da bu kene türü kuzey Türkiye ve Tunus'un Atlas Dağları'ndan başlayarak, kuzey batıya doğru kuzey İsveç'e kadar dağılım göstermektedir (Chomel, 2015). Enfekte kene yoğunluğu yüksek rakımlarda azalmaktadır. Lyme hastalığı insidensi Orta Avrupa'da en yüksek, kuzeye ve güneye gittikçe insidensin düştüğü gözlenir (Rauter ve Hartung, 2005; Chomel, 2015).

### **2.6.3. Türkiye**

*Ixodes* spp. en fazla Türkiye'nin kuzeyinde Karadeniz bölgesinde görölmektedir. İklimi ılıman ve nemli olan bu bölgede yağışın çok ve ormanın yoğun olması bu duruma zemin hazırlamaktadır (Açııcı ve Celep., 1997; Aydın ve Bakırcı, 2007; Acici ve ark., 2008; Kar ve ark., 2013; Orkun ve ark., 2014).

Türkiye'de Lyme hastalığı insanlarda ilk kez 1990 yılında bildirilmiştir (Çakır ve ark., 1990; Köksal ve ark., 1990). İlk *Borrelia* izolasyonu Karadeniz bölgesinden (Ünye-Bartın) toplanan *I. ricinus* türü kenelerden gerçekleştirilmiştir (Polat ve ark., 1998). Polat ve

ark. (2010) sonraki yıllarda Türkiye’de ilk defa Lyme hastalarından etkeni üretmişlerdir (Polat ve ark., 2010). Lyme hastalığının görülme sıklığı; fare, keçi, geyik, köpek gibi hayvanlarla temasın sık olduğu kırsal ve yüksek rakımlı ormanlık bölgelerde daha fazladır. Çünkü bu hayvanlar *Ixodes* cinsi kenelerin rezervuarı durumundadır. Lyme hastalığı için yüksek riskli bölgeler rezervuar hayvanların bulunduğu yerler olup, hayvancılık ve tarımla uğraşan insanlar yüksek risk altındadır (Mutlu ve ark., 1995). Ülkemizin farklı bölgelerinde insanlarda yürütülen serolojik çalışmalar sonucunda elde edilen Lyme hastalığı seropozitiflikleri riskli gruplarda %3.3-35.9 arasında bulunmuştur (Gökfıdan, 1992; Mutlu ve ark., 1995; Göral ve ark., 1997; Güner ve ark., 2003; Aydın ve Bakırcı, 2007; Aslan Başbulut ve ark., 2012). Bu çalışmalar ülkemizde Lyme hastalığının varlığını göstermektedir. Orta Karadeniz Bölgesi’nde hayvanlarda Lyme borreliosis, serolojik çalışmalarla sütçü sığırlarda, farelerde, köpeklerde ve atlarda tespit edilmiştir (İzgür ve ark., 1997; Güner ve ark., 2005; Bhide ve ark., 2008). Ayrıca, Türkiye’nin kuzeyinde kenelerde *B. burgdorferi* sensu lato varlığı farklı çalışmalarla belirlenmiştir (Güneş ve ark., 2007; Şen ve ark., 2011; Kar ve ark., 2013).

## **2.7. Lyme Hastalığına Bağlı Klinik Belirtiler**

### **2.7.1. İnsanlarda Klinik belirtiler**

Lyme hastalığı insanlarda çoğunlukla kene ısırığının ardından deride eritema migransla ortaya çıkar, başlangıçta grip benzeri semptomlarla karakterize, ateş, yorgunluk, baş ağrısı, kas ve eklem ağrıları ve enfeksiyonun ilerlediği dönemlerde ise kardiyak, nörolojik, romatizmal hastalıklar tarzında gözlenmektedir (Busmich, 1994; Bhide ve ark., 2008). Kene ısırığı öyküsünden kısa bir süre sonra Lyme hastalığı vakalarının %60-80’inde deride eritema migrans lezyonları gözlenir. Ancak insanlarda hastaların yalnızca %30’unun kene ile ısırıldığını bildirmeleri ve derideki başlangıç lezyonunun böcek ısırığı veya alerjik kızarıklık ile karıştırılabilmesi hastalığın teşhisinde erken dönemde farkındalık açısından en büyük engeli oluşturmaktadır. Kene ısırığından birkaç hafta veya aylar sonra etken türüne bağlı olarak insanlarda gözlenen klinik belirtiler de değişiklik göstermektedir. ABD’de Lyme artiritine nöroborreliyoz’dan çok daha sık rastlanmaktadır. Avrupa’da ise Nöroborreliyoz, Borreliyal Lymphocytoma cutis ve acrodermatitis chronica atrophicans yaygın olarak, kronik artirit ise gözlenmektedir (Chomel, 2015).

### 2.7.2. Evcil Hayvanlarda Klinik belirtiler

*B. burgdorferi* köpeklerde, atlarda ve sığırlarda belirgin klinik bulgulara neden olmaktadır (Busmich, 1994; Higgins, 2004; Bhide ve ark., 2008). *B. burgdorferi*'ye maruz kalan evcil hayvanların büyük bir yüzdesi infekte olmalarına karşın klinik semptom göstermeyebilir. Evcil hayvanlarda gözlenen topallık ve eklem şişmesi baskın klinik belirtilerdir. Diğer klinik bulgulardan miyokardit, ensefalit, böbrek hastalığı, abort, uyuşukluk ve davranış değişiklikleri daha az sıklıkla bildirilmektedir (Bushmich, 1994).

Köpeklerde hastalık tek veya farklı ekstremitelerde topallık, eklemlerde şişkinlik, ateş ve depresif tutum olarak akut bir başlangıç şeklinde ortaya çıkar. Daha seyrek olarak davranış bozuklukları, nöbetler, ensefalit, renal disfonksiyon, kardiak aritmi ve üreme bozuklukları görülür (Scotarczak ve Wodecko., 2003; Bhide ve ark., 2008). Köpekler evcil hayvanlar arasında Lyme hastalığı araştırmalarda en uygun hayvan modelidir (Krupka ve Straubinger., 2010).

Atlarda *B. burgdorferi sensu lato* infeksiyonu abort, laminit ve kilo kaybına yol açmaktadır. Ayrıca atlarda nörolojik belirtiler (baş eğme, yutma güçlüğü, amaçsız dolaşma) ve körlük Lyme hastalığıyla ilişkili ensefalitin bir sonucu olarak tespit edilmiştir (Busmich, 1994; Scotarczak ve Wodecko, 2003; Higgins, 2004; Bhide ve ark., 2008).

Sığırlarda akut lyme borrelyozu; genellikle ateş, sertlik, eklemlerde şişkinlik ve süt veriminde azalma ile kendini göstermektedir. Kronik kilo kaybı, laminit ve abort da gözlenebilen diğer klinik belirtilerdir (Parker ve White, 1992; Busmich, 1994; İzgür ve ark., 1997; Higgins, 2004).

### 2.8. Tanı

Lyme hastalığının insan ve hayvanlarda teşhisinde serolojik testler ön plandadır. İki testten oluşan “iki aşamalı yaklaşım” temelli testler insan hekimliğinde Lyme hastalığı'nın teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Rizzoli ve ark., 2011). İlk aşamada enzim immunoassay (ELISA) veya immun floresan (IFA) testi uygulanır. Son dönemde özellikle anti-*B. burgdorferi* Immunoglobulin M (Ig M) ve IgG ELISA testi insanlarda Lyme hastalığının tanısında kullanılmaktadır. İnsanlarda erken dönemde hastalığın teşhisi için IgM ELISA kullanılırken, köpeklerde yalnızca anti-*Borrelia burgdorferi* IgG antikorlarının saptanmasına yönelik testler uygulanmaktadır (Krupka ve Straubinger, 2010; Rizzoli ve ark., 2011). ELISA testlerinin büyük bir çoğunluğu bakteri lizatına dayalı olup, spesifitesi düşüktür. ELISA testinde pozitif bulunan örnekler doğrulama amaçlı olarak Western Blot testi ile analiz edilir (CDC, 2017). Bu testte *B. burgdorferi sensu lato*'ya ait immuno-dominant

proteinlerin bazıları (örn: flagellin, BmpA, OspA, OspB, OspC vb.) nitroselüloz membrana aktarılarak sonuçlar spesifik hale getirilmiştir. Son yıllarda, VlsE proteininin bir kısmını temsil eden sentetik bir peptid olan C6'ya dayalı ELISA yöntemi de ikili testin yerine yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Krupka ve Straubinger, 2010).

Hastalık etkeninin kültürde üretilmesi 6-8 haftada tamamlanmakta ve kültürün sensitivitesi düşüktür. Lyme borreliozlu hastaların dokularında ve vücut sıvılarında *B. burgdorferi*'nin az sayıda olması organizmanın kültürle direkt teşhisinde temel problemdir. Bu nedenle PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu) ile belirli genlerin çoğaltılması bu soruna umut veren bir çözüm olarak görülmektedir. Tanıda hedef DNA dizisi, *B. burgdorferi* türüne özgül olmalı, fakat aynı zamanda tüm *B. burgdorferi* suşlarını da kapsamalıdır (Lebech ve Hansen, 1992). DNA dizisinin belirlenmesinde Maxam ve Gilbert tarafından geliştirilmiş kimyasal kesim protokolü (Maxam ve Gilbert, 1977) ve Sanger tarafından geliştirilmiş DNA replikasyonunun doğal sürecine benzeyen Sanger metodu yer almaktadır. Dideoksi veya zincir sonlandırma metodu adı da verilen Sanger metodu DNA'da var olan normal dNTP'lere ek olarak ddNTP'nin kullanımına dayanmaktadır (Sanger ve ark., 1977).

Tanıda en fazla kullanılan genlerden olan *fla* geni flagellin proteinini kodlayan gen olup, dizi analizi sonucunda bu gende Amerika ve Avrupa suşları arasında sadece birkaç nükleotid farklılığı olduğu ve bu genin farklı *B. burgdorferi* suşları arasında yüksek oranda korunduğu belirlenmiştir (Wallich ve ark., 1990; Lebech ve Hansen, 1992). Lyme hastalığı etkenini tanımlamaya yönelik filogenetik çalışmalarda bakteriye ait *16S ribozomal RNA*'yı kodlayan *16S ribozomal DNA (16S rDNA)*'nın saptanması yaygın olarak kullanılmakta olup, *B. burgdorferi sensu lato* suşlarında mutasyon oranı düşük olduğu için genel olarak korunmuş bir bölgedir (Le Fleche ve ark., 1997).

*B. burgdorferi sensu lato*'ya ait her tür kendi içerisinde ve birbirleri arasındaki genetik değişkenlik, patojenite, klinik tablo, tanı yöntemleri ve ekolojisi bakımından farklılıklar göstermektedir. Farklı gen türlerinin dağılımı farklı coğrafik alanda değişiklik gösterir. Son yıllarda farklı *Borrelia* suşlarının sınıflandırılması ve direkt tanımlanması için yeni moleküler testler geliştirilmiştir (Derdakova ve Lencakova, 2005).

## 2.9. Kontrol

Lyme hastalığını önlemek için kene ısırığı riskini azaltmak en önemli stratejidir (Vazquez ve ark., 2008). Bu nedenle, insanlar ve hayvanların kenelere maruz kalmalarını engellemek gerekmektedir. Kene ile enfeste alanlara girilmemesi, kene popülasyonunun yoğun olduğu bu tip yerlerin ziyareti sırasında ise uzun kollu, uzun paçalı kıyafetlerin

giyilmesi paçaların çorap içerisine sokulması kenelerle karşılaşma riskini en aza indirmektedir. Ayrıca insanlarda kene kovucuların hayvanlar için ise akarisitlerin kullanılması keneleri uzak tutmakta faydalıdır. İnsanlar kendilerini ve sahibi olduğu hayvanları sürekli kene yönünden gözden geçirmeli ve en kısa sürede bu keneleri uzaklaştırmalıdır (Barbour ve Fish, 1993; Kazmierczak ve Sorhage, 1993). Kene ısırığından sonra 48 saat içerisinde kenelerin uzaklaştırılması *B. burgdorferi*'nin bulaştırılması riskini belirgin bir şekilde azaltmaktadır (Shih ve Spielman, 1993).

İnsanlarda Lyme hastalığına karşı aşı uygulanmamaktadır. Köpeklerde inaktif bakterin aşılarda veya rekombinant OspA protein aşılarda kullanılmaktadır (Chomel, 2015).

### **2.10. Tedavi**

İnsanlarda Lyme hastalığının tedavisi için 10-21 günlük doksisiklin veya amoksisilin oral yolla uygulanır. Erken dönemde tanı konulamamış ise intravenöz yolla seftriakson uygulanır (Barbour ve Fish, 1993). Lyme hastalığı olan köpeklerde, erythema migrans gözlenmediği için hastalığın dönemini tahmin etmek zordur. Veteriner hekim hastalığın çeşitli dokulara yayıldığı ilerlemiş dönemde olduğunu farzederek hastayı tedavi eder (Krupka ve Straubinger, 2010). Semptom gösteren köpeklerde oral yolla 30 gün süreyle doksisiklin veya amoksisilin verilir.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kenelerin Toplanması

2015 yılı Mayıs ve Haziran aylarında Samsun ili Tekkeköy ilçesi Sanayi mahallesi ile Yeşilyurt ve Yağbasan orman köyleri, Ordu ili Ünye ve Fatsa ilçelerine (Şekil 7) ait orman köylerinde sığırlara tutunan 369 adet kene toplandı.



Şekil 7. Sığırlardan kenelerin toplandığı Samsun ili Tekkeköy ilçesi ve Ordu ili Ünye ve Fatsa ilçeleri haritası ([http://www.uyduharita.org/wp-content/uploads/samsun\\_sahil\\_haritasi.bmp](http://www.uyduharita.org/wp-content/uploads/samsun_sahil_haritasi.bmp))

Sığırlardan kene toplanması amacıyla öncelikle köy muhtarlarından ve köylülerden izin alındı. Bölgede genel olarak sığır ırklarının Jersey ve Simental olduğu gözlemlendi. Ahırların temiz oldukları ve sığırların da bakıcıları tarafından oldukça temiz tutuldukları gözlemlendi. Ahır çevresinde köpek ve kedi besledikleri de belirlendi. Sığırlar ahırda veya hayvan sahibi tarafından hayvanlar dışarıya çıkartılarak klinik semptomlar yönünden incelendi. Her bir hayvan sahibi tarafından tutularak rahatlatıldı ve keneler hiçbir şekilde hayvanlara rahatsızlık verilmeden pens kullanılarak toplandı. Özellikle, hayvanların aksillar ve kasık bölgelerinde buldukları belirlendi. Kenelerin toplama sırasında zarar görmemeleri ve parçalanmamalarına özen gösterildi. Keneler sığırlardan dikkatli bir şekilde pens yardımıyla parçalamadan alındı ve %70 etanol içeren kapaklı falkon tüplere toplandı.



### 3.1.2. Kenelerin Tanımlanması

Kenelerin tanımlanması için steril bir petri kabına iki tarafı yapışkan bir bant yapıştırıldı. Her bir kene pens ile alınarak bandın üzerine yerleştirildi. Kenelere ait morfolojik özellikler dikkate alınarak stereomikroskop (Nikon SMZ 1500) altında tür düzeyinde ayırım yapıldı. Laboratuvar ortamında keneler ile çalışırken, infeksiyöz etkenler ile çalışılırken kullanılan FFP2 maskeler takıldı (Walker ve ark., 2007). Kenelerin tanımlanmasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi, Prof. Dr. Mustafa AÇICI'dan yardım alındı.

Kenelerin tanımlanmasında dikkate alınan özellikler: *Ixodes* dişi kenelerin ağız organellerinin uzun olması ve diğer uzun ağız bölümlü olan cinslerden *Amblyomma* ve *Hyalomma*'dan ayırt edilmesinde bu iki cinsin aksine *Ixodes* kenelerin koyu kahverengiden siyaha değişen vücuda ve bacaklara sahip olmasıdır. *Ixodes* kenelerin gözleri yoktur. *Ixodes* cinsi diğer tüm ixodid kenelerden (Metastrata) ayrı olan büyük ixodid keneler (Prostrata) grubunu oluşturur. Bu cinsin bariz bir özelliği, tüm metastriate kenelerinde anal olukanüsü arkadan kuşatmasına karşın, bu cinste önden kuşatmaktadır. Bu karakteristik özellik dişi *Ixodes* cinsinde en belirgindir, erkeklerde anal oluk büyük düz ventral plakların arasından geçmektedir (Walker ve ark., 2007). *Ixodes* cinsi erkek keneler dişilerden çok küçüktür ve uzun palpli kenelerdir. Bu çalışmada toplanan erkek keneler, çiftleşme durumunda dişi kenelerin üzerine tutunan boyut olarak küçük kenelerdir. Keneler tanımlandıktan sonra DNA ekstraksiyonu yapılmaya kadar +4°C'de %70'lik alkol içerisinde bekletildi.

### 3.1.3. Örnek Toplanan İlçelerin Coğrafi Konumu

Tekkeköy ilçesinde Yeşilyurt köyü enlem: 41.121°, boylam: 36.539°, rakım: 160 m, Yağbasan köyü enlem: 41.117°, boylam: 36.559°, rakım: 105 m dir. Ordu iline ait Ünye ilçesi enlem: 41.12°, boylam: 37.28°, rakım: 286 m, Fatsa ilçesi enlem: 41.02°, boylam: 37.50° dir (www.netkayit.com).

### 3.1.4. Meteorolojik Veriler

2015 yılı Mayıs, Haziran aylarına ait aylık nem, nispi nem, sıcaklık, rüzgar hızı ve toplam yağış değerlerini içeren veriler Meteoroloji 10. Bölge Müdürlüğü - Samsun'dan temin edildi.

### **3.1.5. Kullanılan malzemeler**

#### **DNA Ekstraksiyon Kiti**

Toplanan kenelerden ekstraksiyon için ticari kit DNAeasy Blood&Tissue kit (Qiagen) kullanıldı.

#### **PZR Tamponları**

PZR karışımında yer alan tamponlar, *Taq* DNA polymerase, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10X Standart *Taq* (Mg-free) reaksiyon tamponu, (10 mM) dNTP (deoksिनुकлеотид trifosfat) set'tir.

#### **Jel Yükleme Tamponu, 1X TBE buffer**

Hazır halde bulunan 10X hacmindeki TBE buffer solusyonundan agaroz jel hazırlanmasında ve jel elektroforezinde kullanılmak üzere 1X hacminde TBE buffer hazırlandı.

#### **Agaroz Jel**

PZR ürünlerinin belirlenmesi amacıyla agaroz jel hazırlandı. Erlenmayer içerisine 100 ml 1X TBE solusyonundan% 1 veya 1,5 oranında agaroz hazırlandı. Bu amaçla, 100 ml 1X TBE solusyonuna konsantrasyona bağlı olarak 1 veya 1,5 g agaroz ilave edildikten sonra, mikrodalga fırında homojen hale gelinceye kadar eritildi. Ardından sıvı hale gelen agaroz ılıştırıldı ve etidium bromid'ten 0,5 µg/ml ilave edilerek homojen olması için yavaşça karıştırıldı. Elektroforez tankına yerleştirilen aparata döküldü ve jel oluşumu için beklendi. DNA dizi analizi için DNA örneklerinin jelden saflaştırılmaları amacıyla Agarose B Low EEO kullanıldı.

#### **Örnek yükleme boyası (DNA gel Loading Dye) (6x)**

PZR ürünleri jele uygulanmadan önce 5 µl örneğe 1µl boya içerecek şekilde hazırlandı.

#### **Belirteçler (DNA Ladder)**

Farklı boyutta DNA'ları belirlemeye yönelik, Gene Ruler DNA Ladder Mix #SM0333 ve küçük boyutlu DNA belirteci N3234S kullanıldı.

## Primerler

Kene ekstraktlarından elde edilen genomik DNA'dan PZR ile *flaB* geni ve *16SrDNA* geninin çoğaltılmasında kullanılan oligonükleotid primer dizileri belirlenerek ticari firmaya (BM Laboratuvarları) sentezlettirildi. Reaksiyonda kullanılan primerler Tablo 1'de gösterildi.

**Tablo 1.** *fla B* ve *16SrDNA*'nın çoğaltılmasında kullanılan forward (F) ve reverz (R) primerlere ait diziler

| Primerler          | Fragment uzunluğu (bç) | Baz Dizisi (5'-3')        | Referans            |
|--------------------|------------------------|---------------------------|---------------------|
| <i>flaB</i> -F     | 150                    | TTGCTGATCAAGCTCAATATAACCA | Ye ve ark., 2016    |
| <i>flaB</i> -R     | 150                    | TTGAGACCCTGAAAGTGATGC     | Ye ve ark., 2016    |
| <i>16S rDNA</i> -F | 1360                   | GCGAACGGGTGAGTAACG        | Güner ve ark., 2003 |
| <i>16S rDNA</i> -R | 1360                   | CCTCCCTTACGGGTTAGAA       | Güner ve ark., 2003 |

Liyofilize olarak alınan primerlerden steril bidistile su ile 100 pmol konsantrasyonda stok hazırlandı ve 100 µl hacminde tüplere paylaştırıldı. Primerler 20 pmol/µl konsantrasyonda kullanılmak üzere dilüe edildi.

## DNA Jel Elüsyon Kiti

QIAquick Gel Extraction Kiti PZR ürünlerinin agaroz jelden saflaştırılması amacıyla kullanıldı.

## Referans DNA'lar

*B. burgdorferi*, *B. afzelii* ve *B. garinii* türlerine ait sırasıyla B31, PKo ve PBi referans suşlarından elde edilen DNA'lar Prof. Dr. Utpal PAL (Maryland Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, ABD) tarafından sağlandı.

## 3.2. Metod

### 3.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Sığırlardan alınan kenelerden bol miktarda kan emmiş (doymuş) keneler çalışmaya dahil edilmedi. Doymuş büyük boyuttaki keneler emdikleri kandan dolayı kanda bulunan

komplementin Borreliaları öldürme ihtimali ve kandaki inhibitör maddelerin PZR ile analizini etkileme olasılığı bu kararın verilmesinde etkili olmuştur (Kurtenbach ve ark., 1998; Bhide ve ark., 2005). Çalışmaya erişkin küçük boyuttaki doymamış veya yarı doymuş keneler dahil edildi.

Boyut farklılıkları dikkate alınarak aynı boyutta olan kenelerin 2 veya 3 adedi bir araya getirilerek DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Keneler Güvenlik Seviyesi 2 olan steril çalışma kabini (ESCO) içerisinde steril petri kutusunda % 70'lik etanol içerisinde dekontamine edildi. İki defa steril distile su ile yıkandı ve kabin içerisinde havada kurutuldu. Kenelerden genomik DNA 'Qiagen DNeasy blood and tissue kit' kullanılarak üretici firmanın direktiflerine uyularak elde edildi. Buna göre, ekstraksiyon kitinde bulunan tampon 1 steril tüpün içerisine ilave edildi ve keneler bu tamponun içerisinde bir müddet bekletildikten sonra vortekslendi. Daha sonra yine steril petri içerisine çıkartılan keneler her aşamada alkolden geçirilerek distile sudan geçirilen bistüri ile parçalara ayrıldı. Parçalanmış keneler kısa bir süre santrifüj edilerek tüpün dibine çöktürüldü. Tüplere 20 µl proteinaz K ilave edildi, vortekslendi ve su banyosunda 56°C'de dokular tümüyle lize oluncaya kadar en az 3 saat bekletildi. Tüpler 15 saniye vortekslendi ve örneklere 200 µl tampon 2 ilave edilerek vortekslendi. Tüpler 70°C'de 10 dakika inkübe edildi ve vortekslendi. Daha sonra, 230µl etanol ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı ve örnekler toplama tüplerine (2 ml) yerleştirilmiş olan DNeasy Mini spin kolonlarına uygulandı. 6000xg'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi. Kolondan alta geçen sıvı toplama tüpü ile birlikte atıldı. Spin kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve 500 µl yıkama tamponu 1 ilave edildi ve 6000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolondan alta geçen sıvı toplama tüpü ile birlikte atıldı. Yeni bir tüpe yerleştirilen kolona 500 µl yıkama tamponu 2 ilave edildi ve 20 000xg'de (14 000 rpm) 3 dakika santrifüj edildi. Kolondan alta geçen sıvı toplama tüpü ile birlikte atıldı. DNA'nın eldesi aşamasında; kolon temiz 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve kenenin boyutuna bağlı olarak (35-100µl) elusyon tamponu konarak 1 dakika beklendi ve ardından 6000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Aynı işlem 2. defa tekrarlanarak farklı bir tüpte elusyon yapıldı. Genomik DNA örneklerinin konsantrasyonu nanodrop spektrofotometre (Thermo, NANODROP 2000 Spectrophometer) ile ng/µl değerinde ölçüldü. DNA örnekleri PZR'da kalıp DNA olarak kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

### **3.2.2. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)**

Her bir örnek için 25 µl PZR karışımı aşağıdaki Tablo 2'de sunulduğu şekilde hazırlandı.

**Tablo 2.** PZR içerikleri ve konsantrasyonları (Masuzawa ve ark., 2001)

| PZR Karışımı                                | 25 µl reaksiyon     | Final Konsantrasyon |
|---|---------------------|---------------------|
| 10X Standart Taq (Mg-free) reaksiyon buffer | 2.5 µl              | 1X                  |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub>                     | 2 µl                | 1,5-2 mM            |
| 10 mM dNTPs                                 | 0.5 µl              | 200 µM              |
| 20 µM Forward (F) Primer                    | 0.5 µl              | 10 µM               |
| 20 µM Reverz (R) Primer                     | 0.5 µl              | 10 µM               |
| Taq DNA Polimeraz 5 u/µl                    | 0.2 µl              | 1 unite             |
| Kalıp DNA                                   | 2.5 µl              | <1µg                |
| Distile su                                  | 25 µl'ye tamamlandı |                     |

Hazırlanan PZR karışımı PZR cihazına (Biometra-Tpersonal) yerleştirildi. Her bir hedef DNA'nın çoğaltılması amacıyla PZR cihazında Tablo 3'teki koşullar uygulandı.

**Tablo 3.** Hedef DNA'ların çoğaltılmasında uygulanan PZR koşulları (Güner ve ark., 2003; Ye ve ark., 2016)

| Primerler       | Denatürasyon | Primerlerin bağlanması | Primer uzaması                | Son Uzama    |
|-----------------|--------------|------------------------|-------------------------------|--------------|
| <i>flaB</i>     | 94 °C, 30 sn | 52 C°, 30 sn           | 72 C° 1 dk, 30 sn<br>35 döngü | 72 C°, 10 dk |
| <i>16S rDNA</i> | 94 °C, 30 sn | 60 C°, 30 sn           | 72 C° 1 dk, 30 sn<br>35 döngü | 72 C°, 10 dk |

### 3.2.3. PZR Ürünlerinin Analizi

PZR ürünleri agaroz jel elektroforeze uygulanarak incelendi. Bu amaçla, agaroz son konsantrasyonu %1,5 olacak şekilde TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) tamponuna ilave edildi. Mikrodalga fırında eritildi ve oda ısısında bekletildikten sonra ethidium bromide (EB) ilave edilerek yatay elektroforez tankına döküldü. Baş kısmına tarak yerleştirilerek kuyucukların oluşumu sağlandı. PZR ürünleri yükleme boyası (6x Loading dye) ile karıştırıldı ve kuyucuklara uygulandı. TBE tamponunda elektrik akımı altında yürütüldükten sonra transilluminator cihazında ultraviyole ışığı altında görüntülenen bantlar ticari standart DNA

karişimlarından hazırlanmış belirteçler (DNA Ladder) ve pozitif kontrol DNA'ları ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

### **3.2.4. PZR ile Çoğaltılan Hedef Gen Konsantrasyonunu Saptama**

#### **Limitinin Belirlenmesi**

PZR ile çoğaltılan hedef *flaB* geni ve *16S rDNA*'nın agaroz jelde görüntülenebilmesi için gerekli minimum DNA miktarı belirlendi. Bu amaçla, üç *Borrelia* türüne ait *B. burgdorferi* B31, *B. afzelii* PKo ve *B. garinii* PBi referans suşlarının nanodrop spektrofotometrede konsantrasyonları belirlendi. 10 katlı dilasyonları hazırlanmış genomik DNA'lar kalıp DNA olarak kullanılarak PZR ile hedef *flaB* geni ve *16S rDNA* çoğaltıldı. Agaroz jelde en son görüntünün elde edildiği DNA konsantrasyonu minimum DNA konsantrasyonu olarak tespit edildi.

### **3.2.5. DNA Örneklerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması**

QIAquick Gel Extraction kiti kullanılarak üretici firmanın direktiflerine göre agaroz jelden DNA'lar saflaştırıldı. Buna göre, PZR ürünleri agaroz jele uygulandı. Hedef DNA'lara ait bandlar temiz jilet ile agaroz jelden transilluminatör cihazında UV ışın altında kesilerek alındı. Saf hedef DNA'ları içeren jel, ağırlığının 3 katı hacimde tampon içerisinde 50°C ısıda tutularak eritildi. Karışıma bir jel hacmi isopropanol ilave edildi ve 750 µl spin kolona uygulandı, 17 900xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Membrandan geçen kısım atıldı. Kolona 500 µl tampon-1 eklendi ve 17 900xg'de 1 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Daha sonra, kolona 750 µl tampon-2 ilave edildi ve 17 900xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolonun membranına bağlanmış olan DNA 50 µl elusyon tamponu (10 mM Tris-Cl, pH:8,5) ilave edildikten sonra santrifüj edilerek temiz bir tüp içerisine alındı. DNA örneklerinin konsantrasyonu nanodrop spektrofotometre ile ng/µl değerinde ölçüldü. Saf DNA'lar -20°C'de saklandı.

### **3.2.6. Dizi Analizi**

Bu amaçla *flaB* ve *16S rDNA* genlerine dayalı PZR ile pozitif bulunan örneklerden 2'si ile 3 adet referans DNA'ya ait *flaB* geni PZR ile çoğaltıldı ve agaroz jel elektroforeze tabi tutuldu. DNA ladder ile karşılaştırarak referans DNA'lar ve örneklere ait PZR ürünlerine ait bandlar (yaklaşık 150 bp boyutunda) jelden kesilerek çıkartıldı ve hedef DNA'lar QIAquick Extraction Kit kullanılarak talimatlara uygun olarak saflaştırıldı. Örnekler dizi analizi için BM Laboratuvarlarına gönderildi. Dizi analizi verileri internetten NCBI (National Center for Biotechnology Information) ([www.ncbi.gov](http://www.ncbi.gov)) web sitesinde "nucleotid blast" bölümüne girildi ve DNA dizilerinin homoloji tayini yapıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Kenelerin Toplanması

2015 yılı Mayıs ve Haziran aylarında Samsun ili Tekkeköy ilçesi ve Ordu ili Ünye ve Fatsa ilçelerinde yetiştirilen sığırlardan 369 adet kene toplandı. Temmuz ve Ağustos aylarında aynı bölgelere gidildi. Ancak hayvanlarda kene olmadığı gözlemlendi ve köylülerin kene ile mücadele amacıyla hayvanlara kene ilacı kullandıkları öğrenildi. Bu nedenle bu aylarda sığırlardan kenetoplanamamıştır. Kenelerin toplandığı sığırların hiçbirinde klinik veya makroskopik olarak gözlemlenecek bir bulguya rastlanmadı.

### 4.2. Kenelerin Tanımlanması

Stereomikroskop altında incelenmeleri sonucunda kenelerin; *Ixodes ricinus*, *Hyalomma marginatum*, *Haemaphysalis parva*, *Rhicephalus turanicus*, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* türleri olduğu belirlendi (Tablo 4). Kenelerin 289 adetinin (% 78) *Ixodes ricinus* olduğu tespit edildi. Sığırlara tutunan ergin dişi *I. ricinus* türü kan emme durumlarına göre doymuş, yarı doymuş ve az miktarda kan emmiş olarak ayrıldı (Şekil 8). Samsun ili Tekkeköy ilçesinde 202 (% 79,5), Ordu ili Ünye ilçesinde 65 (% 76,4) ve Fatsa ilçesinde ise 22 kenenin (%73,3) *I. ricinus* olduğu saptandı.



A

B

Şekil 8. Sığırlardan toplanan *Ixodes* keneler. A. Dorsal görünüm, B. Ventral görünüm.

**Tablo 4.** Sığırlardan toplanan kene türlerinin dağılımı

| Kene Türleri                   | Yeşilyurt<br>(Tekkeköy) | Yağbasan<br>(Tekkeköy) | Tekkeköy<br>Sanayi<br>mahallesi | Fatsa     | Ünye       |
|--------------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------------|-----------|------------|
| <i>Ixodes ricinus</i>          | 145 (% 91)              | 57 (% 100)             |                                 | 22(%73,3) | 65 (%76,4) |
| Dişi                           | 124 (12 D)              | 48 (6 D)               |                                 | 20 (8D)   | 54         |
| Erkek                          | 21                      | 9                      |                                 | 2         | 9          |
| Nimf                           |                         |                        |                                 |           | 2          |
| <i>Haemaphysalis parva</i>     |                         |                        |                                 |           |            |
| Dişi                           |                         |                        |                                 | 3         |            |
| Erkek                          |                         |                        |                                 | 2         | 5          |
| <i>Hyalomma marginatum</i>     |                         |                        |                                 |           |            |
| Dişi                           | 1                       |                        | 1                               |           | 1          |
| Erkek                          |                         |                        |                                 |           |            |
| <i>Rhipicephalus turanicus</i> |                         |                        |                                 |           |            |
| Dişi                           | 10                      |                        | 17                              | 1         |            |
| Erkek                          | 3                       |                        | 20                              | 2         |            |
| <i>Rhipicephalus annulatus</i> |                         |                        |                                 |           |            |
| Dişi                           |                         |                        |                                 |           | 10         |
| Erkek                          |                         |                        |                                 |           | 3          |
| Nimf                           |                         |                        |                                 |           | 1          |
| Toplanan Kene Sayısı           | 159                     | 57                     | 38                              | 30        | 85         |

D: Doymuş kene

### 4.3. Örnek Toplanan İlçelerin Coğrafi Konumu

Tekkeköy ilçesinde Yeşilyurt köyü enlem: 41.121°, boylam: 36.539°, rakım: 160 m, Yağbasan köyü enlem: 41.117°, boylam: 36.559°, rakım: 105 m dir. Ordu iline ait Ünye ilçesi



enlem: 41.12°, boylam: 37.28°, rakım: 286 m, Fatsa ilçesi enlem: 41.02°, boylam: 37.50° dir (www.netkayit.com).

#### 4.4. Meteorolojik Veriler

2015 yılı Mayıs ve Haziran aylarına ait meteorolojik veriler Samsun Meteoroloji 10. Bölge Müdürlüğü'nden sağlandı (Tablo 5) (www.samsun.mgm.gov.tr). Meteorolojik veriler, aylık nem, nispi nem, sıcaklık ve toplam yağış değerlerini içermekte olup, kenelerin bölgede dağılımını etkileyen en önemli faktörlerdir.

**Tablo 5.** Meteorolojik veriler (www.samsun.mgm.gov.tr)

|                              | Tekkeköy |         | Ünye  |         | Fatsa |         |
|------------------------------|----------|---------|-------|---------|-------|---------|
| Meteoroloji verileri         | Mayıs    | Haziran | Mayıs | Haziran | Mayıs | Haziran |
| Aylık Maksimum Nem (%)       | 100      | 100     | 93    | 92      | 95    | 94      |
| Aylık Minimum Nem (%)        | 20       | 24      | 28    | 38      | 18    | 36      |
| Aylık Ortalama Nisbi Nem (%) | 84.5     | 88.3    | 77.2  | 74.5    | 74.7  | 75.9    |
| Aylık Maksimum Sıcaklık (°C) | 27.6     | 29.5    | 23.1  | 27.9    | 25.8  | 26.9    |
| Aylık Minimum Sıcaklık (°C)  | 7.1      | 13.1    | 7.6   | 14.5    | 6.1   | 13.0    |
| Aylık Ortalama Sıcaklık (°C) | 16.5     | 21      | 16.1  | 20.9    | 15.9  | 20.6    |
| Aylık Toplam Yağış (mm)      | 17.5     | 66.6    | 36    | 36.4    | 36.2  | 91.8    |

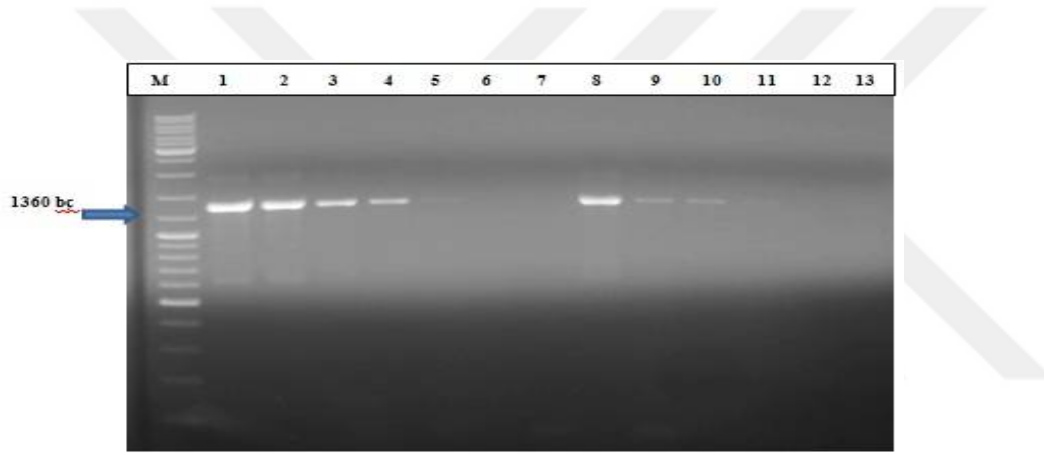
#### 4.5. DNA Ekstraksiyonu

Aynı bölgeden toplanan *I. ricinus* kenelerin boyutlarına göre 2-3 adeti biraraya getirildi ve DNA ekstraksiyonları yapıldı. 116 ekstraktın 84'ü Samsun ili Tekkeköy ilçesinde, 60'ı Yeşilyurt köyünde, 24'ü Yağbasan köyünde yetiştirilen sığırlardan toplanan kenelere aittir. Geriye kalan 32 ekstraktın 25'i Ordu'nun Ünye ilçesi, 7'si ise Fatsa ilçesine aittir.

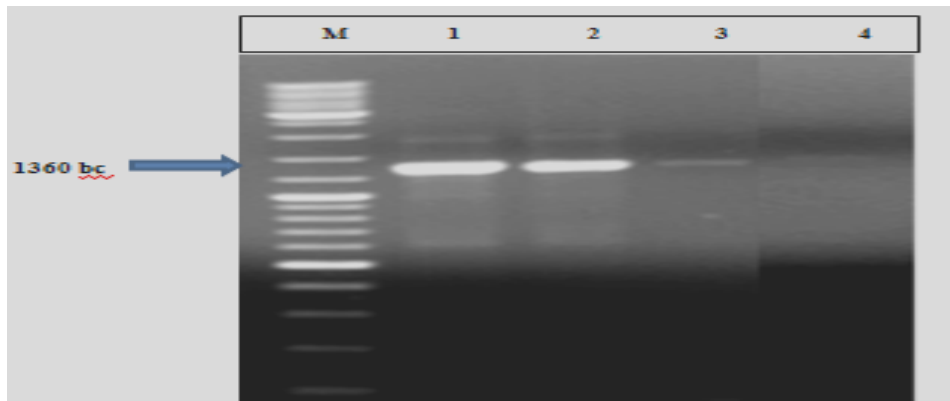
#### 4.6. Hedef DNA'ların Saptanma Limitinin Belirlenmesi

PZR ile hedef DNA'ların çoğaltılmasında kullanılabilecek minimum genomik DNA konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla referans suşDNA'ların 10 katlı dilusyonları hazırlandı. *B. burgdorferi* B31, *B. afzelii* PKo ve *B. garinii* PBi referans suşlarının DNA konsantrasyonları sırasıyla 120 µg/ml, 7 µg/ml ve 11 µg/ml olarak ölçüldü. PZR'da kalıp DNA'ların her bir konsantrasyonundan 2,5 µl uygulandı ve genomik DNA'ların en düşük konsantrasyonları sırasıyla; 1,2 pg/ml, 0,7 pg/ml ve 1,1 pg/ml olacak şekilde PZR karışımına ilave edildi.

PZR ile çoğaltılan *16S rDNA*'nın agaroz jelde görüldüğü en düşük genomik DNA konsantrasyonu B31 suşu için 12 pg/ml, PKo suşu için 7 pg/ml (Şekil 9) ve PBi suşu için 11 pg/ml olarak saptandı (Şekil 10). Deneyin tekrarlanması sonucunda aynı sonuçlar elde edildi.

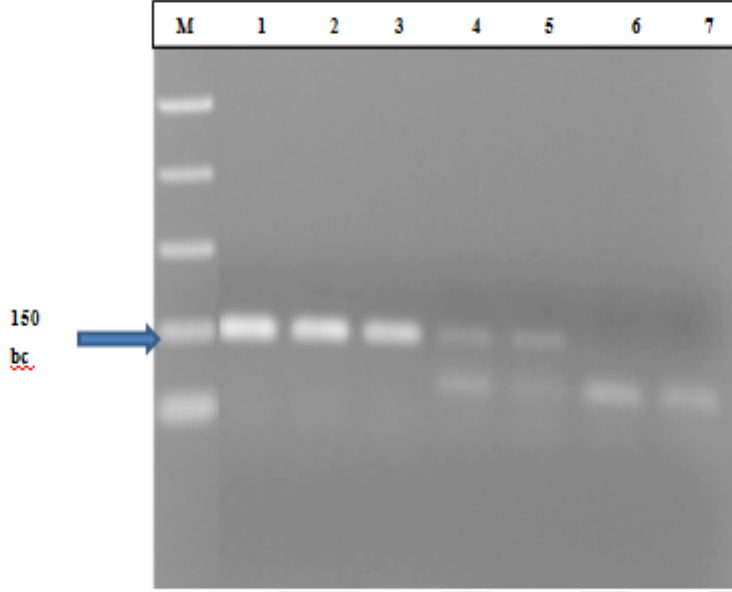


Şekil 9. *16S rDNA* genine dayalı PZR işlemi (1-7: *B. burgdorferi* B31 ve 8-13: *B. afzelii* PKosuşlarının DNA saptanma limiti, M: marker 100-10.000 bç)

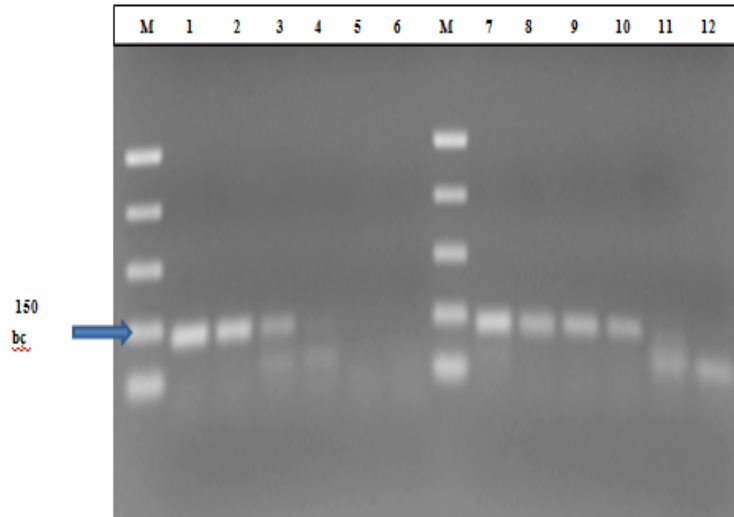


Şekil 10. *16S rDNA* genine dayalı PZR işlemi (1-4: *B. garinii* PBi suşu DNA saptanma limiti, M: marker 100-10.000 bç)

PZR ile çoğaltılan *flaB* geninin agaroz jelde saptanma limiti *16S rDNA* ile benzer şekilde, B31 suşu için 12 pg/ml (Şekil 11), PKo suşu için 7 pg/ml ve PBi suşu için 11 pg/ml olarak saptandı (Şekil 12). Deneyin tekrarlanması sonucunda aynı sonuçlar elde edildi.



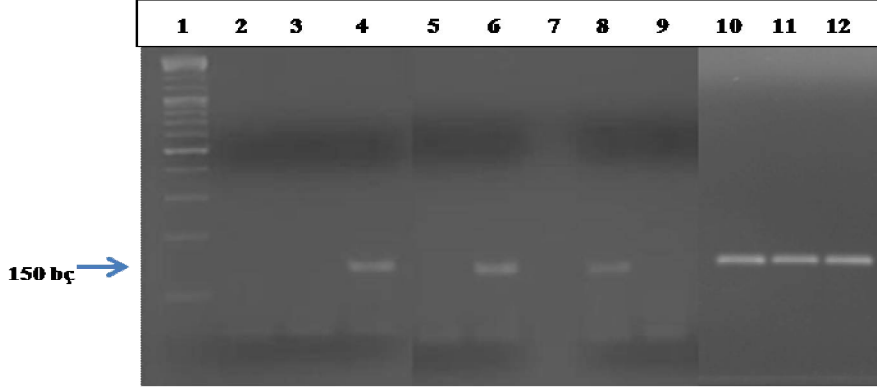
Şekil 11. *flaB* genine dayalı PZR (1-7: *B. burgdorferi* B31 suşuna ait DNA'nın agaroz jelde saptanma limiti, M: marker 50-766 bç)



Şekil 12. *flaB* genine dayalı PZR (1-6: *B. afzelii* PKove 7-12: *B. garinii* PBi suşlarına ait DNA'nın agaroz jelde saptanma limiti, M: marker 50-766 bç)

#### 4.7. *I. ricinus* Türü Kene Örneklerinde *B. burgdorferi* Varlığının Belirlenmesi

##### 4.7.1. Örneklerde *B. burgdorferi* *flaB* geninin PZR ile Saptanması

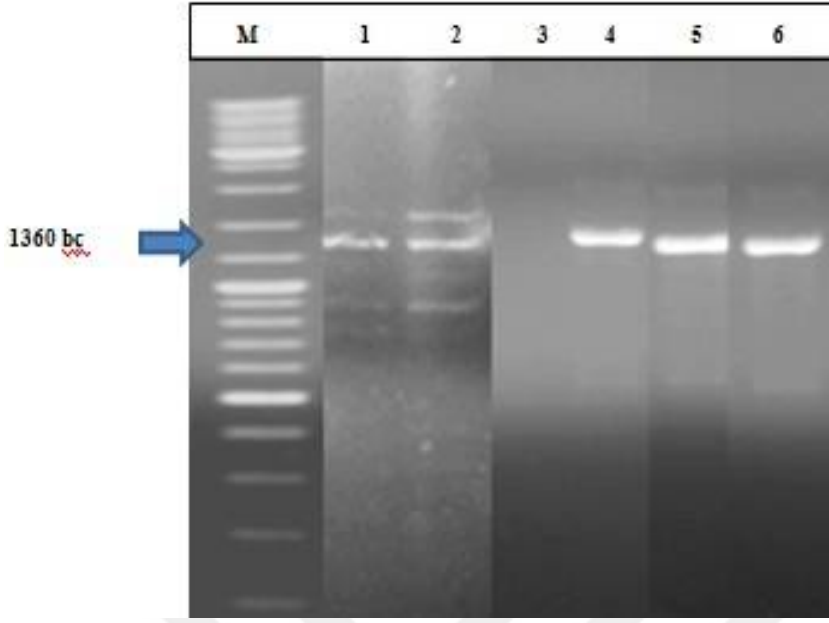


**Şekil 13.** *flaB* genini hedefleyen PZR ürünlerinin agaroz jelde görünümü. M: marker 100-10.000 bç, *flaB* geni temsili pozitif örnekler (4, 6 ve 8 numaralı kuyucuklar), *flaB* geni negatif örnekler (2,3, 5, 7, 9 numaralı kuyucuklar), pozitif kontrol; *B. burgdorferi* B31, *B. afzelii* PKo, *B. garinii* PBi referans suşları (sırasıyla 10,11 ve 12 numaralı kuyucuklar)

*B. burgdorferi* taşıyan *Ixodes* kenelerin tespit edilmesi amacıyla, *B. burgdorferi*'ye ait *flaB* geni varlığı PZR ile belirlendi. *Borrelia*'nın farklı referans türleri; *B. burgdorferi* B31, *B. afzelii* PKo ve *B. garinii* PBi suşlarına ait DNA'lar pozitif kontrol olarak kullanıldı ve testin optimizasyonu gerçekleştirildi. Referans DNA'larda yatay elektroforezde yaklaşık 150 bç boyutunda band gözlemlendi (Şekil 13). Sığırlardan toplanan kenelere ait DNA örneklerinde *fla* genini hedefleyen PZR yapıldı. Yüz elli bç boyutunda band gözlenen örnekler pozitif olarak belirlendi. Sonuçlar ekstrat ve kene bazında değerlendirildi. Kenelerden elde edilen 116 ekstraktan saflaştırılan genomik DNA'lar PZR'de kalıp olarak kullanıldığında, 20'sinin *flaB* geni yönünden pozitif olduğu (% 17,24) gözlemlendi. Kene bazında ise; çalışılan 289 adet *I. ricinus* türü kenenin 40'ında *flaB* geni yönünden pozitiflik (% 13,84) belirlendi ve bunların tümünün dişi olduğu gözlemlendi.

Pozitif DNA'ların bölgesel dağılımı değerlendirildiğinde; *flaB* geni yönünden, Samsun ili Tekkeköy ilçesi Yeşilyurt köyüne ait 60 ekstraktın 9'unda pozitiflik (% 15), Yağbasan köyüne ait 24 ekstraktın 4'ünde pozitiflik (% 16,66) ve Ordu ili Ünye ilçesine ait 25 ekstraktın 5'inde (% 20), Fatsa ilçesine ait 7 ekstraktın 2'sinde pozitiflik (% 28,57) saptandı (Tablo 6).

#### 4.7.2. Örneklerde *B. burgdorferi* 16S rDNA geninin PZR ile Saptanması



**Şekil 14.** *16S rDNA*'yı hedefleyen PZR ürünlerinin agaroz jelde görünümü. M: marker 100-10.000bç*16SrDNA* temsili pozitif örnekler (1 ve 2 numaralı kuyucuklar), *16 SrDNA*geni temsili negatif örnek (3 numaralı kuyucuk), pozitif kontrol; *B. burgdorferi* B31, *B. afzelii* PKo, *B. garinii* PBi referans suşları (sırasıyla 4, 5 ve 6 numaralı kuyucuklar)

*Ixodes* cinsi kenelerin *B. burgdorferi* varlığını saptamak için *B. burgdorferi*'ye özgül *16S rDNA*'ya dayalı PZR yapıldı. Referans DNA'larda yatay elektroforezde yaklaşık 1360 bç boyutunda band gözlemlendi (Şekil 14). Sığırlardan toplanan kenelere ait DNA örneklerinde *16S rDNA* genini hedefleyen PZR yapıldı. Elektroforezde 1360 bç boyutunda band gözlenen örnekler pozitif olarak belirlendi.

Kenelerden elde edilen genomik DNA'lar PZR'de kalıp olarak kullanıldığında, *16S rDNA* ile 116 ekstraktın 18'inde pozitiflik (% 15,51) bulundu. Kene bazında 31 dişi ve 8 erkek *I. ricinus* olmak üzere 39 kenede pozitiflik (% 13,49) saptandı.

*16S rDNA*pozitifliğinin bölgesel dağılımı değerlendirildiğinde, Samsun ili Tekkeköy ilçesi Yeşilyurt köyüne ait 60 ekstraktın 12'sinde (% 20), Yağbasan köyüne ait 24 ekstraktın 3'ünde (% 12,5) ve Ordu ili Ünye ilçesine ait 25 ekstraktın 3'ünde (% 12) pozitiflik saptandı (Tablo 6).

**Tablo 6.** Kene DNA örneklerinin *flaB* geni ve *16S rDNA* yönünden değerlendirilmesi

| Ekstrakt Numaraları | Örnek Toplanan Yerler | <i>flaB</i> geni | <i>16S rDNA</i> |
|---------------------|-----------------------|------------------|-----------------|
| 1                   | Yağbasan              | -                | -               |
| 2                   | Ünye                  | -                | -               |
| 3                   | Ünye                  | -                | -               |
| 4                   | Yağbasan              | -                | -               |
| 5                   | Ünye                  | -                | -               |
| 6                   | Ünye                  | -                | +               |
| 7                   | Yeşilyurt             | -                | -               |
| 8                   | Yeşilyurt             | -                | -               |
| 9                   | Ünye                  | -                | -               |
| 10                  | Yağbasan              | -                | -               |
| 11                  | Ünye                  | +                | -               |
| 12                  | Yağbasan              | +                | -               |
| 13                  | Yağbasan              | -                | -               |
| 14                  | Yağbasan              | -                | -               |
| 15                  | Ünye                  | -                | -               |
| 16                  | Yeşilyurt             | +                | -               |
| 17                  | Yeşilyurt             | -                | -               |
| 18                  | Yeşilyurt             | +                | +               |
| 19                  | Yeşilyurt             | +                | -               |
| 20                  | Yeşilyurt             | +                | -               |
| 21                  | Yeşilyurt             | -                | -               |
| 22                  | Yeşilyurt             | +                | +               |
| 23                  | Yağbasan              | +                | -               |
| 24                  | Yeşilyurt             | -                | -               |
| 25                  | Yağbasan              | -                | -               |
| 26                  | Yağbasan              | -                | +               |
| 27                  | Yeşilyurt             | -                | -               |
| 28                  | Yeşilyurt             | -                | -               |
| 29                  | Yeşilyurt             | -                | -               |
| 30                  | Yeşilyurt             | -                | -               |
| 31                  | Yağbasan              | -                | -               |
| 32                  | Yağbasan              | -                | -               |
| 33                  | Yağbasan              | -                | -               |

**Tablo 6** (devamı). Kene DNA örneklerinin *flaB* geni ve *16S rDNA* yönünden değerlendirilmesi

|    |           |   |   |
|----|-----------|---|---|
| 34 | Yeşilyurt | - | - |
| 35 | Yeşilyurt | - | + |
| 36 | Yeşilyurt | - | - |
| 37 | Yeşilyurt | - | - |
| 38 | Yeşilyurt | - | - |
| 39 | Yeşilyurt | - | - |
| 40 | Yeşilyurt | - | + |
| 41 | Yeşilyurt | - | - |
| 42 | Yeşilyurt | - | - |
| 43 | Yeşilyurt | - | + |
| 44 | Yeşilyurt | - | - |
| 45 | Yeşilyurt | - | - |
| 46 | Yeşilyurt | - | - |
| 47 | Yeşilyurt | - | + |
| 48 | Yeşilyurt | - | + |
| 49 | Yeşilyurt | - | - |
| 50 | Yeşilyurt | - | - |
| 51 | Yağbasan  | + | - |
| 52 | Yağbasan  | + | - |
| 53 | Yeşilyurt | - | - |
| 54 | Yeşilyurt | - | - |
| 55 | Yeşilyurt | - | - |
| 56 | Yeşilyurt | + | - |
| 57 | Yağbasan  | - | - |
| 58 | Yağbasan  | - | + |
| 59 | Yeşilyurt | - | + |
| 60 | Yağbasan  | - | - |
| 61 | Yağbasan  | - | + |
| 62 | Yeşilyurt | - | - |
| 63 | Yeşilyurt | - | - |
| 64 | Yağbasan  | - | - |
| 65 | Yağbasan  | - | - |
| 66 | Yeşilyurt | - | - |
| 67 | Yeşilyurt | - | - |
| 68 | Yeşilyurt | - | - |
| 69 | Yeşilyurt | - | - |
| 70 | Yeşilyurt | - | - |

**Tablo 6** (devamı). Kene DNA örneklerinin *flaB* geni ve *16S rDNA* yönünden değerlendirilmesi

|     |           |   |   |
|-----|-----------|---|---|
| 71  | Yeşilyurt | - | - |
| 72  | Yeşilyurt | - | - |
| 73  | Yeşilyurt | - | - |
| 74  | Yeşilyurt | - | - |
| 75  | Ünye      | - | - |
| 76  | Ünye      | - | - |
| 77  | Ünye      | - | - |
| 78  | Fatsa     | - | - |
| 79  | Ünye      | - | - |
| 80  | Ünye      | + | - |
| 81  | Ünye      | + | - |
| 82  | Fatsa     | + | - |
| 83  | Yeşilyurt | + | - |
| 84  | Yağbasan  | - | - |
| 85  | Yeşilyurt | + | - |
| 86  | Ünye      | - | - |
| 87  | Ünye      | + | - |
| 88  | Ünye      | + | - |
| 89  | Ünye      | - | - |
| 90  | Yağbasan  | - | - |
| 91  | Yağbasan  | - | - |
| 92  | Yeşilyurt | - | + |
| 93  | Ünye      | - | - |
| 94  | Ünye      | - | + |
| 95  | Ünye      | - | - |
| 96  | Ünye      | - | - |
| 97  | Ünye      | - | - |
| 98  | Ünye      | - | - |
| 99  | Ünye      | - | - |
| 100 | Ünye      | - | + |
| 101 | Yeşilyurt | - | - |
| 102 | Yeşilyurt | - | - |
| 103 | Yeşilyurt | + | + |
| 104 | Fatsa     | - | - |
| 105 | Fatsa     | + | - |
| 106 | Fatsa     | - | - |



**Tablo 6** (devamı). Kene DNA örneklerinin *flaB* geni ve *16S rDNA* yönünden değerlendirilmesi

|     |           |   |   |
|-----|-----------|---|---|
| 107 | Fatsa     | - | - |
| 108 | Fatsa     | - | - |
| 109 | Yeşilyurt | - | + |
| 110 | Yeşilyurt | - | - |
| 111 | Yeşilyurt | - | + |
| 112 | Yağbasan  | - | - |
| 113 | Yeşilyurt | - | - |
| 114 | Yeşilyurt | - | - |
| 115 | Yeşilyurt | - | - |
| 116 | Yeşilyurt | - | - |

#### **4.8. Referans ve Örnek DNA'lara ait Dizi Analizi**

##### **4.8.1. Referans DNA'ya ait *flaB* geni Dizisi Analizi**

Referans *B. burgdorferi* B31, *B. afzelii* PKo ve *B. garinii* PBi suşlarına ait genomik DNA'lardan PZR ile çoğaltılan *flaB* genine ait ampikonların DNA dizi analizleri BM Laboratuvarları tarafından Sanger yöntemi ile yapıldı.

Referans suşlara ve örneklere ait PZR ürünleri agarozdan jel ekstraksiyon kiti ile saflaştırılarak dizi analizi için gönderildi. Dizi analizi, *flaB* geninin PZR ile çoğaltılmasında kullanılan forward (F) ve reverz (R) primerlerin her ikisi ile çift taraflı yaptırıldı. Temsili blast sonucu olarak, Avrupa'da yaygın olan *B. afzelii* türüne ait referans suş DNA'sından elde edilen *flaB* geni dizisi sunuldu. Çift taraflı dizi analizi yapılmış olup, F ve R primerler ile gerçekleştirilen dizi analizi sonuçları sırasıyla 5'-3' yönde verildi (Şekil 15 ve Şekil 16).

5'CTGCTTCCAAAATGTAAAAACCAGCTGAAGAGCTTGGAAATGCAGCCTGCAAAAATTAACACAC  
CAGCATCACTTTCAGGGTCTCAAAAAACCCTTTTC-3'

**Şekil 15.**Referans *B. afzelii* PKo suşuna ait *flaB* geni-F DNA dizisi

5'GCCAGGCGCATTTCAGCTCTTCAGCTGTTTTTACATTTTGGGAAGCAGATTTGTTTGACAACATGTG  
CATTTGGTTATATTGAGCTTGATCAGCAAAAAGGGATT -3'

**Şekil 16.** Referans *B. afzelii* PKo suşuna ait *flaB* geni-R DNA dizisi

Referans ve örnek DNA'lara ait *flaB* genleri dizi analizi sonuçlarının NCBI'da (www.ncbi.gov) nükleotid Blast ile homoloji tayinleri yapıldı (Şekil 17 ve Şekil 18).

PKo5'-TCTGCTTCCAAAATGTAAAAAACAGCTGAAGAGCTTGGAATGCAGCCTGCAAA  
AATT-3'

1895'-TCTGCTTCCAAAATGT-AAAAACAGCTGAAGAGCTTGGAATGCAGCCTGCAA  
AAATTA-3'

PKo 5'-AACACACCAGCATCACTTTCAGGGTCTCAA-3'

1895'-ACACACCAGCATCACTTTCAGGGTCTCAA-3'

**Şekil 17.** Referans *B. afzelii* suşu *fla* geni F primerler ile dizi analizinin NCBI'da homoloji tayini ve bir suş ile karşılaştırması. 1.ve 3. satırlar (PKo), Referans *B. afzelii* PKo *flaB* geni dizi analizi nükleotid sıraları sırasıyla, 1-59 ve 60-88; 2.ve 4. satırlar (189), *B. afzelii* izolat 189 flagellin (*flaB*) geni, nükleotid sıraları 109-166 ve 167-195

PKo5'-CAGGC-GCATTTCAGCTCTTCAGCTGTTTTTACATTTTGGGAAGCAGATTTGTTTGACA3'

EP225'CAGGCTGCATTCCAAGCTCTTCAGCTGTTTTTACATTTTGGGAAGCAGATTTGTTTGACA-3'

PKo5'-ACATGTGCATTTGGTTATATTGAGCTTGATCAGCAA -3'

EP225'-ACATGTGCATTTGGTTATATTGAGCTTGATCAGCAA -3'

**Şekil 18.** Referans *B. afzelii* suşu *fla* geni R primerler ile dizi analizinin ncbi'da homoloji tayini ve bir suş ile karşılaştırma. 1.ve 3. satırlar(PKo) Referans *B. afzelii* PKo *flaB* geni dizi analizi nükleotid sıraları sırasıyla, 3-59 ve 60-95; 2.ve 4. satırlar *B. afzelii* clone EP22-FN flagellin geni, nükleotid sıraları 347-288 ve 287-252

Referans *B. afzelii* DNA'sından elde edilen *flaB* geni dizi analizi sonucunda, *B. afzelii* ve *B. burgdorferi*'nin farklı suşları ile %97 oranında benzerlik saptandı (Şekil 17 ve Şekil 18). *B. burgdorferi* B31 *flaB* geninin *B. burgdorferi*, *B. afzelii* ile en az % 97 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. *B. garinii* PBi referans suşundan çoğaltılan *flaB* genine ait dizi analizi sonuçlarının ise %97'nin üzerinde yalnızca *B. garinii* suşlarına benzerlik gösterdiği tespit edildi.

#### 4.8.2. Kene DNA Örneklerine ait *flaB* geni Dizi Analizi

Kene DNA örneklerinden *flaB* geni ile pozitif bulunanlar arasından temsili olarak kuvvetli band elde edilen örneklerden 2 adet seçildi ve DNA dizi analizi yaptırıldı. Tekkeköy, Yeşilyurt köyünde toplanan kene DNA örneklerinden birine ait *flaB* geni dizi analizi temsili olarak Şekil 19 ve 20'de sunulmuştur.

5'TCCAAAATGTAAAAACAGCTGAAAGCTTGGAATTGCAGCCTGCAAAAATTATACACACCAGCAT  
CACTTTCAGGGTCTCAA-3'

**Şekil 19.** Temsili kene DNA örneğine ait *flaB* geni-F DNA dizisi

5'-GCTGCATTCCAATCAGCTGTTTTTTTTTACATTTTTGGGAGGCAGATTTGTTTGACA  
ACATGTGCATTTGGTTTATATTGGCAGCCTTGATCAGCAA-3'

**Şekil 20.** Temsili kene DNA örneğine ait *flaB* geni-R DNA dizisi

Örnek kene DNA'larına ait *flaB* geninin forward ve reverz primerleri kullanılarak sırasıyla genin başlangıcından ve sonundan itibaren yapılan dizi analizi verileri internette NCBI'nin web sayfasında "nucleotid blast" bölümüne girildi ve homoloji tayini yapıldı (www.ncbi.gov). Temsili örnek *flaB* genine ait dizi analizinde Forward primerler kullanıldığında *B. burgdorferi* ve *B. afzelii*'nin farklı suşları ile %95 oranında benzerlik tespit edildi. Reverz primerler ile ise *B. afzelii*'nin farklı suşları ile %87 benzerlik olduğu belirlendi.

Farklı bölgelere ait kenelerden tespit edilen *flaB* geninin, *B. burgdorferi* sensu lato'ya ait farklı türlerle benzerlik (%85-95 arasında) gösterdiği saptandı.

## 5. TARTIŞMA

Lyme hastalığı, *B. burgdorferi sensu lato* türlerinin neden olduğu, *Ixodes* cinsi kenelerle bulaşan, Avrupa, Kuzey Amerika ve uzak doğu Asya'da görülen en yaygın kene kaynaklı zoonotik hastalıktır (Steere, 2001; Marques, 2010; Chomel, 2015).

Kene türlerinin dağılımı, yoğunluğu ve mevsimsel aktiviteleri bitki örtüsüne, mevsimsel parametrelere ve konakçıya bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yüksek yağış ve nem oranı (en az %80) gözlenen ormanlık alanların özellikle *I. ricinus* için daha uygun olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen meteorolojik verilere göre, aylık ortalama nisbi nemin %74,5-88,3, ortalama sıcaklığın 15,9-21°C aralığında olması bölgede yüksek nem ve ılıman iklimin görüldüğünü göstermekte olup, bu koşullar *I. ricinus* türü kenelerin bölgede yaygınlığı ve yoğun olarak bulunmasına zemin hazırlamıştır.

Türkiye'de kene kaynaklı hastalıklara duyarlı konakçılardan ön plana çıkanlar insan, sığır, at, koyun ve köpeklerdir. Türkiye'nin kene faunası memeliler, sürüngenler ve kuşlarda 2 aile 32 tür ve 10 cinsten oluşmakta olup, veteriner öneme sahip Ixodidae ailesi 7 cins ve 28 farklı türden oluşmaktadır (Aydın ve Bakırcı, 2007).

Yapılan çalışmalar Karadeniz bölgesinde kene faunasının çok zengin olduğunu ve pek çok kene türünün bulunduğunu göstermiştir. Bu türler *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis* spp. (*H. punctata*, *H. sulcata*, *H. concinna*, *H. parva*), *Hyalomma* spp. (*H. marginatum*, *H. anatolicum excavatum*, *H. detritum*), *Rhipicephalus* spp. (*R. bursa*, *R. turanicus*, *R. bursa*, *R. sanguineus* ve *R.(Boophilus) annulatus*)'tur (Açııcı and Celep, 1997; Acici ve ark., 2008; Kar ve ark., 2013; Orkun ve ark., 2014). *Ixodes*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma* ve *Rhipicephalus* cinslerine ait olan bu türler insanlara tutunan kenelerdir.

Türkiye'nin özellikle bol yağış alan Karadeniz ikliminin hüküm sürdüğü kıyı bölgelerinde *I. ricinus* kenelerin yüksek yoğunlukta buldukları yapılan farklı çalışmalarda tespit edilmiştir (Açııcı ve Celep, 1997; Güner ve ark., 2005; Aydın ve Bakırcı, 2007; Kar ve ark., 2013).

*Ixodes* spp. lerin, larva, nimf ve ergin olmak üzere 3 safhadan oluşan yaşam döngüleri dört mevsim devam etmektedir. Kar ve arkadaşları, Türkiye'de nimflerin en fazla bahar (% 44,55) ve daha az yoğunlukta kış aylarında (%27,07), larvaların ise yaz (%48,25) ve sonbaharda (%45,17) bulunduğunu bildirmişlerdir (Kar ve ark., 2013).

Açııcı ve Celep Samsun ilinde sığır ve koyun barınaklarından topladıkları 4838 kenenin %64'ünün *I. ricinus* türüne ait olduğunu vurgulamışlardır (Açııcı ve Celep, 1997). Güner ve arkadaşları 2003 yılında Trakya ve İstanbul'dan 312 kene toplamış ve 299 kenenin *I. ricinus* olduğunu saptamışlardır (Güner ve ark., 2003). Güneş ve arkadaşları Sinop iline ait 13 farklı ormanlık alandan topladıkları 361 kenenin 334 adedini *I. ricinus* olarak tanımlamışlardır (Güneş ve ark., 2007). Kar ve arkadaşları, İstanbul'un Anadolu yakasından, kuzey sınırimıza kadar Trakya'nın Karadeniz iklimine sahip olan kesimlerinden topladıkları kenelerde %89,29 oranında *Ixodes* spp., %4,80 *Hyalomma* spp., %4,03 *Rhipicephalus* spp., %1,34 *Haemaphysalis* spp., %0,54 *Dermacentor* spp. tanımlamışlardır (Kar ve ark., 2013).

Bu çalışmada, Mayıs ve Haziran aylarında Samsun ve Ordu illerinde yetiştirilen sığırlardan 369 kene toplandı. Bu bölgede önceki yapılan çalışmalara benzer şekilde, bu kenelerin 289 adedinin (% 78,3) *I. ricinus* türüne ait olduğu belirlendi. Toplanan diğer türlere ait 80 adet kenenin ise, *Hyalomma marginatum*, *Haemaphysalis parva*, *Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* türlerine ait olduğu tespit edildi. *I. ricinus* kene sayısı ilçe bazında Samsun iline ait Tekkeköy ilçesinde % 79,5 ile en yüksek oranda belirlendi.

Hayvanlara tutunan kenelerden *Borrelia*'nın tespit edilebilirliği bölgedeki kene yoğunluğu ile paraleldir. Bu nedenle, *Borrelia* türlerini taşıyan kenelerin yoğun olduğu yerlerde özellikle hayvancılıkla, tarımla uğraşan veya orman köylerinde, kırsal kesimde yaşayan halk Lyme hastalığına yakalanma riski altındadır. Bu bölgeleri veya park ve bahçeleri ziyaret eden kişiler de kene ısırığına maruz kalabilmektedir. Farklı çalışmalarda, risk gruplarında Lyme hastalığı seropozitifliğinin ülkemiz genelinde bölgelere göre değişmek üzere %4-35,9 arasında olduğu tespit edilmiştir. Farklı bölgelerde yaşayan insanlarda yürütülen serolojik taramalar sonucunda elde edilen seropozitiflikler; Antalya'da riskli grupta %19-44, düşük risk grubunda %2-6 (Mutlu ve ark., 1995), Adana yöresinde %26 (Gökfidan, 1992), Karadeniz bölgesinde %6,6 (Aydın, 1992), Bilecik'te risk grubundakilerde %35,8, risk grubu olmayanlarda %1,4 (Göral ve ark., 1997)'dir. Aslan Başbulut ve arkadaşları Samsun ili Tekkeköy ilçesinde yaşayan sağlıklı bireylerde, *I. ricinus* ile bulaşan *B.burgdorferi* seroprevalansını araştırmışlar ve seropozitifliği ELISA testi ile %4,1, Western Blot testi ile %3,3 tespit etmişlerdir (Aslan Başbulut ve ark., 2012).

Sakarya, Samsun ve Tokat illerinde sütçü sığırlardan toplanan kan serumlarından *B. burgdorferi*'ye karşı oluşan antikorların varlığı IFA tekniği ile %13,5 oranında ortaya konulmuştur (İzgür ve ark., 1997). Güner ve arkadaşları Karadeniz bölgesinde topladıkları yaban farelerinde ELISA ve WB tekniğiyle *B. burgdorferi*'ye karşı antikor varlığını ortaya

koymuşlardır (Güner ve ark., 2005). Samsun ili kırsal kesiminde yürütülen bir serolojik araştırmada Lyme hastalığı köpeklerde %23,2, atlarda %6 bulunmuştur (Bhide ve ark., 2008). Sinop ve çevresinde ormanlık alandan toplanan *I. ricinus* türünün %15,9'unda Floresan Antikor Testi ile *B. burgdorferi sensu lato* tespit edilmiştir (Güneş ve ark., 2007).

İnsan ve hayvanlarda Lyme hastalığının tanısında anti-*B. burgdorferi* antikor yanıtının belirlendiği ELISA ve Western Blot gibi serolojik testlerin yanı sıra kan ve doku materyallerinde PZR ile bakteriye ait belirli genlerin veya özgül DNA bölgelerinin çoğaltılması da yardımcı olmaktadır.

Lyme hastalığından korunmada en önemli faktör ise insan ve hayvanların bu hastalığa yakalanma risklerinin belirlenmesidir. Bu da sahadan toplanan veya sığır gibi hayvanlara tutunan kenelerde bakterinin varlığının tespit edilmesi ve bu bakterileri taşıyan kenelerin yoğunluğunun belirlenmesi yoluyla gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla, genel olarak kenelerle taşınan *B. burgdorferi*'ye özgül genlerin moleküler yöntemlerle saptanması metodu kullanılmaktadır. *B. burgdorferi sensu lato*'nun belirlenmesinde PZR tekniği ilk kez Rosa ve Schwan (1989) tarafından kullanılmıştır (Wodecko ve ark., 2010). *B. burgdorferi sensu lato*'nun PZR ile belirlenmesinde bakterinin kromozomunda ve plazmidlerde yer alan DNA dizileri kullanılmaktadır (Picken, 1992; Wodecka ve Skotarczak, 2005). Yaygın olarak, antijenleri kodlayan genler; örneğin flagellin proteinini kodlayan *fla* geni, *ospA*, *ospB* ve *ospC* yüzey proteinlerini kodlayan genler kullanılmakta veya bakteri ribozomunun küçük alt biriminde yeralan *16S rRNA* veya büyük alt biriminde bulunan *5S rRNA* ve *23S rRNA* ribozomal RNA'nın özellikle bakteriye özgül korunmuş bölgelerini kodlayan DNA dizileri kullanılmaktadır (Rosa ve Schwan, 1989; Wodecka ve ark., 2010).

Avrupa'da *I. ricinus* türü kenelerin *B. burgdorferi sensu lato* türlerinin prevalansının metaanaliz yöntemiyle araştırıldığı bir çalışmada (Rauter ve Hartung, 2005) 1984-2003 tarihleri arasında yapılmış çalışmalar belirli kriterler yönünden değerlendirilmiştir. Çok sayıdaki araştırma sonuçlarına göre, merkez Avrupa'da yeralan ülkelerde *I. ricinus* türü kenelerin en yüksek oranda infekte oldukları belirlenmiştir. Kenelerde *Borrelia* prevalansının %13,7 olduğu, *Borrelia* ile infekte olma oranının erişkin kenelerde (%18,6), nimflere (%10,1) oranla daha yüksek olduğu, kenelerde *Borrelia*'nın saptanmasına yönelik tespit yöntemleri, erişkin kenelerin cinsiyetleri veya toplanan yıl açısından hiçbir farklılık gözlenmediği belirtilmiştir. En fazla rastlanan *Borrelia* türünün *B. afzelii* ve *B. garinii* olduğu bildirilmiştir. Bu metaanaliz çalışmasında, PZR ile tespit yöntemiyle en yüksek infeksiyon oranları (nimflerde >%30 ve erginlerde >%35) Bulgaristan, Gürcistan, güney Almanya, Latvia ve Slovakya'da bildirilmiştir (Rauter ve Hartung, 2005). Bulgaristan'da *fla* geni ve *16S rDNA*'ya

dayalı PZR ile 112 ergin *I. ricinus* kenenin 36 (%32), nimflerin 9 (%10)'unun *B. burgdorferi* sensu lato ile infekte olduğunu saptamışlardır (Christova ve ark., 2001). Çek Cumhuriyetinde 370 *I. ricinus* türü kenede *Borrelia* spp.'ye özgül gen bölgesi olan *rrfA(5S rRNA)-rrlB(23S rRNA)* intergenik bölgeye dayalı PZR ile kenelerde % 20,5 oranında pozitiflik belirlemişlerdir (Derdakova ve ark., 2003). Polonya'da topladıkları 579 adet *I. ricinus*'a ait DNA örneklerinde *fla* geni, *16S rDNA*'yı kodlayan *rrs* geni ve *23S rRNA*'yı kodlayan *rrlA* geni, *rrs(16S rRNA)-rrlA(23S rRNA)* genlerini nested PZR ile çoğaltmışlar ve *fla* geni ile 43 (%7,4), *rrs* geni ile 7 (%1,2) ve *rrs-rrlA* geni ile 12 (%2,1) oranında pozitiflik belirlemişlerdir (Wodecka ve ark., 2010).

*B. burgdorferi sensu lato* ve genotürlere spesifik gen bölgelerinin PZR ile amplifikasyonuna dayalı yöntemler kenelerde bu patojenlerin varlığının belirlenmesi ve genotiplendirme amaçlarına yönelik hızlı ve etkili araçlar olarak son yıllarda ülkemizde de kullanılmaktadır. Türkiye'nin Avrupa yakası Trakya bölgesinde toplanmış kenelerde *5S-23S rDNA* intergenik aralık, *16S rDNA* ve *flagellin* genleri çoğaltılmış ve dizi analizi sonucunda ülkemizde tespit edilen türlerin *B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valasiana*, *B. lusitaniae* olduğu ve bunlara ait dizi analizi sonuçlarının Avrupa kökenleriyle %97-100 benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Güner ve ark., 2003). İstanbul'un Anadolu yakasından, Bulgaristan sınırına kadar devam eden, Trakya'nın Karadeniz iklimi altında bulunan alanlarından toplanan kenelerden oluşturulan 77 havuzun *B. burgdorferi* s.l.'nin *OspA* genine dayalı Semi Nested PZR analizinde 12 havuzda (%15,58) pozitiflik saptanmıştır (Kar ve ark., 2013). 2008 yılında Türkiye'nin kuzey batısı, İstanbul ve Kırklareli'de, 241 adet yetişkin *I. ricinus*'tan ekstrakte edilen DNA'dan PZR ile *5S-23S rDNA* intergenik aralık çoğaltılmış ve ardından yapılan nested PZR ile kenelerde *B. burgdorferi sensu lato* varlığı İstanbul'da % 38,7, Kırklareli'de ise % 11,4 oranında saptanmıştır (Şen ve ark., 2011).

Ankara ilçelerinde 169 keneden *16S rDNA* ve *5S-23S rDNA* genleri ile yapılan PZR sonucunda *Ixodes* spp. dışındaki farklı 6 kenede (%3.5) *Borrelia* spp.; *B. burgdorferi sensu stricto* saptandı (Orkun ve ark., 2014).

Bu çalışmada hedef gen olarak seçilen Flagellin proteinini kodlayan *flaB* geni ise Amerika ve Avrupa suşları arasında birkaç nükleotid farkına karşın, farklı *B. burgdorferi* suşları arasında yüksek korunmuşluğa sahiptir (Wallich ve ark., 1990; Lebech ve ark., 1992) ve *I. ricinus* keneler tarafından taşınan *Borrelia* spiroketlerinin saptanması ve tanımlanmasında en duyarlı ve spesifik moleküler belirteç olduğu bildirilmiştir (Wodecka ve ark., 2010). Diğer hedef *16S rDNA*, *B. burgdorferi sensu lato*'ya ait türlerde korunmuştur, dizilerinde mutasyon oranı düşüktür ve bu komplekse özgüdür (Le Fleche ve ark., 1997). *I.*

*ricinus* türü kenelerin *Borrelia* ile infekte olma durumunu belirlemek amacıyla yürütülen bu çalışmada, kene DNA örneklerinde *flaB* ve *16S rDNA* genlerine dayalı PZR yapıldı. *flaB* geni ile 116 ekstraktın 20'sinde (% 17,24) pozitiflik tespit edildi. *16S rDNA* genine dayalı PZR ile 116 ekstraktın 18'inde pozitiflik (% 15,51) bulundu. Her ekstraktta yeralan kene sayıları değerlendirildiğinde; 289 adet *I. ricinus*'dan *flaB* geni ile 40 dişide pozitiflik (% 13,84) ve *16S rDNA* geni ile 31 diş ve 8 erkek olmak üzere 39 kenede pozitiflik (% 13,49) saptandı. Her 2 gene dayalı olarak belirlenen pozitiflik oranları ve kenelerde *Borrelia* prevalansı Avrupa'nın çeşitli ülkelerinde yürütülen çalışma sonuçlarıyla uyumludur.

Elde edilen gen ürünlerinin doğrulanması amacıyla dizi analizleri yaptırıldı. Referans suşlara ait *flaB* geni dizi analiz verileri homoloji yönünden değerlendirildiğinde *B. burgdorferi* ve *B. afzelii flaB* geninin *B. afzelii* ve *B. burgdorferi*'nin farklı suşları ile %97 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. *B. garinii flaB* geni dizisinin ise yalnızca *B. garinii*'ye ait farklı izolatlar ile en az %97 oranında benzerlik gösterdiği saptandı. *flaB* geni yönünden pozitif bulunan örneklerin de Gen Bankası'nda yeralan türlere ait genlerle homoloji tayini yapıldığında %85'in üzerinde *B. burgdorferi* ve *B. afzelii*'nin farklı izolatları ile benzerliği tespit edildi. Çalışmada kullanılan referans suşlara ait sonuçlar da değerlendirildiğinde elde edilen PZR ürünlerinin *flaB* genine ait olduğu teyit edilmiş oldu. DNA dizi analizi ile hem Samsun hem de Ordu'nun Ünye ilçesinden toplanan kenelerde *B. burgdorferi sensu lato* varlığı doğrulandı, ancaktür tayini yapılmadı.

*I. ricinus* türü kenelere ait DNA'da *flaB* ve *16S rDNA* genlerinin belirlenmesi, *B. burgdorferi sensu lato* varlığını göstermiştir. Bölgede, özellikle yüksek nemli orman köylerinde yaygın olan *I. ricinus* kenelerin bu etken ile infekte olması Lyme hastalığının önemli bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuştur.

Zoonotik olan Lyme hastalığı ülkemizde bildiri zorunlu bir hastalık olmayıp, bu hastalığa yönelik yapılan çalışmalar yetersizdir. Ayrıca klinik semptomları başka hastalıklarla benzerlik gösterdiği için, muhtemelen vakaların bir kısmında bu hastalıktan şüphelenilmemektedir. İnsanlarda deride gözlenen eritema migrans Lyme hastalığından şüphelendirmektedir. Ancak kene tarafından ısırıldığı farkında olmayan pek çok kişi alerjik reaksiyon olarak düşündükleri deri reaksiyonları için hastaneye başvurmamaktadırlar. Ayrıca, vakaların %30'unda bu tip deri reaksiyonları gözlenmediği bildirilmiştir. Bu da insanlarda tanı konulmasını zorlaştırmaktadır. Hayvanlarda Lyme hastalığı en sık köpeklerde rastlanmakta olup, deri reaksiyonlarının gözlenmemesi, tanı konulmadığında hastalığın ancak ilerlemiş dönemlerinde klinik semptomların görülmesine neden olmaktadır.



Ülkemizde az sayıda araştırma yapılan ve ihmal edilen bir hastalık olan Lyme hastalığı, Kuzey Amerika ve Avrupa'da yaygındır. Türkiye'de *Ixodes* cinsi keneleri tarafından taşınan *Borrelia* türlerinin Avrupa'da yaygın olan türler olduğu çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir. Bu hastalık etkenine yönelik çalışmaların yanı sıra insan ve hayvanlarda hastalığın varlığının, özellikle Karadeniz Bölgesi'nde serolojik testlerle takip edilmesi önem taşımaktadır.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Samsun ve Ordu'nun orman köylerinde bakılan sığırlardan toplanan 369 kenenin 289'u (% 78) *I. ricinus* olarak tanımlandı. Araştırma yapılan, bol yağış alan bu Orta Karadeniz illerinde *Borrelia* etkeni taşıyan *I. ricinus* türü kenelerin yaygın olduğu tespit edildi.

*I. ricinus* türü kenelerde *B. burgdorferi sensu lato* varlığı *flaB* ve *16S rDNA* genlerine dayalı olarak belirlendi. Kenelerde *Borrelia* prevalansı *flaB* geni ile % 17,24, *16S rDNA* ile ise % 15,51 oranlarında saptandı. Her bir kene bazında değerlendirme yapıldığında; *flaB* geni ile % 13,84 pozitiflik ve *16S rDNA* geni ile % 13,49 pozitiflik belirlendi.

Örneklerde *Borrelia* varlığı *flaB* genine dayalı DNA dizi analizi sonucunda doğrulandı ve *Borrelia*'nın farklı türleriyle %85'in üzerinde benzerlik belirlendi.

Sonuç olarak, Samsun ve Ordu illerinden toplanan kenelerin büyük çoğunluğunun *I. ricinus* olduğu ve bu kenelerin *B. burgdorferi sensu lato*'yu taşıdıkları, *flaB* ve *16S rDNA* genlerine dayalı PZR ve ardından dizi analizi ile belirlendi. Bu bölgede yaygın olan kenelerin Lyme hastalığının etkenini taşıyor olması, bu hastalığın bölge halkında ve köpekler, atlar dahil evcil hayvanlarda görülme riskini ortaya koymaktadır.

Ülkemizde özellikle etkenin taşıyıcısı olan *Ixodes* cinsi kenelerin yaygın bulunduğu bölgelerde yaşayan halk ve evcil hayvanların Lyme hastalığı yönünden araştırılması önem taşımaktadır. Ayrıca, halk sağlığı ve hayvan sağlığı açısından pek çok kene kaynaklı hastalığın da önlenmesi amacıyla, kenelerin ortadan kaldırılmasına yönelik bir takım önlemler alınmalı ve halk bilinçlendirilmelidir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar gelecekte bu hastalığa yönelik yapılacak çalışmalara katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmanın devamı olarak yürüteceğimiz çalışmalarda, daha sonraki yıllarda da aynı bölgede bakılan sığırlardan toplanan *Ixodes* keneleriyle taşınan *Borrelia* türlerinin Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) gibi moleküler tiplendirme yöntemleri ile belirlenmesi hedeflenmektedir.

## KAYNAKLAR

- Acici M, Umur S, Guvenc T, Arslan HH, Kurt M. Seroprevalence of equine babesiosis in the Black Sea region of Turkey. *Parasitol Int* 2008;57(2):198-200.
- Açııcı M, Celep A. Samsun yöresi sığır ve koyunlarında görülen mera keneleri ve mevsimsel dağılımları. *Etlik Vet Mikrob Derg* 1997;9(2):17-30.
- Aktaş M. Vektör kenelerin ekolojisi. II. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu, Ankara, Kene Kaynaklı Enfeksiyonlar, 2008;21-22.
- Anderson JF. Epizootiology of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis* 1991;77:23-34.
- Anderson JF, Magnarelli LA. Biology of ticks. *Infect Dis Clin North Am* 2008;22(2):195-215.
- Aslan Başbulut E, Gözalan A, Sönmez C, Çöplü N, Körhasan B, Esen B, Akın L, Ertek M. Samsun kırsalında *Borrelia burgdorferi* ve kene ensefaliti virusu seroprevalansının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2012;46(2):247-256.
- Aydın K. Trabzon yöresinde Lyme seropozitifliği. XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi 1992.
- Aydın L, Bakırcı S. Geographical distributon of ticks in Turkey. *Parasitol Res* 2007;101(Suppl 2):S163-S166.
- Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J Bio Med* 1984;57:521-525.
- Barbour AG, Burgdorfer W, Hayes SF, Péter O, Aeschlimann A. Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. *Curr Microbiol* 1983;8:123-126.
- Barbour AG, Fish D. The biological and social phenomenon of Lyme disease. *Science* 1993;260(5114):1610– 1616.
- Bhide MR, Travnicek M, Levkutova M, Curlik J, Revajova V, Levkut M. Sensitivity of *Borrelia* genospecies to serum complement from different animals and human: A host-pathogen relationship. *FEMS ImmunolMed Microbiol*2005;1:165-172.
- Bhide M, Yılmaz Z, Golcu E, Torun S, Mikula I. Seroprevalence of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs and horses in Turkey. *Ann Agric Environ Med* 2008;15(1):85-90.
- Brooks GF, Btuel JS, Morse SA. Spirochets & Other Spiral Microorganisms. Butler JP, Ransom J, Ryan E. Jawetz, Melnik, Adelberg's Medical Microbiology. 21rd Ed., The United States of America Appleton & Lange. 1998;289-298.
- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science* 1982;216(4552):1317-1319.

- Bushmich SL. Lyme Borreliosis in domestic animals. J Spirochetel& Tick-Borne Dis 1994;1(1):24-30.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. www.cdc.gov, 2017.
- Charon NW, Greenberg EP, Koopman MB, Limberger RJ. Spirochete chemotaxis, motility, and the structure of the spirochetal periplasmic flagella. Research Microbiol 1992;143(6):597-603.
- Christova I, Schouls L, van De Pol I, Park J, Panayotov S, Lefterova V, Kantardjiev T, Dumler JS. High prevalence of Granulocytic Ehrlichiae and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Bulgaria. J Clin Microbiol 2001;39(11):4172–4174.
- Chomel B. Lyme disease. Rev Sci Tech 2015;34(2):569-576.
- Çakır N, Akandere Y, Hekim N, Kovancı E, Yazıcı H. Türkiye'de iki Lyme olgusu. Klinik Gelişim 1990;4:839-41.
- de Silva AM, Fikrig E. Arthropod- and host-specific gene expression by *Borrelia burgdorferi*. J Clin Invest 1997;99(3):377-379.
- Derdakova M, Beati L, Pet'ko B, Stanko M, Fish D. Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the *rrfA-rrlB* intergenic spacer in *Ixodes ricinus* ticks from the Czech Republic. Appl Environ Microbiol 2003;69(1):509-516.
- Derdakova M, Lencakova D. Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi* sensu lato with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. Ann Agric Environ Med 2005;12(2):165-172.
- Ergünay K, Saygan MB, Aydoğan S, Litzba N, Şener B, Lederer S, Niedrig M, Haşçelik G, Us D. Cofirmed 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):220-227.
- Falco RC, Fish D. A comparison of methods for sampling the deer tick, *Ixodes dammini*, in a Lyme disease endemic area. Exp Appl Acarol 1992;14(2):165-173.
- Fingerle V, Schulte-Spechtel UC, Ruzic-Sabljić E, Lenhard S, Hofmann H, Weber K, Pfister K, Wilske B. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. Int J Med Microbiol 2008;298(3-4):279–90.
- Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Wathley L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fuji C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*." Nature 1997;390(6660):580-586.

- Fukunaga M, Hamase A, Okada K, Nakao M. *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by *16SrRNA* gene-targeted PCR analysis. *Microbiol Immunol* 1996;40(11):877–881.
- Gern L, Estrad-Pena A, Frandsen F, Gray JS, Jaenson TG, Jongejan F, Kahl O, Korenberg E, Mehl R, Nuttall PA. European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentralbl Bakteriol* 1998;287(3):196–204.
- Gern L, Falco RC. Lyme disease. *Rev sci teach Off int Epiz* 2000;19(1):121-135.
- Gray JS. Review The ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis. *Exp Appl Acarol* 1998;22(5):249-258.
- Gokce HI, Genc O, Akca A, Vatansever Z, Unver A, Erdoğan HM. Molecular and serological evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection of farm animals in the Black sea region of Turkey. *Acta Vet Hung* 2008;56(3):281-282.
- Gökfıdan S. Osmaniye bölgesinde artritli ve asemptomatik populusyonda *B. burgdorferi* prevalansının ELISA ve IHA teknikleri ile araştırılması. Çukurova Üniv Adana Doktora tezi 1992.
- Göral G, Kılıçturgay K, Aydın L. Antibody prevalence against *B. burgdorferi* in some villages in the province of Bilecik. *Turk J Med Sci* 1997;27:51-53.
- Güner ES, Hashimoto N, Takada N, Kaneda K, Imai Y, Masuzawa T. First isolation and characterization of *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains from *Ixodes ricinus* ticks in Turkey. *J Med Microbiol* 2003;52:807–813.
- Güner ES, Watanabe M, Kadosaka T, Polat E, Gargili A, Gulanber A, Ohashi N, Kaneda K, Imai Y, Masuzawa T. Seroepidemiology of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Anaplasma phagocytophilum* in wild mice captured in Northern Turkey. *Epidemiol Infect* 2005;133:331-336.
- Güneş T, Kaya S, Poyraz O, Engin A. The Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks in the Sinop Region of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 2007;31(3):153-158.
- Higgins R. Emerging or re-emerging bacterial zoonotic diseases: bartonellosis, leptospirosis, Lyme borreliosis, plague. *Rev Sci Tech* 2004;23(2):569-581.
- Hu CM, Humair PF, Wallich R, Gern L. Apodemus sp. rodents, reservoir hosts for *B. afzelii* in an endemic area in Switzerland. *Zentralbl Bakteriol* 1997;285(4):558–564.
- İnci A, Düzlü Ö. Vektörler ve vektörlerle bulaşan hastalıklar. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2009;6(1):53-63.
- İnci A, Yazar S, Tuncbilek AS, Canhilal R, Doğanay M, Aydın L, Aktaş M, Vatansever Z, Ozdarendeli A, Ozbel Y, Yıldırım A, Duzlu O. Vectors and vector-borne diseases in Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2013;60:281-296.

- İzgür M, Arda M, Akay Ö, Esendal ÖM, Keskin O. Sığır kan serumlarında *Borrelia burgdorferi* antikorlarının flüoresan antikor tekniği ile Türkiye’de ilk kez saptanması. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1997;44(1):57-62.
- Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. Int J Syst Bacteriol 1984;34:496-497.
- Kalkan K, Özçelik S, Malatyali E. Sivas’ta sığırlarda Babesiosis seroprevalansı. Türkiye Parazit Derg 2010;34(1):11-16.
- Kar S, Yılmaz N, Midilli K, Ergin S, Gargılı A. *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Rickettsia* spp. in ticks collected from European Part of Turkey. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2013;19(1):19-24.
- Kawabata H, Masuzawa T, Yanagihara Y. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. Microbiol Immunol 1993;37(11):843–848.
- Kazmierczak JJ, Sorhage FE. Current understanding of *Borrelia burgdorferi* infection, with emphasis on its prevention in dogs. J Am Vet Assoc 1993;203(11):1524–1528.
- Köksal İ, Saltoğlu N, Bingül T, Öztürk H. Bir Lyme hastalığı olgusu. ANKEM Derg 1990;4:284.
- Krupka I, Straubinger RK. Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Vet Clin N Am Small Anim Pract 2010;40(6):1103–1119.
- Kuehn BM. CDC estimates 300,000 US cases of Lyme disease annually. JAMA 2013;310(11):1110.
- Kurtenbach K, Sewell HS, Ogden NH, Randolph SE, Nuttall PA. Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. Infect Immun 1998;66:1248–1251.
- Lam TT, Nguyen TK, Montgomery RR, Kantor FS, Fikrig E, Flavell RA. Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. Infect Immun 1994;62:290–298.
- Le Fleche A, Postic D, Girardet K, Peter O, Baranton G. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. Int J Syst Bacteriol 1997;47(4):921-925.
- Lebech, AM, Hansen K. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples and cerebrospinal fluid samples from patients with early and late Lyme neuroborreliosis by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;30(7):1646-1653.

- Little SE, Beall MJ, Bowman DD, Chandrashekar R, Stamaris J. Canine infection with *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma* spp., and *Ehrlichia* spp. in the United States, 2010–2012. *Parasit Vectors* 2014;7(1):257.
- Margos G, Vollmer SA, Cornet M, Garnier M, Fingerle V, Wilske B, Bormane A, Vitorino L, Collares-Pereira M, Drancourt M, Kurtenbach K. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl Environ Microbiol* 2009;75(16):5410–5416.
- Marques AR. Lyme disease: a review. *Curr Allergy Asthma Rep* 2010;10(1):13–20.
- Masuzawa T, Takada N, Kudeken M, Fukui T, Yano Y, Ishiguro F, Kawamura Y, Imai Y, Ezaki T. *Borrelia sinica* sp. nov., a lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51(5):1817-1824.
- Maxam A, Gilbert W. A new method of sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:560-564.
- Meteoroloji 10. Bölge Müdürlüğü – Samsun. [www.samsun.mgm.gov.tr](http://www.samsun.mgm.gov.tr), 2016.
- Murray TS, Shapiro ED. Lyme disease. *Clin Lab Med* 2010;30(1):311-328.
- Mutlu G, Gültekin M, Ergin Ç, Sayın F, Kurşun AE. Antalya yöresinde *Borrelia burgdorferi* antikorlarının ve vektörlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 1995;29(1):1-6.
- Nadelman RB, Nowakowski J, Fish D, Falco RC, Freeman K, McKenna D, Welch P, Marcus R, Agüero-Rosenfeld ME, Dennis DT, Wormser GP. Prophylaxis with single-dose doxycycline for the prevention of Lyme disease after an *Ixodes scapularis* tick bite. *N Engl J Med* 2001;345(2):79-84.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. [www.ncbi.gov](http://www.ncbi.gov), 2017.
- Norris SJ, Carter CJ, Howell JK, Barbour AG. Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect Immun* 1992;60(11):4662-4672.
- Orkun Ö, Karaer Z, Çakmak A, Nalbantoğlu. Identification of tick-borne pathogens in ticks feeding on humans in Turkey. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8(8):e3067.
- Özdemir C, İnce N. Lyme disease. *J Microbiol Infect Dis* 2014;1:S32-S40.
- Parker JL, White KK. Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. *Cornell Vet* 1992;82(3):253-274.
- Pfister HW, Wilske B, Weber K. Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. *Lancet* 1994;343:1013–1016.
- Picken RN. Polymerase chain reaction primers and probes derived from flagellin gene sequences for specific detection of the agents of Lyme disease and North American relapsing fever. *J Clin Microbiol* 1992;30(1):99–114.

- Polat E, Çalisir B, Yucel A, Tuzer E. Türkiye’de *Ixodes ricinus*’lardan ilk defa ayrılan ve üretilen iki *Borrelia* kökeni. Türk Parazitol Derg 1998;22:167-73.
- Polat E, Turhan V, Aslan M, Müsellim B, Onem Y, Ertuğrul B. First report of three culture confirmed human Lyme cases in Turkey. Mikrobiyol Bul 2010;44(1):133-139.
- Postic D, Martı Ras N, Lane RS, Hendson M, Baranton G. Expanded diversity among Californian *borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp nov. (formerly *Borrelia* group DN127) J Clin Microbiol 1998;36(12):3497–3504.
- Preac-Mursic V, Wilske B, Schierz G. European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks: culture conditions and antibiotic susceptibility. Zentralbl Bakteriolog Mikrobiol Hyg A 1986;263(1-2):112-118.
- Rauter C, Hartung T. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. Appl Environ Microbiol 2005;71(11):7203-7216.
- Richter D, Postic D, Sertour N, Livey I, Matuschka FR, Baranton G. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp nov. Int J Syst Evol Microbiol 2006;56:873–881.
- Rizzoli A, Hauffe H, Carpi G, Vourec HG, Neteler M, Rosa R. Lyme borreliosis in Europe. Euro Surveill 2011;16(27):pii=19906.
- Rosa PA, Schwan TG. A specific and sensitive assay for the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. J Infect Dis 1989;160(6):1018-1029.
- Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH Jr. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. Ticks Tick Borne Dis 2011;2(3):123-128.
- Rudenko N, Golovchenko M, Lin T, Gao L, Grubhoffer L, Oliver JH Jr. Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia americana* sp.nov. J Clin Microbiol 2009c;47(12):3875–3880.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977;74(12):5463-5467.
- Schwan TG, Piesman J. Temporal Changes in Outer Surface Proteins A and C of the Lyme disease-associated Spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the Chain of infection in ticks and mice. J Clin Microbiol 2000;38(1):382-388.
- Schwan TG, Piesman J, Golde WT, Dolan MC, Rosa PA. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92(7):2909-2913.
- Shih CM, Spielman A. Accelerated transmission of Lyme disease spirochetes by partially fed vector ticks. J Clin Microbiol 1993;31(11):2878–2881.



- Skotarczak B, Wodecka B. Molecular evidence of the presence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in blood samples taken from dogs in Poland. *Ann Agric Environ Med* 2003;10(1):113-115.
- Smith FD, Ballantyne R, Morgan ER, Wall R. Estimating Lyme disease risk using pet dogs as sentinels. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2012;35(2):163–167.
- Stanek G, Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet* 2003;362:1639–1647.
- Steere AC. Lyme disease. *N Engl J Med* 1989;321:586–596.
- Steere AC. Lyme disease. *N Engl J Med* 2001;345:115-125.
- Steere AC. Lyme borreliosis in 2005, 30 years after initial observations in Lyme Connecticut. *Wien Klin Wochenschr* 2006;118(21):625–633.
- Strle K, Drouin EE, Shen S, El Khoury J, McHugh G, Ruzic-Sabljić E, Strle F, Steere AC. *Borrelia burgdorferi* stimulates macrophages to secrete higher levels of cytokines and chemokines than *Borrelia afzelii* or *Borrelia garinii*. *J Infect Dis* 2009;200(12):1936-1943.
- Şen E, Uchishima Y, Okamoto Y, Fukui T, Kadosaka T, Ohashi N, Masuzawa T. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks from Istanbul metropolitan area and rural Trakya (Thrace) region of north-western Turkey. *Ticks Tick Borne Dis* 2011;2(2):94-98.
- Talleklint L, Jaenson TG. Relationship between *Ixodes ricinus* density and prevalence of infection with Borrelia-like spirochetes and density of infected ticks. *J Med Entomol* 1996;33:805-811.
- Tuncer P, Yesilbag K, Alpay G, Dinçer E, Gırışgın AO, Aydın L, Uyar Y, Ozkul A. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever infection in domestic animals in Marmara region, Western Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2014;61(1):49-53.
- Vatansever Z. Vektör kenelerin ekolojisi. II. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu, Ankara, Kene Kaynaklı Enfeksiyonlar, 2008; 28-29.
- Vazquez M, Muehlenbein C, Cartter M, Hayes EB, Ertel S, Shapiro EG. Effectiveness of personal protective measures to prevent Lyme Disease. *Emerg Infect Dis* 2008;14(2):210–216.
- Wallich, R, Moter SE, Simon MM, Ebnet K, Heiberger A, Kramer MD. The *Borrelia burgdorferi* flagellum-associated 41-kilodalton antigen (flagellin): molecular cloning, expression, and amplification of the gene. *Infect Immun* 1990;58(6):1711-1719.
- Walker AR, Bouattor A, Camicas J-L, Estrada-Pena A, Horak IG, Latif AA, Pegram RG, Preston PM. Ticks of domestic animals in Africa: a Guide to identification of species. 42 Comiston Drive, Edinburgh EH10 5Q, Scotland, U.K, Bioscience Reports. 2007; 133.

- Wang G, Van Dam AP, Schwartz I, Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:633-653.
- Wilske B. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2003;3(4):215-227.
- Wodecka B, Leonska A, Skotarczak B. A comparative analysis of molecular markers for the detection and identification of *Borrelia spirochaetes* in *Ixodes ricinus*. *J Med Microbiol* 2010;59:309-314.
- Wodecka B, Skotarczak B. First isolation of *Borrelia lusitaniae* DNA from *Ixodes ricinus* ticks in Poland. *Scand J Infect Dis* 2005;37(1):27-34.
- Xu G, Fang QQ, Keirans JE, Durden LA. Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group. *J Parasitol* 2003;89(3):452-457.
- Ye M, Sharma K, Thakur M, Smith AA, Buyuktanır O, Xiang X, Yang X, Promnares K, Lou Y, Yang XF, Pal U. HtrA, a temperature- and stationary phase-activated protease involved in maturation of a key microbial virulence determinant, facilitates *Borrelia burgdorferi* infection in mammalian hosts. *Infect Immun* 2016;84(8):2372-2381.
- Yemişen M, Mete B, Balkan İİ. Lyme hastalığı. *J Exp Clin Med* 2012;29:169-174.
- Yukarı BA, Eren H. *Entomoloji*, Burdur, 2004; 74-76.
- <https://www.envita.com/lyme-disease/lyme-disease-treatment-a-primer-on-monitoring-recovery>, 2017.
- <http://lymediseaseguide.net/lyme-disease-morphology>, 2017.
- <http://www.k-state.edu/parasitology/625tutorials/Tick02.html>, 2017.
- <http://www.merckvetmanual.com/generalized-conditions/lyme-borreliosis/overview-of-lyme-borreliosis>, 2017.
- [http://www.uyduharita.org/wp-content/uploads/samsun\\_sahil\\_haritasi.bmp](http://www.uyduharita.org/wp-content/uploads/samsun_sahil_haritasi.bmp), 2017.
- [www.netkayit.com](http://www.netkayit.com), 2017.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Evrim GENÇ

Doğum Yeri: Elbistan/Kahramanmaraş

Doğum Tarihi: 30.06.1988

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Lisans, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner  
Fakültesi/2013

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: -

E-posta: evrim\_genc46@hotmail.com.tr