



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**MERSİN YÖRESİ'NDE IXODID CİNSİ KENELERDE
ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM'UN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Osman SEZER

ORCID ID: 0000-0002-4938-9761

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. Nuran DELİALİOĞLU**

**MERSİN
ARALIK - 2022**

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written information and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

26/12/2022

Osman SEZER

ÖZET

Mersin Yöresi'nde Ixodid Cinsi Kenelerde *Anaplasma phagocytophilum*'un Moleküler Yöntemle Araştırılması

Anaplasma phagocytophilum, Rickettsiales takımından Anaplasmataceae ailesi üyesi, zorunlu hücre içi Gram negatif pleomorfik bir bakteridir. İnsanlarda granülositleri enfekte ederek İnsan Granülositik Anaplazmoz (HGA)'na neden olmaktadır. *A. phagocytophilum*, insanlara ve rezervuar konakçılara *Ixodid* kenelerle nakledilmektedir. HGA, grip benzeri klinik belirtilerle başlar, immun sistemi sağlıklı bireylerde hastalık kendini sınırlama eğilimindedir. Bağışıklığı baskılanmış bireyler ve 60 yaş üstü hastalarda HGA şiddetlenerek; pansitopeni, çoklu organ yetmezliği ve ölüme neden olabilmektedir. ABD'de 1994'te ilk vaka bildirim yapılmış, hastalığın etkeni 2001 yılında *Anaplasma* soyu içerisinde *Anaplasma phagocytophilum* olarak tanımlanmıştır. ABD'de her yıl vaka bildirim sayısı artış göstermiş, 2019'da 5655 yeni vaka bildirim olmuştur. Anaplazmoz, ABD'nin Hastalık Kontrol ve Önlem Merkezi (CDC) raporlarında önem kazanan hastalıklar arasında değerlendirilmektedir.

Çalışmamızda, Mersin Yöresi'nde ixodid kenelerde *Anaplasma phagocytophilum*'un moleküler yöntemle araştırılması amaçlanmıştır. Tarsus, Erdemli ve Silifke ilçelerindeki üç bölgede 6 yerleşim biriminde 1 Nisan 2020 – 30 Kasım 2020 tarihleri arasında kene toplama çalışması yapıldı. Araştırma alanlarımız farklı iklim özellikleri gösteren bölgelerden seçildi. Belirlediğimiz odaklarda, kenelerin doğal yaşam alanlarından ve evcil hayvanlar (Sığır, Koyun, Keçi)'dan 1497 adet ergin ixodid kene toplandı.

Stereo mikroskopta morfolojik tanımlama çalışmasıyla örneklemimize dahil edilen kenelerin 4 soy içerisinde 11 türde dağılım gösterdiği tespit edildi. Tüm odaklardan yıl içerisinde; *Hyalomma excavatum* 581 adet, *H. marginatum* 102 adet, *H. anatolicum* 16 adet, *H. impeltatum* 3 adet, *H. detritum* supense 2 adet, *Rhipicephalus sanguineus* 258 adet, *R. bursa* 256 adet, *R. turanicus* 100 adet, *Haemaphysalis sulcata* 115 adet, *Dermacentor marginatus* 59 adet ve *D. reticulatus* 5 adet türü kene tespit edildi. Çalışma odaklarımızın iklim yapısının kene tür dağılımına etkili olduğu gözlemlendi. Mevsimlere göre kene yoğunluğunun farklılıklar gösterdiği belirlendi. Örneklemimizdeki keneler; soy, tür, cinsiyet (dişi/erkek), toplandığı odak ve toplanma tarihlerine göre ayrıştırıldı. Hacim ve kütleleri eşitlenmiş 210 adet havuz oluşturuldu.

Tüm kene havuzlarından DNA ekstraksiyonları gerçekleştirildi. *Anaplasma/Ehrlichia* soylarının ortak gen bölgesine hedeflenmiş PZR uygulanarak, 9 (9/210) kene havuzunda soy DNA tespit edildi. *A. phagocytophilum* DNA'sına özgü hazırlanan Nested PZR ve Real time PZR protokolleri tüm kene havuzlarına uygulandı. Çağbaşı- Çiçekli (Tarsus) odağından Temmuz ayında toplanan; *Hyalomma excavatum* türü dişi ergin kenelerden oluşturduğumuz bir havuz ve *Rhipicephalus sanguineus* türü dişi ergin kenelerin bulunduğu bir havuzda olmak üzere 2 (2/210) *A. phagocytophilum* DNA'sı tespit edilirken, diğer 208 kene havuzunda etken DNA'sına rastlanmadı. Çalışmamızda 210 kene havuzunda *A. phagocytophilum* prevalansı %0,95(2/210) olarak tespit edilmiştir. Türkiye'den daha önce bildirilen bazı çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Kappa istatistiğine göre Nested PZR ve Real time PZR yöntemlerinin duyarlılıkları karşılaştırıldığında, kappa sayısı 1,0 ($\kappa=+1$) olarak tespit edilmiş ve iki yöntemin sonuçları birbiri içinde uyumlu ($p<0,001$) bulunmuştur.

Sonuç olarak bu çalışmada Mersin Yöresi'nde *Ixodid* kenelerde *A. phagocytophilum*'un varlığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda tanımlanan kene soyları ve türler, daha önce Mersin Yöresinden bildirilen keneler arasındaydı. Çalışma odaklarımızda kene türlerinin ve yoğunlukları mevsime bağlı olarak değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Farklı iklimsel özellikler gösteren alanlarda planlanan çalışmamızda elde edilen verilerin; kene kaynaklı patojenlerin yayılımı için risk düzeyinin belirlenmesinde ve risk haritalarının oluşturulmasında katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Kenelerde *A. phagocytophilum* DNA'sı tespiti için Real time PZR yönteminin, Nested PZR yöntemlerine göre daha kolay uygulanabildiği, daha hızlı sonuç verdiği ve kontaminasyon riskinin daha az olduğu değerlendirilmektedir. Genetik karakterizasyon çalışmaları için Nested PZR yönteminin daha duyarlı olduğu ve diğer yöntemlere göre tercih edilebileceği değerlendirilmektedir. Çalışmamızda elde edilen veriler, bölgemizde *A. phagocytophilum* ve ixodid kenelerde daha sonra yapılacak çalışmalar için ön bilgi sağlamaktadır. Granulositik Anaplazmoz ve diğer kene kaynaklı hastalıkların risk düzeyinin ortaya konulması için; geniş alanları kapsayan, daha fazla kene türü ile daha uzun süreli çalışmalar yapılmasına ihtiyaç olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Anaplasma phagocytophilum*, İxodid kene, Prevalans, Mersin Yöresi



ABSTRACT

Investigation of *Anaplasma phagocytophilum* by Molecular Method in Ixodid Ticks in Mersin Region

Anaplasma phagocytophilum is an obligate intracellular Gram-negative pleomorphic bacterium, member of the Anaplasmataceae family of the order Rickettsiales. It causes Human Granulocytic Anaplasmosis (HGA) by infecting granulocytes in humans. *A. phagocytophilum* is transmitted to humans and reservoir hosts by ixodid ticks. HGA begins with flu-like clinical symptoms, and the disease tends to be self-limiting in individuals with healthy immune systems. HGA intensifies in immunocompromised individuals and patients over 60 years of age; It can cause pancytopenia, multi-organ failure and death. The first case was reported in the USA in 1994, and the causative agent of the disease was identified as *Anaplasma phagocytophilum* in the *Anaplasma* strain in 2001. The number of case reports has increased every year in the USA, with 5655 new cases reported in 2019. Anaplasmosis is considered among the diseases that gain importance in the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) reports.

In our study, it was aimed to investigate *Anaplasma phagocytophilum* by molecular method in ixodid ticks in Mersin Region. Tick collection study was carried out between 1 April 2020 and 30 November 2020 in 6 settlements in three regions in Tarsus, Erdemli and Silifke districts. Research focuses were selected from regions with different climatic characteristics. In the foci we determined, 1497 adult ixodid ticks were collected from the natural habitats of ticks and domestic animals (Cattle, Sheep, Goat). It was determined that the ticks included in our sample, by morphological identification study under stereo microscope, were distributed in 11 species within 4 lineages. During the year from all foci; 581 *Hyalomma excavatum*, 102 *H. marginatum*, 16 *H. anatolicum*, 3 *H. impeltatum*, 2 *H. detritum*, 258 *Rhipicephalus sanguineus*, 256 *R. bursa*, 100 *R. turanicus*, 115 *Haemaphysalis sulcata*, 59 *Dermacentor marginatus* and 5 *D. reticulatus* ticks were detected. It was observed that the climate structure of our study focuses on the distribution of tick species. It was determined that the tick density varies according to the seasons. Ticks in our sample; ancestry, species, gender (female/male), the focus and date of collection. 210 pools with equal volumes and masses were created.

DNA extractions were performed from all tick pools. By applying targeted PCR to the common gene region of *Anaplasma/Ehrlichia* strains, strain DNA was detected in 9 (9/210) tick pools. Nested PCR and Real time PCR protocols prepared specifically for *A. phagocytophilum* DNA were applied to all tick pools. It was collected from Çağbaşı-çiçek (Tarsus) focus in July; While 2 (2/210) *A. phagocytophilum* DNAs were detected in a pool of *Hyalomma excavatum* female adult ticks and in a pool containing *Rhipicephalus sanguineus* female adult ticks, no causative DNA was found in the other 208 tick pools. In our study, the prevalence of *A. phagocytophilum* was found to be 0.95%(2/210) in 210 tick pools. It was found to be compatible with some previously reported studies from Turkey.

When the sensitivities of Nested PCR and Real time PCR methods were compared according to the kappa statistics, the kappa number was found to be 1.0 ($\kappa=+1$), and the results of the two methods were found to be compatible with each other ($p<0.001$).

As a result, in this study, the presence of *A. phagocytophilum* was detected in Ixodid ticks in Mersin Region. Among the strains and species belonging to the Ixodida family previously reported in our region, 11 ticks belonging to 4 genera were identified in our study. It has been determined that the distribution of tick species and the seasonal distribution of numerical densities in our study focus are different.

It is evaluated that the Real-time PCR method for the detection of *A. phagocytophilum* DNA in ticks can be applied more easily than the Nested PCR methods, gives faster results and has a

lower risk of contamination. It is considered that the Nested PCR method is more sensitive and can be preferred over other methods for genetic characterization studies.

The data obtained in our study provide preliminary information for future studies in *A. phagocytophilum* and ixodid ticks in our region. The data obtained in our study, which was planned in areas with different climatic characteristics; It is thought that it will contribute to the determination of the risk level for the spread of tick-borne pathogens and the creation of risk maps. To determine the risk level of granulocytic anaplasmosis and other tick-borne diseases; It was concluded that there is a need for longer-term studies with more tick species covering large areas.

Keywords: *Anaplasma phagocytophilum*, Ixodid tick, Prevalence, Mersin Region



TEŞEKKÜR

Tıbbi Mikrobiyoloji Doktora eğitimim boyunca yetişmemde, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her türlü yardım ve desteği sağlayan tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Nuran DELIALIOĞLU'na,

Eğitimim süresince, bilgi ve beceremin artmasında, değerli katkıları ve emekleri olan, destek ve anlayışını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Gönül ASLAN'a,

Doktora öğrenim sürecinde bilgi ve desteklerini esirgemeyen Tıbbi Mikrobiyoloji AD öğretim üyesi hocalarım Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK'e, Prof. Dr. Seda TEZCAN ÜLGER'e,

Tez izleme çalışmalarında çok değerli katkıları ve yol göstericiliği için Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Doç.Dr. Mahmut ÜLGER'e

Kenelerin morfolojik teşhisinde ve moleküler çalışmalarda çok değerli bilgilerini paylaşan sürekli desteğini aldığım Çukurova Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD Başkanı ve Biyoteknoloji Enstitüsü Öğretim Üyesi hocam Prof. Dr. Armağan Erdem ÜTÜK'e,

A. phagocytophilum pozitif DNA örneğini sağlayan Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Öğretim üyesi Doç. Dr. Mehmet Fatih AYDIN'a,

İstatiksel analizlerde yardımcı olan Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü'nde görevli Dr. Erdem DANYER'e,

Laboratuvar becerilerime katkısı olan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Uzmanlık araştırma görevlisi doktor asistan hocalarıma,

Doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma ve

Mersin Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda görevli laboratuvar çalışanlarına,

Doktora eğitimim sırasında her türlü destekleri ile tüm süreci benimle birlikte yaşayan eşim ve oğluma bütün değerler adına çok teşekkür ederim.

Osman SEZER

2022

Bu tez çalışması, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2020-1-TP3-4027 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Çalışmalar Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 03/10/2019 tarih ve 1187016 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	1
2.1. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> 'un Sınıflandırmadaki Yeri	4
2.2. <i>Anaplasma</i> Türleri ve Oluşturduğu Hastalıklar	5
2.2.1. <i>Anaplasma marginale</i>	5
2.2.2. <i>Anaplasma centrale</i>	5
2.2.3. <i>Anaplasma bovis</i>	6
2.2.4. <i>Anaplasma platys</i>	6
2.2.5. <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	6
2.3. İnsan Granulositik Anaplazmozunda (HGA) Klinik Durum ve Prognoz	7
2.4. HGA Epidemiyolojisi	9
2.5. <i>A. phagocytophilum</i> Vektörleri ve Rezervuar Konakçıları	10
2.6. Vektör, Konakçı, Patojen ilişkileri	13
2.7. <i>A. phagocytophilum</i> 'un Morfolojik Yapısı	15
2.8. <i>A. phagocytophilum</i> 'un Genomik Özellikleri	15
2.9. <i>A. phagocytophilum</i> 'un Konakçıya Adaptasyonu ve Virulans faktörleri	16
2.9.1. <i>A. phagocytophilum</i> 'un Konakçı Hücre İçi Gelişim Döngüsü	16
2.9.2. Konak Hücrede İnklüzyon Biyogenezi	19
2.9.3. <i>A. phagocytophilum</i> 'un Yüzey Antijenleri P44/ Msp2	20
2.9.4. <i>A. phagocytophilum</i> Sekresyon Sistemi ve AnkA Proteini	20
2.9.5. <i>A. phagocytophilum</i> Tür içi İzolat ve Enfektivite Farklılıkları	21
2.10. Patogenez	22
2.10.1. Konak Hücreye Giriş Mekanizması	22

	Sayfa
2.10.2. Nötrofil Savunmasının Aşılması	23
2.10.3. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Üretiminin Azaltılması	23
2.10.4. Konak Hücre Apoptozunun İnhibisyonu ve Enfeksiyon Gelişimine Etkisi	24
2.10.5. Otofajinin Engellenmesi	25
2.10.6. Konakçı Hücre Sinyallerinin Etkinleştirilmesi ve Tirozin kinaz Aktivasyonu	25
2.11. <i>A. phagocytophilum</i> 'a Karşı Gelişen İmmun Yanıtlar	26
2.11.1. Doğal İmmun Yanıt Tepkisi	26
2.11.2. Kazanılmış bağışıklık	28
2.12. Klinik ve Laboratuvar Tanı	28
2.12.1. Serolojik Tanı	30
2.12.1.1. Persiste Antikorlar	31
2.12.2. PZR ile Laboratuvar Tanısı	31
2.12. 3. Mikroskopik İnceleme	32
2.12.4. İmmunohistokimya ve Kültür Uygulamaları	33
2.13. Tedavi	35
2.14. Korunma ve Kontrol	35
2.14. 1. Keneden Korunma	35
2.14.2. <i>A. phagocytophilum</i> 'a Karşı Aşı Geliştirme Çalışmaları	35
2.14.3. Kene Aşısı Çalışmaları	35
3. MATERYAL ve YÖNTEM	36
3.1. Araştırma Sahası (Odaklar) Belirlenmesi	38
3.2. Saha çalışması (Kenelerin Toplanması)	40
3.3. Laboratuvar Çalışmaları	40
3.3.1. Kene Türlerinin Morfolojik İdentifikasyonu	40
3.3.2. Kenelerin PZR Uygulaması için Gruplandırılması	42
3.4. Kenelerden DNA Ekstraksiyonu	45
3.4.1. DNA Konsantrasyonlarının Eşitlenmesi	46
3.5. <i>Ehrlichia/Anaplasma</i> Soylarının 16S rRNA gen Ortak Bölgesi PZR amplifikasyonu	46
3.5.1. PZR Karışımı Hazırlanması	46
3.5.2. <i>Ehrlichia/Anaplasma</i> Soylarının Ortak Gen Bölgesinden PZR Protokolü	47
3.6. Nested PZR Çalışması	47
3.6.1. Dış Primerlerle PZR Uygulama	48
3.6.2. İç Primerlerle Yuvalanmış (Nested) PZR	49
3.7. Elektroforez Uygulaması	49
3.8. UV Görüntüleme	50
3.9. Msp2 gen bölgesi için Real time PZR çalışması	50

	Sayfa
3.10. Agaroz Jel'den DNA Purifikasyonu ve Dizileme Çalışması	51
4. BULGULAR	49
4.1. Çalışma Bölgesinden Toplanan Kene Türleri ve Dağılımı	49
4.2. Tarsus (Çiçekli-Çağbaşı) bölgesinden toplanan kene örnekleri	53
4.3. Esenpınar – Sömek bölgesinden toplanan kenelerin dağılımı;	54
4.4. Kırobası, Özboynuinceli bölgesinden toplanan kenelerin dağılımı;	54
4.5. <i>Anaplasma</i> ve <i>Ehrlichia</i> soylarınının 16S rRNA geninin ortak bölgesi EHR primer setiyle PZR Çalışması Sonuçları.	57
4.6. <i>A. phagocytophilum</i> Msp2 Gen Bölgesinin Real time PZR Çalışma sonuçları	58
4.7. Nested PZR Çalışması Sonuçları	59
4.7.1. <i>Anaplasma / Ehrlichia</i> 16S rRNA ortak bölgesi (EC primer setiyle) PZR sonuçları	59
4.7.2. <i>A. phagocytophilum</i> Nested PZR Çalışması Sonuçları	60
4.8. <i>A. phagocytophilum</i> DNA'sı Pozitif Bulunan Odak ve Kene Bilgileri	61
4.1.10. İstatistik Analiz	61
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR	73
EK 1. Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Raporu	79
ÖZGEÇMİŞ	82

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. <i>Anaplasma</i> ve <i>Ehrlichia</i> türleri, konakta yerleştikleri yerler yaptığı hastalıklar, vektörleri ve rezervuar konakçıları	12
Tablo 3.1. Kene toplanan odakların coğrafik konum bilgileri	38
Tablo 3.2. Tarsus (Çağbaşı – Çiçekli,) Odağı Kene Havuzları	41
Tablo 3.3. Esenpınar-Sömek odağı kene havuzları	42
Tablo 3.4. Kirobası-Özboynuinceli (Silifke) odağı kene havuzları	44
Tablo 3.5. <i>Ehrlichia/Anaplasma</i> soylarının 16S rRNA gen bölgesine ait primerler	47
Tablo 3.6. <i>A. phagocytophilum</i> 'un 16S rRNA gen bölgesine spesifik Nested PZR primerleri	48
Tablo 3.2. Örneklemedeki kenelerin tür dağılımı	41
Tablo 4.1. Çalışma odaklarından toplanan kenelerin dağılımı (soy, tür, cinsiyet)	52
Tablo 4.5. İstatistik analiz tablosu (Bölge, Tür, Cinsiyet, Yıl içi dağılım)	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Anaplasma</i> soyu üyelerinin filogramı.	5
Şekil 2.2. <i>A. phagocytophilum</i> 'un suş çeşitliliği, konakçı duyarlılığı ve kene-memeli bulaşma döngüsü	12
Şekil 2.3. <i>A. phagocytophilum</i> 'un Konakçı Hücre İçi Gelişim Döngüsü	16
Şekil 2.4. <i>Anaplasma spp.</i> ve <i>Rickettsia spp.</i> Konak hücredeki yaşam döngüleri.	17
Şekil 2.5. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> DC ve RC formlarının elektron mikroskobik görüntüsü.	17
Şekil 2.6. HGA'da laboratuvar tanı yöntemleri etkinliği.	30
Şekil 2.7. Periferik kan yaymasında granülositte <i>A. phagocytophilum</i> morula yapısı.	33
Şekil 2.8. Immunohistokimyasal boyama ile dalakta <i>A. phagocytophilum</i> morulaların (kırmızı) görünümü	34
Şekil 3.1. Kenelerin toplandığı araştırma sahası haritası	38
Şekil 3.2. Hayvanlardan ve sahadan kene toplama çalışmaları	40
Şekil 3.3. Stereo mikroskopta kene tanımlama çalışması	40
Şekil 3.4. Elektroforez cihazı ve tankı	50
Şekil 3.5. UV görüntüleme cihazı	50
Şekil 4.1. Örneklerdeki kenelerin tür dağılım grafiği	56
Şekil 4.2. Tarsus (Çiçekli-Çağbaşı) bölgesinden toplanan kenelerin yıl içi dağılımı	53
Şekil 4.3. Esenpınar - Sömek bölgesinden toplanan kenelerin yıl içi dağılımı	54
Şekil 4.4. Kırbaş, Özboynuinceli bölgesinden toplanan kenelerin yıl içi dağılımı;	55
Şekil 4.5. Kene tür ve cinsiyetleri (Çalışmamızdan Orijinal fotoğraflar)	57
Şekil: 4.6. <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> soylarının ortak gen bölgesi EC primer setiyle PZR sonuçları	57
Şekil 4.7. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> Msp2 geni Rt-PZR sonuçları	58
Şekil 4.8. <i>A. phagocytophilum</i> Rt-PZR erime eğrileri (Melting curve) grafiği	59
Şekil 4.9. <i>Anaplasma / Ehrlichia</i> 16S rRNA ortak gen bölgesi PZR sonuçları	60
Şekil 4.10. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> 'un Nested (Yuvalanmış) PZR ikinci basamak sonuçları	61
Şekil 4.11. <i>A. phagocytophilum</i> pozitiflik tespit edilen lokasyonlar	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltma/Simge	Tanım
AnkA	Çoklu Ankirin tekrarları içeren efektör protein A
ARDS	Akut Solunum yetmezliği Sendromu
bç	Baz çifti
CDC	ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi(Centers for Disease Control and Prevention)
CGA	Köpek Granulositik Anaplazmozis (canine granulocytic anaplasmosis)
CGE	Köpek granulositik erlişiyozu
CME	Köpek monositik erlişiyozu
CRP	C- Reaktif Protein
CELISA	Kompetitif ELISA
DIC	Damar içi yaygın pıhtılaşma
DNA	Deoksi ribo nükleik asit
dNTP	Deoksinükleosid trifosfat
EGA	Atların granulositik anaplazmozis
EGE	Atların granulositik erlişiyozu
EI	Enzyme immunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EM	Erythema migrans
ESCAR ESCMID	Coxiella, Anaplasma, Rickettsia ve Bartonella Çalışma Grubu
ESCCAR	Avrupa Chlamydia, Coxiella, Anaplasma ve Rickettsia Topluluğu
groEL	Refakatçi protein kodlayan gen
HGA	İnsan Granulositik Anaplazmozis
HGE	İnsan Granulositik Erlişiyozu
HME	İnsan monositik erlişiyozu
IFA:	İmmun Floresan Antikor Testi uygulaması
IFN- γ	İnterferon gama
IgG:	İmmunoglobulin G
IgM	İmmunoglobulin M
IV	İntravenöz
κ	Cohen'in kappa katsayısı
Kb	Kilobaz
KCl	Potasayum Klorür
kD	Kilo Dalton
kg :	Kilogram

Kısaltma/Simgesi	Tanım
LB	Lyme borreliosis
M	Molar
Mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
ml	Mililitre
mM	MiliMolar
µl	Mikrolitre
msp1, 2, 3, 4	Major yüzey proteinleri 1, 2, 3, ve 4
MODS	Çoklu organ disfonksiyonu
Mg	Mikrogram
OTC	Oksitetrasiklin
P44	Protein p44
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PO	Oral yolla tedavi
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
RES	Retikülo endotelial sistem
rRNA	Ribozomal RNA
rrs	16S rRNA (16S ribosomal RNA gene)
s.l.	sensu lato
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SIRS	Sistemik inflamatuvar yanıt
SPSS	SPSS bilgisayar programı (Statistical Package for the Social Sciences)
TBE	Kene kaynaklı ensefalit
TBF	Kene kaynaklı ateş
TBP	Kene kaynaklı patojen
TE	Tris EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
UV	Ultraviyole



1. GİRİŞ

Anaplasma phagocytophilum, Rickettsiales takımından Anaplasmataceae ailesi üyesi, zorunlu hücre içi Gram negatif bir bakteridir. İnsanlarda granülositleri enfekte ederek İnsan Granülositik Anaplazmoz'una (Human Granulocytic Anaplasmosis, HGA) neden olmaktadır. *A. phagocytophilum*, insanlara ve rezervuar konakçılara *Ixodid* kenelerle nakledilmektedir. HGA, Grip benzeri klinik belirtilerle başlar, immun sistemi sağlıklı bireylerde kendini sınırlama eğilimindedir. Anaplazmoz, immun supresif hastalar ve yaşlılarda şiddetlenerek; pansitopeni, çoklu organ yetmezliği, multisistemik klinik sendromlar ve ölüme neden olabilir [1].

A. phagocytophilum, kedi, köpek ve atlarda Granülositik Anaplazmoz etkenidir. Geviş getiren hayvanlarda ise kene kaynaklı ateş (Tick Borne Fever, TBF)'e neden olan zoonotik bir ajandır. Sığırlarda TBF'in etkeni ilk olarak 1932'de İskoçya'da tanımlanmıştır. 1969'da ABD'de atlarda TBF benzeri belirtilerle seyreden bir hastalık bildirilmiştir. Köpeklerde 1971 ve 1982'de TBF benzeri bir hastalık için iki farklı granülositik etken tespit edilmiştir [2].

İlk olarak Wisconsin'de ve daha sonra Kuzey Minnesota'da Erlişiyoz'dan şüphe edilen 6 hastadan ikisi; baş ağrısı, miyalji, artralji, akut böbrek yetmezliği, trombositopeni ve koagülopati ile karakterize bir hastalık sonucu ölmüştür. Ölen hastaların kan kültürleri negatif bulunmuş ve birinin dalak granulositlerinde intra-sitoplazmik inklüzyonlar tespit edilmiştir. Sonraki yıllarda başka hastalarda benzer klinik belirtiler ve laboratuvar bulguları görülmüş ve bazıları kene ısırığı bildiriminde bulunmuş ancak klinik belirtilerin kene ısırığından değişken bir zaman diliminden sonra (2-11 gün) ortaya çıktığı bildirilmiştir. Bir hastadan, nükleotid dizileme çalışması yapılmış, etkenin *Ehrlichia phagocytophila* ve *Ehrlichia equi* ile sırasıyla %99.9 ve %99.8 benzer olduğu tespit edilmiş ve ilk olarak 1994'te İnsan granulositik erlişiyozu (HGE) bildiri yapılmıştır [3].

Ribozomal RNA gen sekansı homolojilerine göre 2001 yılında yapılan sınıflandırmada HGA etkeninin, geviş getiren hayvanlarda patojen olan *Cytoecetes phagocytophila* veya *Ehrlichia phagocytophila* ile atlarda granulositik erlişiyozis etkeni olan *Ehrlichia equi*'nin, aynı türün farklı varyantları olduğu belirlenmiştir [4].

Anaplasmataceae familyası; alfaproteobakteri sınıfında yer almaktadır. Zorunlu hücre içi Gram negatif bakterilerdir. Nükleotid dizi benzerliği, fenotipik ve eko-biyolojik özelliklerine göre Anaplasmataceae familyası; Ehrlichia, Anaplasma, Neorickettsia, Aegyptianella ve Wolbachia ile daha az çalışılmış olan "Candidatus Neoehrlichia" ve "Candidatus Xenohalictis" soylarını içine alır. Bu cinslerin tümü, spesifik omurgasız konakçıları (keneler, böcekler, trematodlar, nematodlar veya yumuşakçalar) enfekte etmektedir [4].

Anaplasma türleri tropik ve subtropik iklim kuşağındaki bölgelerde insanlarda ve memeli hayvanlarda Anaplasmoza neden olmaktadır [5]. Anaplazmoz'un bulaşma kaynaklarının belirlenmesi için, klinik olgular üzerinde yapılan retrospektif bir çalışmada, en sık bulaş kaynağının kene ısırığı ile (%60,9) olduğu, daha sonraki en yüksek bulaşma yolu ise bağışıklığı baskılanmış hastalara kan transfüzyonu ile (%8,4), daha az ise transplasental ve temas yoluyla gerçekleştiği tespit edilmiştir [6].

İnsanlara ve hayvanlara *A. phagocytophilum*'un bulaştırılmasında çeşitli bölgelerde *Ixodes* spp. farklı türleri vektör olarak tanımlanmıştır. ABD'de Kuzeybatı ve Yukarı Ortabatı'da *Ixodes scapularis*; Pasifik Kuzeybatısında *Ixodes pacificus*; Avrupa'da *Ixodes ricinus*'un vektörlüğü kanıtlanmıştır. Ayrıca *İxodida* ailesindeki diğer soylarla da bulaşma olmaktadır. Bir kısmı patojenleri doğrudan insanlara bulaştırırken bir kısmı hayvanlara ve bir bölümünü ise hayvan ve insanlara ortak olarak nakletmektedirler. Dünyada birçok hastalık etkeninin vektörü ve rezervuar konakçısı kenelerdir [7].

Keneler, Arachnida sınıfında; *Argasidae* familyası 5 soy (*Antricola*, *Argas*, *Carios*, *Ornithodoros*, *Otobius*) içerisinde 208 tür, *Nuttalliellidae* ailesi 1 tür, *İxodidae* ailesi 14 soy (*Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Cornupalpatum*, *Compluriscutula*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor* ve *Rhipicephalus*) içerisinde 722 türden oluşur. *İxodidae* ailesinde bulunan kene türleri aynı zamanda en fazla sayıda farklı patojen etkeni taşımak ve konakçalarına bulaştırmaktan sorumludur [8]. Türkiye'de *İxodid* kenelerin 32 türünün var olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Kırsal alanlarda yaşayan, doğayla ve hayvanlarla teması olan kişiler kene tutunmasına ve kene kaynaklı patojenlere maruz kalabilmektedir [9].

Anaplasma enfeksiyonunun dünyadaki insidans ve prevalansı bilinmemektedir. CDC raporlarına göre ABD'de 2020 yılına kadar toplam klinik vaka sayısı 41997'dir. ABD'de HGA insidansının 2000 ile 2010 arasındaki on yıllık periyotta bir milyon insan için, 1,4 ten 6,1 e çıktığı tahmin edilmektedir [10]. Klinik belirti göstermeyen gruplarda yapılan kesitsel seroprevalans çalışmalarında kuzeybatı Wisconsin'de nüfusun yaklaşık %15'i, Connecticut'ta ve ABD askerleri arasında %1'inde seropozitiflik saptanmıştır. Slovenya nüfusunun %17'si ve İsveç'in Koster Adalarında yaşayan nüfusun %12'sinde *A. phagocytophilum* antikor pozitif bulunmuştur. Bu tablo enfeksiyonun sıklıkla subklinik seyrettiğini akla getirmektedir [10].

Anaplazmoz, en çok 43-60 yaş grubu insanlarda görülür. Klinik belirtiler çok değişken olup, birçok hastalığı taklit edebilmektedir. Klinik prognoz immun sistemi baskılanmış hastalar ile yaşlı hastalarıda ağırlaşma eğilimindedir. Çoğunlukla gribal enfeksiyon benzeri belirtiler görülmesi nedeniyle yaşa bağlı hastalıklar ya da diğer tıbbi durumlarla yorumlanabilmektedir. HGA erkeklerde kadınların iki katı kadar fazla görülmektedir. Hastalığın ortalama kuluçka süresi

kenelerin ısırmasından sonraki 5 ile 11 gündür. *A. phagocytophilum* enfeksiyonu sonrası az sayıda bireyde klinik belirti oluşur. HGA hastalarının tamamında ateş görülür. Kas ağrısı, baş ağrısı ve halsizlik hastaların çoğunda rastlanan belirtiler iken; daha az olarak da gastrointestinal sistem etkileri, solunum sistemi veya merkezi sinir sistemi tutulumu görülür. Döküntü hastaların %11'inden daha azında gözlenir. Çoğu hastada hastalığın erken dönemi boyunca; lenfopeni, lökopeni, trombositopeni ile birlikte serum transaminaz aktivitelerinde artış görülür. Hematolojik anormallikler antimikrobiyal tedaviden önce normale dönebilir ve lenfositoz enfeksiyonun ilk haftasından sonra gözlenebilir [11].

İnsanlarda Anaplazmoz genellikle hafif belirtilerle seyreder veya sıklıkla subklinikdir. Bununla birlikte bazı hastalarda, ciddi sitopeniler, karaciğer fonksiyon testlerinde yükselme, koagülopati, böbrek yetmezliği ve hatta ölüm görülebilir. Klinik belirtileri olan hastaların yarısında hastaneye yatış gerekmektedir. HGA'nın ciddi komplikasyonları; organ yetmezliği ile birlikte toksik şok benzeri bir durum, erişkin respiratuvar distres sendromu ve fırsatçı enfeksiyonlardır. Ayrıca vertigo, fasiyal paralizi, periferik nöropati, pankardit, yaygın intravasküler koagülasyon, perikardiyal effüzyon ve tamponad görülebilen diğer komplikasyonlardır. Anaplasma enfeksiyonunda menenjit bildirilmemiştir [12].

Hastalanan kişilerde ölüm oranı %1 kadardır. Avrupa'da en az altı ölüm vakası, Anaplazmoz ile ilişkilendirilmiştir. Bu hastaların en az üçünün kandida özafajiti, kriptokok pnömonisi, invaziv pulmoner aspergilloz ve herpes özafajiti gibi fırsatçı enfeksiyonlara sahip olduğu belirlenmiştir. İnsan Granulositik Anaplazmozunu genellikle kendini sınırlar, tedavi ile 1-2 günde geçebilir, tedavisiz 60 gün kadar sürebilir, kronik formu bildirilmemiştir [13].

Anaplasmataceae ailesinin bu üyesi zorunlu hücre içi bakteridir ve hücre dışı kültür ortamında üretilmediği düşünülmektedir. Kan kültürü gibi rutin mikrobiyolojik teşhis yöntemleriyle tespit edilemez. Riketsiyeminin düşük olduğu durumlarda insanlarda hastalık oluşturan *Anaplasma spp.*'nin mikroskopik muayene ile teşhis duyarlılığı oldukça düşüktür. Serolojik tanı testlerinde *Anaplasma* türleri arasında çapraz pozitif reaksiyonlar oluşmaktadır. Serolojik tanı testleriyle *Anaplasma sp.* olarak sonuç alınabilir, ancak türlerin ayırımında çok yetersiz kalmaktadır. *Anaplasma* türlerinin tespitinde özgüllük ve duyarlılığı en yüksek olan tanı yöntemleri, moleküler tanı yöntemleridir [14].

A. phagocytophilum'un başlıca vektörü *Ixodes* soyuna ait kenelerdir. Bazı çalışmalarda İxodidae familyasında bulunan başka soylara ait kenelerin (*Rhipicephalus*, *Hyalomma*) de *Anaplasma* türlerini naklettiği ortaya konulmuştur [15].

Mersin Yöresi, Akdeniz kıyısında yer almaktadır. Köppen-Trewartha iklim sınıflandırmasına göre Mersin Yöresi; subtropikal iklim özelliklerine sahiptir. Kışları ılıman,

yazları çok sıcak ve kuraktır. Rakım yükseldikçe bağıl nem oranı azalmakta, karasal iklim geçişi görülmektedir. Bu iklim özellikleri nedeniyle birçok kene türünün bulunmasına elverişli olan bir bölgedir. Bu çalışmada Mersin Yöresi'nden toplanan ixodid kenelerde *A. phagocytophilum*'un moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. *Anaplasma phagocytophilum*'un Sınıflandırmadaki Yeri

Anaplasma Cinsine (Rickettsiales: Anaplasmataceae) ait bakteri türleri, omurgalı konakçıları ve/veya insanları enfekte ederek çeşitli düzeylerde hastalığa neden olabilmektedir. Anaplasmataceae familyası üyesi olan *Anaplasma phagocytophilum*, küçük (yaklaşık 0,4 x 1,5 µm), pleomorfik Gram olumsuz bakterilerdir [4]. *Anaplasma* soyuna bağlı türler daha önce biyolojik karakterlerine göre tanımlanmış, ancak daha sonra 16S rRNA geni ve yüzey proteinlerinin analizine göre sınıflandırmada bazı değişiklikler yapılmıştır. *A. phagocytophilum*'un "Systema Naturae 2000" deki taksonomik yeri aşağıya çıkartılmıştır [4].

Biota

Alan (Domain): "Bacteria" [Haeckel 1894] C.R. Woese et al. 1990

Şube (Phylum): "Proteobacteria" Garrity et al. 2005

Sınıf (Class): *Alphaproteobacteria*, Garrity et al. 2006

Takım (Order): *Rickettsiales*, Gieszczykiewicz 1939

Aile (Family): *Anaplasmataceae*, Philip 1957

Cins (Genus): *Anaplasma*, Theiler 1910

Anaplasma phagocytophilum [Foggie 1949] Dumler et al. 2001

Anaplasma centrale (Theiler 1911) Ristic&Kreier 1984

Anaplasma marginale, Theiler 1910

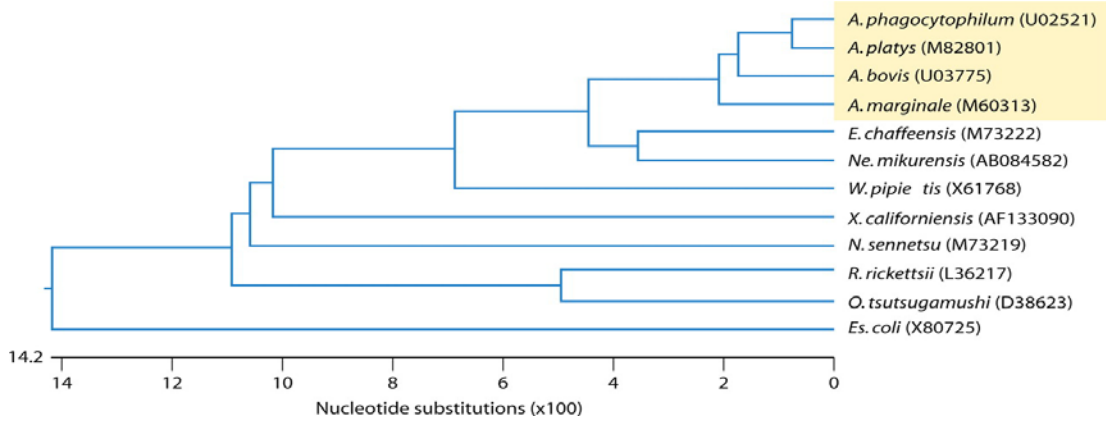
Anaplasma bovis, [Donatien&Lestoquard 1936]Dumler et al 2011

Anaplasma ovis, Lestoquard 1924

Anaplasma caudatum[Kreier &Ristic 1963] Ristic&Kreier 1984

Anaplasma platys, Dumler et al. 2001

(<http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?src=0&id=111428>)



Şekil: 2.1. *Anaplasma* soyu üyelerinin filogramı.

Anaplasma soyu üyelerinin MegAlign programı kullanılarak, Clustal W yöntemiyle 16S rRNA dizi hizalamasına göre oluşturulan filogramı GenBank erişim numaraları parantez içinde gösterilmiştir [16].

2.2. *Anaplasma* Türleri ve Oluşturduğu Hastalıklar

2.2.1. *Anaplasma marginale*

Anaplasma marginale, çoğunlukla geviş getirenler olmak üzere yüksek omurgalıların eritrositlerine yerleşen zorunlu hücre içi bakterilerdir. Kene ısırıkları veya enfekte hayvanlardan sokucu sineklerle hassas sığırlara mekanik olarak taze kan transferi veya kontamine iğneler, boynuz kesme ve hadım etme ekipmanı kullanımı sırasında bulaşabilir. *A. marginale* gebelerde transplental olarak fetüse geçer [16]. Her yaşta sığır, *A. marginale* enfeksiyonuna duyarlıdır. Hastalığın şiddeti yaşla birlikte artar. Herhangi bir yaşta sığır *A. marginale* ile enfekte olup, akut dönemi geçirenler, yaşamı boyunca düşük seviyeli riketsiyemi ile enfekte ve bakterinin rezervuar konakçısı olur. *A. marginale*, yoğun olarak tropikal ve subtropikal bölgelerde kene kaynaklı bir patojen olmakla birlikte, bu bölgelerle bağlantısı olan coğrafik bölgeler ile Avustralya, Güney Afrika, Avrupa gibi dünyanın diğer bölgelerinde de görülür. Hastalığın teşhisi, akut enfeksiyon sırasında hayvanlardan kan yayma preparatlarında *A. marginale*'nin gösterilmesiyle yapılabilir, ancak asemptomatik veya taşıyıcı hayvanlarda enfeksiyonu tespit etmek için duyarlı değildir. Asemptomatik dönemlerde, moleküler tespit yöntemleriyle doğrulama ve antikorların serolojik olarak gösterilmesiyle teşhis edilir. Sığır anaplazmozuna yönelik kontrol önlemleri; *A. marginale* bulaşık olmayan sürülerin korunması, vektör kontrolü, antibiyotik uygulaması ve aşılama olarak sıralanabilir [17].

2.2.2. *Anaplasma centrale*

Ruminantların eritrositleri içinde ortasına yerleşmektedir. *A. centrale* dünya üzerinde çok yaygın olarak bulunmaktadır. *A. centrale* morfolojik, eritrosit içerisindeki yerleşimi ve virülansdaki farklılıklara rağmen *A. marginale* ile benzerlik gösterir. *A. centrale*'nin, *A. marginale*'ye göre daha az patojen olduğu birçok araştırmada bildirilmiştir [18].

Anaplasma centrale infeksiyonlarından sonra iyileşen hayvanlarda immun yanıt gelişir. Bundan dolayı *A. centrale*, hayvanlarda *A. marginale* infeksiyonlarına karşı canlı aşılardan hazırlanmasında kullanılmaktadır. Afrika'da, Avustralya'da, Latin Amerika'da ve İsrail'de sığırlar için Anaplasmozis aşısı üretilmektedir [19].

2.2.3. *Anaplasma bovis*

Sığırlarda 'Monositik Anaplasmosis' hastalığına neden olur. Etken monositleri enfekte eder. Buzağılarda ve erişkin sığırlarda hastalığın klinik belirtileri çok belirgindir. Önemli klinik belirtiler; güçsüzlük, belirgin kilo kaybı, yüksek ateş, preskapular lenf yumrularında büyüme, mukoz membranlarda solgunluk ve çoğu zaman mukus salgısının artması olarak sıralanabilir [17]. *A. bovis*, esas olarak sığırlarda saptanmakta, ancak muhtemelen bu bakterinin rezervuar konakçıları küçük memelilerdir [19].

2.2.4. *Anaplasma platys*

Anaplasma platys, kahverengi köpek keneleri *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* tarafından yayıldığı belirtilmektedir. *A. platys* köpeklerde dolaşımında bulunan trombositleri tutar. Köpeklerde döngüsel trombositopeniye (Canine Cyclic Trombositopeni, CCT) neden olur. Hastalığın klinik semptomları köpeğin türüne göre değişir, ancak temel olarak CCT hayvanda zayıflama, uyuşukluk, iştahsızlık, solunum güçlüğü, ateş, mukus salgısında artış, pürülan oküler akıntı, splenomegaliye neden olur. Enfekte köpeklerde hafif-orta klinik belirtiler olmasına rağmen, diğer patojenlerle çoklu enfeksiyonlarda ciddi trombositopeniye yol açabilir [20]. *Rhipicephalus sanguineus*, aynı zamanda *E. canis*'in de vektörü olduğu için, *E. canis*'le koenfeksiyonlarında çok şiddetli seyredir [20].

2.2.5. *Anaplasma phagocytophilum*

İskoçya'da Granülositik bir etkenin sığırlarda kene kaynaklı ateş (TBF) hastalığına neden olduğu ilk defa 1932'de tanımlanmıştır. 1969'da ABD'de atlarda granülositik etkenin neden olduğu TBF benzeri belirtilerle seyreden hastalık bildirilmiş, 1971 ve 1982'de köpeklerde benzer bir hastalık için iki farklı granülositik etken tespit edilmiştir [2]. İnsanlarda Human Granülositik Erlişiyozis (HGE) CDC tarafından 1994'te ilk bildirim yapılmıştır [3]. 2001 yılında ribozomal RNA gen sekansı homolojilerine göre yapılan sınıflandırmada, İnsan Granülositik Anaplasmosis (HGA, HGE) etkeninin, geviş getiren hayvanlarda patojen olan *Cytoecetes phagocytophila* veya *Ehrlichia phagocytophila* ile atlarda Granülositik Erlişiyozis etkeni olan *Ehrlichia equi*'nin, aynı türün farklı varyantları olduğu belirlenmiştir [4].

A. phagocytophilum Avrupa'da yaygın kene kaynaklı patojenler arasındadır ve kuzey yarım kürede yaygın olarak rapor edilmektedir. *A. phagocytophilum* ve ana vektörü olan *Ixodes ricinus*'un yayılımı Kuzey Amerika, Asya ve Avrupa coğrafyasının neredeyse tamamını kapsayan enlem ve yüksekliklerde artmaktadır [21]. ABD ve Avrupa'da atlarda EGA vakaları bildirilmiştir. Semptomların çoğu insanlardakilerle benzer olarak; ateş, halsizlik, iştahsızlık, ataksi, sarılık, bacak ödemleri, trombositopeni, anemi ve lökopeni olarak sıralanmaktadır. Nörolojik semptomlar da bildirilmiştir [23].

Köpeklerde CGA halsizlik, uyuşukluk, ateş, iştahsızlık, isteksizlik gibi klinik belirtilere eşlik eden lenfadenomegali, hepatomegali ve splenomegali tanımlanmıştır [24].

Kedilerde, tüm vakalarda uyuşukluk ile birlikte ateş ve anoreksi bildirilmiştir [25]. Lenfopeni, trombositopeni, nötropeni ve daha az olarak lökopeni görülmüştür. Bazı kedilerde ataksi, konjonktivit ile hepatosplenomegali gözlenmiştir [25].

A. phagocytophilum, insanlarda Human Granulocytic Anaplasmosis (HGA) hastalığının etkenidir. HGA, multisistemik bir hastalıktır. Gripe benzer klinik belirtiler gösterdiği için hastalığın teşhisi zordur. Anaplazmoz çoğu zaman tek başına yaşamı tehdit eden bir hastalık olarak görülmesede; böbrek yetmezliği, intravasküler pıhtılaşma, kardiyomegali, nöbetler veya koma gibi komplikasyonlar gelişen vakaların tümü ölümcül olabilmektedir. İmmüno-supresif ilaçlar aldıktan sonra hastalanan yaşlılar ve çocuklarda komplikasyon riski ve klinik tablonun ağır seyretme olasılığı artmaktadır [22]. Enfekte insanların yaklaşık %40'ının hastaneye kaldırılması gerektiği tahmin edilmektedir. Erken tespit edilen olgular tedavi edilebilmektedir. ABD'de ölüm oranı %0,7-1 düzeyindedir, Avrupa'da ölümcül vaka bildirilmemiştir [21].

Anaplazmoz'un insanlarda ortalama kuluçka süresi kenelerin ısırmasından sonraki 5 ile 11 gündür ve hastalık en çok 43-60 yaşlarında görülür. Hastalık erkeklerde kadınların iki katı

kadar fazladır. Kene kaynaklı bazı hastalıklarda medyan yaşı 40'larda iken (örneğin Lyme hastalarının medyan yaşı yaklaşık 40'tır), Anaplazmoz'da medyan yaşı; 50 ila 60 yaş arasında değerlendirilmektedir [22].

2.3. İnsan Granulositik Anaplazmozunda (HGA) Klinik Durum ve Prognoz

İnsanlarda Anaplazmoz çoğu zaman subklinik olarak seyreder, az sayıda bireyde akut klinik belirtiler görülür. Seroepidemiolojik çalışmalar, asemptomatik/subklinik olguların yoğun olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, yaşlı bireylerde ve başka hastalıklarla koenfeksiyonlar veya bağışıklığı baskılanmış hastalarda; yüksek ateş, titreme, genel miyaljiler ve şiddetli baş ağrısı ile karakterize akut, grip benzeri bir hastalık gelişebilir [26].

Hastalığın belirtileri enfekte kenenin ısırmasından 1-2 hafta sonra başlar. Tüm hastalarda ateş (>38.5°C), kas ağrısı, baş ağrısı ve halsizlik görülür. Gastrointestinal sistem bulguları (bulantı ve kusma) veya solunum güçlüğü (nefes almada zorluk) karaciğer tutulumu (yüksek hepatik transaminazlar), solunum sistemi veya merkezi sinir sistemi tutulumları ile daha az karşılaşılmaktadır. CDC raporlarında hastaların %11'inden daha azında döküntü gözlemlendiği belirtilmektedir [13]. Klinik prezentasyon genellikle akut (2-11 gün) nonspesifik ateşli enfeksiyondur. Bazılarında artralji, merkezi sinir sistemi belirtileri (konfüzyon, nörolojik problemler), ciltte döküntü (eritemli, kaşıntısız) hastaların çok azında ortaya çıkabilir. Trombositopeni ve/veya lökopeni ile başvuran kene maruziyeti olan hastalarda HGA'dan şüphelenilmelidir. Hematolojik olarak lenfopeni, lökopeni, trombositopeni ve hastalığın erken dönemi boyunca çoğu hastada serum hepatik transaminaz konsantrasyonları genellikle iki ile dört kat artar ve akut dönemde C-reaktif protein (CRP) ve eritrosit sedimentasyon hızı gibi inflamatuvar belirteçler yükselir. Enfeksiyonun ilk haftasından sonra lenfositoz gözlemlenebilir, hematolojik anormallikler antimikrobiyal tedaviden önce normale dönebilir [27]. Klinik hastalık dönemi 7 günden daha uzun süren olgularda laboratuvar bulguları normal aralığa dönebilir ve bu da klinik karar verme sürecini zorlaştırabilir [23].

Anaplazmoz'un en ciddi komplikasyonları; organ yetmezliği ile birlikte toksik şok benzeri hastalık tablosu, ileri yaşlı hastalarda respiratuvar distres sendromu ve fırsatçı enfeksiyonlardır. *Anaplasma* enfeksiyonlarında menenjit bildirilmemiştir. Vertigo, fasiyal paraliz, periferik nöropati, pankardit, dissemine intravasküler koagülasyon, perikardiyal effüzyon ve tamponat gibi komplikasyonlar görülebilir [28].

Enfeksiyona eşlik eden çoklu organ hasarı sonucunda gelişen; Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS), çoklu organ disfonksiyon sendromu (MODS), yetişkin respiratuvar distres

sendromu (ARDS), yaygın intravasküler koagülopati (DIC) gibi sistemik bozuklukları olan hastalarda ölümler kümelenmektedir. *A. phagocytophilum* soğutulmuş transfüzyon kanında bir hafta canlı kalmaktadır. Enfekte kanların verildiği hastalarda görülen ölümler Granulositik Anaplazmoz'la ilişkilendirilmektedir [28].

Avrupa'dan bildirilen vakaların klinik tablolarının ABD'de bildirilenlerle benzer olduğu, ancak Avrupa'daki Anaplazmoz vakalarının genellikle daha hafif seyrettiği bildirilmektedir. Farklı klinik tabloların ortaya çıkmasına sebep olan patogenezi ile korele olabilecek suş heterojenliğine dair kanıtlar sunulmuştur. *A. phagocytophilum*'un farklı izolatlarının konak tercihinde farklılıklara neden olduğu belirtilmektedir. Avrupada görülen Anaplazmoz vakalarının çoğunun özel tedaviye gerek kalmadan 2 haftada iyileştiği belirtilmiştir. Bir kısım vakalar ise hafif klinik belirtilerle veya asemptomatik bir enfeksiyon olarak ortaya çıkmaktadır [22].

2.4. HGA Epidemiyolojisi

A. phagocytophilum'un konakçı popülasyonları içinde yayılmasında; bakteriye ait özellikler, duyarlı konakçı, uygun vektörler ile vektörlerin bakteriyi iletme yeteneği en önemli faktörlerdir. Bunun yanı sıra konakçı ve/veya vektör popülasyon yoğunluğundaki ve/veya bunların dağılım alanlarındaki artışlar bakterinin coğrafik yayılımını teşvik edebilir [5]. ABD'de Anaplazmoz ilk olarak 1994 yılında insan hastalığı olarak kabul edilmiş [2] ve 1999'da bildirim zorunlu hastalıklar listesine dahil edilmiştir [11].

Anaplazmoz her iki cinsiyette, her yaşta ortaya çıkabilir; ancak 40 yaş üstü erkeklerde daha sık görülür. Erkeklerin enfeksiyon kapma riski kadınlara göre 1,4 kat daha yüksek bulunmuştur. Vaka ölüm oranı genellikle %1'den azdır. *Anaplasma* enfeksiyonunun dünyadaki yayılımı ve yıllık yeni hasta insidansı bilinmemektedir. Kuzeybatı Wisconsin'de 1990-1995 boyunca pasif olgu toplama yoluyla yapılan çalışmada yıllık 100.000'de 16 olguluk bir insidans bildirimi yapılmıştır [10]. Orta ABD'de vaka ölüm oranı %0,7'dir; ancak tedaviye başlama geciktirildiğinde, yaşlı hastalarda ve komplike fırsatçı enfeksiyonlara ve/veya diabetes mellitus gibi refakatçı hastalığı olanlarda veya immun yetmezlik durumunda ölüm riski artmaktadır [22].

ABD'de hastalığın bildirilebilir hale geldiği 1999 yılından itibaren Anaplazmoz vaka insidansının her yıl arttığı gözlemlenmiştir. 2000 yılında 351 hasta bildirim yapılmış, 2019'da yeni vaka sayısı 5655 olarak tespit edilmiştir. CDC kayıtlarına göre ABD'de 2020 yılına kadar toplam 41997 vaka bildirilmiştir. Vaka tahminleri milyonda 1,4 ila 6,1 arasında seyretmiştir. Yıl içerisinde her zaman hastalık görülebilmekle birlikte, yıllık vaka dağılım tablosunda 2000-2020 yılları arasındaki tüm vakaların %25'nin Haziran ayında kümelendiği tespit edilmiştir. Hastalığın

endemik olduğu Wisconsin ve New York bölgelerinde sero epidemiyolojik veriler, *Anaplasma* enfeksiyonunun çoğunun klinik olarak tanımlanmamış olduğu ve tahminen popülasyonların sırasıyla %15 ve %36'sının enfekte olabileceği bildirilmektedir [26].

Avrupa ve Asya'da, klinik Anaplazmoz vaka sayıları ile popülasyonlarda seropozitiflik ve *A. phagocytophilum* DNA pozitifliği artmaktadır [11]. Avrupa'da *Anaplasma* enfeksiyonundan kaynaklı olarak altı insan ölümü raporlanmıştır. Anaplazmoz ile ilişkilendirilen ölümlerin, en az üçünün hastalık sürecinde kandida özafajiti, kriptokok pnömonisi, invaziv pulmoner aspergilloz ve herpes özafajiti gibi fırsatçı enfeksiyonlara sahip olduğu bildirilmiştir [22].

Dört kıtadan 28.927 kişiyi kapsayan 56 ayrı seroprevalans çalışmasının verilerinin dahil edildiği bir meta analizde; toplumlarda seroprevalansın %0 ile %37.26 arasında değiştiği bildirilmiştir. Meta analiz çalışmasına dahil edilen tüm çalışmaların genel seroprevalans ortalaması %8.4 (%95 güven aralığında %6.6-%10.4) bulunmuştur. Hastalığa maruz kalma riski en yüksek olan popülasyonlarda seroprevalans %13,8, maruziyet riski en düşük sağlıklı popülasyonlarda %5.0 olarak tespit edilmiştir. Tahmini *A. phagocytophilum* seroprevalansı ateşli hastalığı olanlarda %6.4, kene ısırması hikayesi olanlarda %8.0 ve kene kaynaklı hastalığı olan popülasyonlarda %9.0 olarak bildirilmektedir [26].

ABD'de Anaplazmoz olgularının çoğunluğunun Lyme Hastalığı ve İnsan Babesiozu vakalarının yüksek olduğu eyaletlerde görüldüğü bildirilmiştir. *Ixodes* soyu üyesi keneler *Borrelia burgdorferi* ve *Babesia* türlerinin de vektörüdür. İnsanlarda *A. phagocytophilum* ve *B. burgdorferi* enfeksiyonları eş zamanlı olarak bildirilmiştir. Bu nedenle hastaların tedavisi için antimikrobiyal seçiminde, altta yatan enfeksiyon olup olmadığının dikkate alınması gerekir [29].

Anaplasma enfeksiyonu kendini sınırlar, tedavi ile 1-2 günde geçebilir, tedavisiz 60 gün kadar sürebilir, kronik formu görülmemiştir [21].

Daha önce *Cytoecetes phagocytophila* veya *Ehrlichia phagocytophila* olarak bilinen *A. phagocytophilum* suşları, özellikle Batı Avrupa'da geniş getiren hayvanlarda kene kaynaklı ateşe neden olur [18].

Anaplazmoz Dünya genelinde en çok ABD'nin kuzeydoğu bölgesinde, Avrupanın kuzey kesimlerinde ve Güneydoğu Asya'da (Çin, Moğolistan ve Kore'de bildirilmiştir) görülmektedir. Hastalığın vektörü *Ixodes* soyuna ait nimf veya ergin kenelerdir. Vektör kene türü, enfeksiyonun bulaştığı bölgeye göre değişmektedir [28].

2.5. A. *phagocytophilum* Vektörleri ve Rezervuar Konakçıları

A. phagocytophilum, Ixodida ailesine ait sert kenelerle bulaşır. Avrupa'daki ana vektör *I. ricinus*'tur (yaygın olarak koyun kenesi veya hint kenesi olarak bilinir). Doğu ABD'de *I. scapularis* Batı ABD'de *I. pacificus* ve Asya'da *I. persulcatus* vektörlük etmektedir [1].

A. phagocytophilum DNA'sı ABD, Avrupa ve Asya'da *Ixodes* cinsinin farklı türlerinde (*I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. spinipalpis*, *I. ricinus*, *I. persulcatus* ve *I. ovatus*) tespit edilmiştir. Son zamanlarda bazı araştırmalarda Ixodida ailesinin diğer soylarından *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma dissimile*, *Amblyomma maculatum*, *Dermacentor variabilis* ve *Hyalomma spp.*'de *A. phagocytophilum* gösterilmiştir [30]. Asya'da *I. persulcatus*, *I. ovatus*, *I. nipponensis* türlerin yanında farklı yoğunluklarda *D. silvarum*, *Haemaphysalis megapinosa*, *H. douglasii*, *H. longicornis*, ve *H. Japonica* türlerinde *A. phagocytophilum* DNA'sı tespit edilmiştir [31]. Enfekte kenelerin *A. phagocytophilum*'u memelilere naklettiği belirlenmiştir [18].

Ixodes türlerinde etkenin yumurtaya geçiş (transovaryal) kanıtı olmadığından, larvaların bakteriyi memelilere aktarmadığı düşünülmektedir [32]. Enfekte olmuş nimfler ve yetişkin keneler vektörlük yapar. Ancak tek konaklı bir yaşam döngüsüne sahip olan ve farklı bir ekolojik nişi temsil eden *Dermacentor albipictus*'ta transovaryal nakil bildirilmiştir [33].

Mevcut bilgilere göre, endemik döngüyü sürdürmek için doğada bir omurgalı rezervuar konağı gereklidir. Keneler, larva veya nimf döneminde memelilerden kan emme sırasında bakteriyi alır, enfekte olur, yetişkin metamorfoz aşamalarına kadar korur ve bir sonraki kan öğünü sırasında memelilere bulaştırır [32].

ABD'de *A. phagocytophilum*'un memeli rezervuar konakçıları; beyaz ayaklı fareler (*Peromyscus leucopus*), rakunlar (*Procyon lotor*), gri sincaplar (*Sciurus carolinensis*), gri tilkiler (*Urocyon cinereoargenteus*) ve kızılbaş sincapları olarak belirtilmiştir [34]. Ancak yapılan bazı çalışmalarda çeşitli vahşi hayvanların da rezervuar olduğu savunulmuştur [35]. *Ixodes* keneleri genellikle beyaz kuyruklu geyiklerden beslense de, geyiklerin insan suşu yerine *A. phagocytophilum*'un Ap-Variant1 ekotipi ile enfekte olduğu bildirilmektedir [36]. Avrupa, Japonya ve Rusya'da çeşitli *A. phagocytophilum* suşları hayvanlarda ve kenelerde rapor edilmiştir [37].

A. phagocytophilum suşlarının epidemiyolojik döngüleri karmaşıktır. İnsanlara ve memelilere bulaşmada; keneyele ilgili faktörler (kenenin memelilere bulaştırabilme yeteneği, habitatları, populasyon yoğunluğu) ve *A. phagocytophilum*'un tür içi genetik varyasyonlarına bağlıdır. *A. phagocytophilum*'un keneler ve memeli konaklar arasındaki doğal bulaşma döngüsü; bakteri suş çeşitliliğine ve konakçı duyarlılığına bağlı olarak iç içe geçen bir yapıdadır. *A. phagocytophilum* epidemiyolojisinin Avrupa ve ABD arasında büyük farklılıklar gösterdiği tespit

Tablo 2.1. *Anaplasma* ve *Ehrlichia* türleri, konakta yerleştikleri yerler, yaptığı hastalıklar, vektörleri ve rezervuar konakçıları

Etken	Konak	Konakçıda Yerleştiği Yer	Vektör	Yaptığı hastalık	Rezervuar konakçı
<i>A. phagocytophilum</i> = <i>Ehrlichia phagocytophilum</i> = <i>Ehrlichia equi</i>	İnsan, Sığır, At, Köpek	Granülosit	<i>Ixodes</i> sp. <i>Dermacentor</i> sp.	EGE, HGA	Geyik, Koyun, Beyaz ayaklı fare
<i>Anaplasma marginale</i>	Sığır, Vaşsi Ruminant	Eritrosit	<i>Dermacentor</i> , <i>Rhipicephalus</i> , <i>Ixodes</i> , <i>Boophilus</i> , <i>Hyalomma</i> , <i>Ornithodoros</i> , <i>Tabanidae</i>	Ruminant Anaplazmozu	Geviş getiren hayvanlar
<i>A. centrale</i> , <i>A. ovis</i> , <i>A. platys</i>	Sığır, Vaşsi Ruminant Köpek	Eritrosit, Trombosit	<i>Dermacentor</i> , <i>Rhipicephalus</i> , <i>Ixodes</i> , <i>Boophilus</i> , <i>Hyalomma</i> , <i>Ornithodoros</i> , <i>Tabanidae</i>	Ruminant Anaplazmozu. Köpek döngüsel trombositopeni	Geviş getiren hayvanlar
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	İnsan, köpek	MNL	<i>Dermacentor</i> , <i>Rhipicephalus</i> , <i>Ixodes</i> , <i>Boophilus</i> , <i>Hyalomma</i> , <i>Ornithodoros</i> , <i>Tabanidae</i>	HME	Beyaz kuyruklu geyik, evcil köpek
<i>Ehrlichia ewingii</i>	İnsan, köpek	Granülosit	<i>Haemaphysalis</i> , <i>Hyalomma</i> , <i>Rhipicephalus</i> ,	CGE Ewingi erlihiyozu	
<i>Ehrlichia canis</i>	İnsan, köpek	MNL	<i>Haemaphysalis</i> , <i>Hyalomma</i> , <i>Rhipicephalus</i> ,	CME	
<i>Anaplasma bovis</i> = <i>Ehrlichia bovis</i>	Sığır	Monosit, Lenfosit	<i>Haemaphysalis</i> , <i>Hyalomma</i> , <i>Rhipicephalus</i> , <i>Amblyomma</i>	Sığır Ehrlışıyozu	Geviş getirenler, Tavşan

<i>Ehrlichia ruminantium</i> = <i>Cowdria ruminantium</i>	Sığır, Koyun, Keçi ve Diğer Ruminantlar	Nötrofil, Endotel Hücreler	<i>Amblyomma sp.</i>		Geviş getirenler,
--	---	----------------------------------	----------------------	--	----------------------

CGE: Köpek granulositik erlişiyozu, CME: Köpek monositik erlişiyozu, EGE: At granulositik erlişiyozu, HGE: insan granulositik erlişiyozu, HME: insan monositik erlişiyozu MNL: Mononükleer lökosit [45].

2.6. Vektör, Konakçı, Patojen ilişkileri

Kenelerin ve *A. phagocytophilum*'un konakçıya zararlı etkileri ile kene-konak-patojen arasındaki karşılıklı etkileşimler *Ixodes* cinsi kenelerde yapılan çalışmalarda başarıyla ortaya konulmuştur [41]. Keneler kanla beslenmek için konakçıda bir lezyon oluşturur; konağın hemostatik, immun ve inflamatuvar yanıtlarını inhibe eder. Konakçılar, kene istilasına karşı savaşır ve patojen enfeksiyonunu sınırlamak için farklı mekanizmaları aktive ederek tepki verir. Kene tutunması konakçıya zararlı etki yapar, patojenin keneyi enfekte etmesi de keneye zararlı etki eder [42].

Keneler konakçı derisine tutunur, tükürüğünde bulunan biyoaktif moleküllerle konakçıda; ağrı ve kaşıntı, hemostaz, inflamasyon ve yara iyileşmesi sürecini modüle ederek günlerce kan emer. Konakçı keratinositler, doğal öldürücü hücreler, dendritik hücreler, T hücre alt populasyonları (Th1, Th2, Th17, Treg), B hücreleri, nötrofiller, mast hücreleri, bazofiller, endotelyal hücreler, sitokinler, kemokinler, kompleman sistemini, hücre dışı matrikste bulunan kutanöz ve sistemik immun yanıt mekanizmalarını inhibe eder. Tüm bu etkileşimlerle beslenme sırasında kene tükürük bezlerinde bulunan patojenlerin konakçıya yerleşmesi sağlanır [43].

A. phagocytophilum'un, keneler ve omurgalı konaklara adaptasyon mekanizmaları benzer görünmekte, vektör kene türleri ile konakçılar arasında evrimsel bir adaptasyon olduğu düşünülmektedir [42]. Konakçılar; kene istilasını önlemek için çeşitli mekanik ve kimyasal tepkiler verir. Kenenin konakçıya yanıtı; beslenme ve kan sindirimini etkileyen pıhtılaşma ve trombosit agregasyonu gibi farklı mekanizmaları aktive eder. Patojenler; bulaşma, çoğalma ve enfeksiyon geliştirmeyi kolaylaştırmak için konakçı ve kenelerde biyolojik savunma süreçlerini kendi lehine düzenler. Kene hücrelerinde enfeksiyon geliştirmek için *A. phagocytophilum*; hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi, konak hücre apoptozunun inhibisyonu, bağışıklık tepkisinin manipülasyonu ve konakçı hücre epigenetiğini kontrol eder, bunu yanında başka etkileri de

bulunmaktadır [42]. Nötrofillerin yara bölgesine toplanması ile granülositik fagositoz artar ve *A. phagocytophilum*'un yayılması kolaylaşmış olur [45].

Kenelerin insandan kan emmesi sırasında karbonhidrat α -gal (Gal α 1-3Gal β 1 4GlcNAc-R)'ye karşı antikor düzeylerinin artmasına neden olur. Kene kaynaklı patojenlerin çoğu, yüzeylerinde α -gal ile modifiye edilmiş proteinler içerir. α -gal'a karşı gelişen antikor seviyeleri, Anaplazmoz oluşmasını engelleyebilir ve etkenin konakçıda çoğalmasını azaltabilir. Kene konakçıya tutunduktan sonra α -gal anaflaktik reaksiyonları oluşturabilir, ancak enfeksiyona karşı korumayı da artırabilir. Rezervuar konakçılarda patojenin hayatta kalmasını sağlayan ve bulaşmasını kolaylaştıran mekanizmalar bulunmaktadır. Kene mikrobiyotasının patojen yararına olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir [46].

A. phagocytophilum enfeksiyonu, inflamatuvar histopatolojik lezyonlar ve nötropeni ile sonuçlanır [44]. Anaplazmoz, konakçıda diğer daha öldürücü patojenlere karşı duyarlılığı azaltabileceği ve engelleyebileceği düşünülmektedir [47].

Kenelerin aktif olduğu bölgelerde kırmızı et tüketimi ve cetuksimab tedavisi sonrasında α -gal spesifik IgE değerlerinin anlamlı olarak yükseldiği tespit edilmiş ve bu reaksiyonlar kene ısırığıyla ilişkilendirilmiştir [48].

A. phagocytophilum'un, konakçı hücrelerinin kromatin yapısını ve transkripsiyonel programını etkileyerek, epigenetik modifikasyonlara yol açan bir mekanizmaya sahip olabileceği ileri sürülmektedir [49]. *A. phagocytophilum* ile enfekte nötrofillerde proinflamatuvar yanıtta görevli genler aktifleşerek, Interlökin 8 (IL-8) ve diğer kemokinlerin seviyelerinde artışa neden olur [49]. Ayrıca *A. phagocytophilum* enfeksiyonunda konakçının ürettiği interferon gama (IFN- γ) sonucu oluşan histopatolojik lezyonlara karşı, IL-10 üretimi uyarılarak enfeksiyon kontrolü sağlanır [44].

Konak organizma, *A. phagocytophilum* enfeksiyonuna karşı; makrofajların, nötrofillerin aktivasyonu ile inflamatuvar yanıtların yanında, bakterinin CD4⁺T hücrelere bağlı yüzey proteinlerine spesifik IgG üretir [41].

2.7. *A. phagocytophilum*'un Morfolojik Yapısı

Anaplasmatocae ailesinin tüm üyeleri; iki zarla çevrelenmiş, küçük, Gram olumsuz, pleomorfik koklardır. Bakteri boyutu genellikle 0,4 ila 1,3 μ m'dir, ancak bazen 2 μ m büyüklüğe kadar ulaşabilir. Dış membranı düzgün değildir, periplazmik aralık değişken genişliklerdedir. Kapsül tabakası yoktur. Bakterinin ince DNA iplikleri ve ribozomları açıkça görülür [2]. *A.*

phagocytophilum, enfeksiyöz formu olan yoğun içerikli hücre (Dense-core Cell) ve enfeksiyöz olmayan ağsı hücre (Reticulate Cell) arasında geçiş yapan iki fazlı bir gelişim döngüsüne sahiptir [50].

Anaplasmataceae ailesi üyeleri enfekte ettiği ökaryotik hücrelerin sitoplazması içinde zarla çevrili vakuollerde (inklüzyon veya parazitofor vakuollerde), fagozomdan kaçarak çoğalır. Bakteriler, kısmen peptidoglikan ve lipopolisakkaritten (LPS) yoksun olarak inklüzyonlar içinde sıkıca paketlenmiş halde bulunur [51]. Hücre duvarındaki kısmi kayıplar bakterinin intravakuolar boşluk içinde sıkışmasına izin verir. Böylece enfekte granülositlerin plastisitesi korunur ve kılcak damarlardan rahat geçmesi sağlanır [52].

Konak sitoplazmasına karşı kontrast eksikliği nedeniyle hücre içi bakterileri göstermek için Gram boyama uygun değildir. Genellikle Diff-Quick yöntemiyle Romanowsky boyama yapılarak, morula adı verilen karakteristik dut benzeri mor renkli bakteri kümelerinin görüntülenmesi sağlanır. ("Morula" terimi, dut anlamına gelen Latince "morus" teriminden türetilmiştir.) Morulalar genellikle 1,5 -2,5µm çapında, 6µm kadar büyüklükte olabilir [40].

2.8. A. *phagocytophilum*'un Genomik Özellikleri

A. phagocytophilum'un genom boyutu 1.47 Mb olarak tespit edilmiştir. Genom üzerinde 1,369 adet açık okuma çerçevesi (ORF) bulunmakta ve ORF sayısı *E. coli*'de bulunanın yaklaşık dörtte biri kadardır. *A. phagocytophilum*'da lipopolisakkarit ve peptidoglikan biyosentezini kodlayacak ORF bulunmamaktadır. *A. phagocytophilum* genomunun %12,7'sinin tekrar edilen bölgelerden oluştuğu bildirilmiştir. Bakteride plazmid, profaj veya transpozonlar tespit edilmemiştir [53].

Başka bakterilerle ortak genlerden oluşan 747 adet ORF tespit edilmiştir. Diğer organizmalardan farklı olarak 458 ORF bulunmakta ve bunlar varsayımsal proteinleri kodlar. *A. phagocytophilum* ile *Rickettsia prowazekii* arasında 469 adet ortak gen bildirilmiştir. Enfekte insan lökositlerinde tahmini bakteri proteomlarının %89,3'ünü temsil eden toplam 1.212 adet *A. phagocytophilum* proteini tespit edilmiştir [54].

A. phagocytophilum, hayatta kalmayı sağlayan, transport ve bağlama proteinleri kategorisinde kritik öneme sahip 41 adet gene sahiptir, bu kategori genler serbest yaşayan bakterilerde bundan çok daha fazla sayıda bulunmaktadır. *A. phagocytophilum*'da yüzey proteinleri, inklüzyon membran proteinleri ile bakteriye benzersiz fenotipler kazandıran T4S substratları keşfedilmiştir. Tip IV sekresyon sistemi (T4SS) genlerinde de çok sayıda ardışık tekrar bölgeleri bulunmaktadır [53].

Vektörlerde ve rezervuar konakçılarda *A. phagocytophilum* DNA'larının tespiti için 16S rRNA gen bölgesine özgü primerler geliştirilmiş, farklı lokusları çoğaltan primerlerin duyarlılıklarının aynı olmadığı bazı çalışmalarda rapor edilmiştir. Son çalışmalarda 16S rRNA gen bölgesini çoğaltan ve yüksek duyarlılıkta bağlanma yeteneğine sahip yeni primerler geliştirilmiştir [54].

2.9. *A. phagocytophilum* 'un Konakçıya Adaptasyonu ve Virulans faktörleri

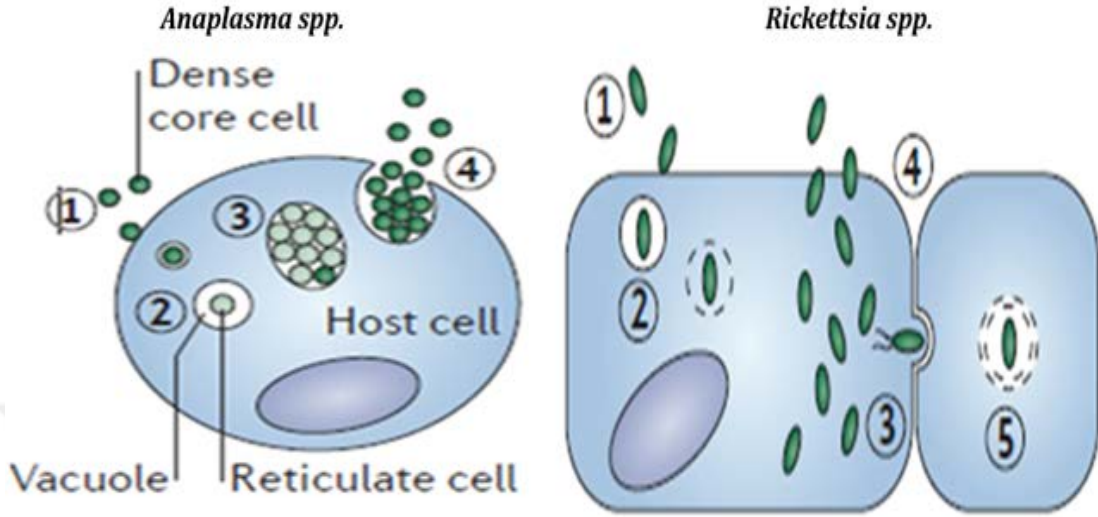
2.9.1. *A. phagocytophilum* 'un Konakçı Hücre İçi Gelişim Döngüsü

Memeli hücre kültürü ve kene hücre kültüründe bakterinin, büyük retikülat (RC) form ve daha küçük yoğun içerikli (DC) form olmak üzere, iki ayrı morfoloji gösterilmiştir [55]. Yoğun protoplazma içeren yapısı diğer hücre içi bakterilere (*Chlamydia sp.* ve *Coxiella burnetii*) benzemekte ve normal gelişim aşamaları olarak kabul edilmektedir [56]. ISE6 kene hücrelerine hem DC hem de RC form bakterilerin bağlandığı ve enfekte ettiği gösterilmiştir [57].

Çin hamsteri ovarial hücrelerine (CHO) *A. phagocytophilum* transfekte edildiğinde, P-selektin glikoprotein ligand 1'e (PSGL-1) sadece DC formunun tutunduğu belirlenmiştir. Anti-PSGL-1 antikoru ile ön inkübasyona tabi tutulan CHO'lara bağlanmadığı tespit edilmiştir. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda HL-60 hücrelerine yalnızca DC formunun bağlandığı bildirilmiştir. DC formdaki bakteriler HL-60 hücreleri içerisine alındıktan sonra 12 saat içinde RC form bakterilere dönüşerek, RC formda çoğalmaya başladığı gösterilmiştir. İlk önce bireysel inklüzyonlar içinde çok sayıda RC bakteri gözlemlenmekte, daha sonra (yaklaşık 36 saatte) aynı hücre içinde bireysel vakuoller içerisinde DC ve RC morfoloji bakteriler bulunmaktadır. Ökaryot konakçı hücre içerisinde bulunan DC ve RC morfoloji bakteriler ile hücreler yeniden enfekte olur [56]. İmmünofloresan çalışmalarda insan periferik kan nötrofillerine yalnızca DC form (<1µm) bakterilerin bağlandığı ve hücre içine girdiği gösterilmiştir [58].

A. phagocytophilum'un her gelişim aşamasında yüzey antijenleri sürekli değişim gösterir. Her antijenik varyasyon konakçı hücrelerde farklı reseptörlere bağlanarak, farklı yollarla giriş yaptığına işaret eden bilgiler bulunmaktadır. Bakterinin DC formunda keşfedilen bir T4S proteini olan VirB9'un RC formunda bulunmadığı gösterilmiştir [58]. Kene dokularında *A. marginale* ve *Ehrlichia muris*'in DC ve RC formları bildirilmiştir [40]. Yoğun içerikli Organizmalar (DC Form), İnsan P-Selektin Glikoprotein Ligand 1'i tanıyarak konak hücreye tutunur [56].

Anaplasma ve *Rickettsia*'nın hücre içi enfeksiyon döngüleri Aşağıda Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.

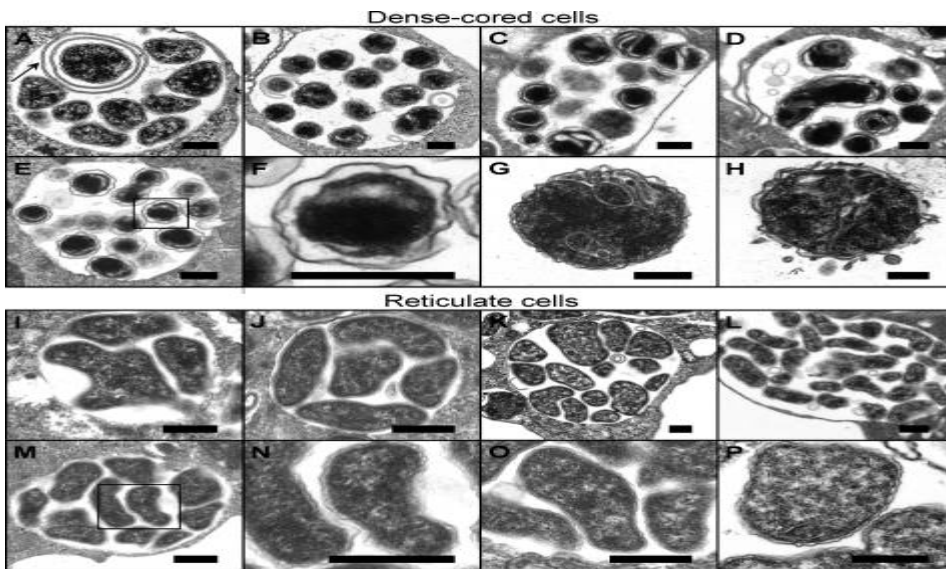


Şekil 2.2. *Anaplasma* spp. ve *Rickettsia* spp. konak hücredeki yaşam döngüleri [40].

(*Anaplasma* spp. ;1- Yoğun içerikli (DC) enfektif formu, 2- Vakuol içerisinde az yoğun içerikli büyük bakteri formu (RC) enfektif olmayan morfortip, 3- Morula içerisinde DC ve RC form bakterilerin birlikte bulunması, 4- Konakçı hücreyi terkeden DC form enfektif bakteriler.

Rickettsia spp. ; 1- Konak hücreye giriş yapan bakteri, 2- Vakuol içerisinde bakteri, 3- Konak hücre sitoplazmasında serbest olarak çoğalma, 4- konak Hücreyi terk eden bakteriler, 5- Konakhücreden komşu hücreyi enfekte eden bakteri)

HL-60 hücrelerinde üretilen *A. phagocytophilum*'un DC ve RC formlar arası geçişler elektron mikroskobundaki görüntüleri Şekil 2.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. *A. phagocytophilum* DC ve RC formlarının elektron mikroskobik görüntüsü [56].

(Fotoğraf A'dan H'ye kadar DC formlar, I'den P'ye kadar RC' formların görüntüleri. DC formlar $0,83 \pm 0,24 \mu\text{m}$ genişliğinde, küresel yapıda, yoğun bir nükleoide ve dalgalı bir dış zarı bulunmaktadır. Panel A'daki ok, membranöz bir zarla çevrili ayrı bir DC formu göstermektedir. RC Formlar; (I ila P) RC'ler $0,69 \pm 0,36 \mu\text{m} \times 1,04 \pm 0,44 \mu\text{m}$ ölçülerinde, dağılmış bir nükleoide ve DC formlara göre daha düzgün dış membran ve pleomorfik bir yapısı var. F ve N panelleri, sırasıyla E ve M panellerindeki kutulu alanların büyütülmüş halidir. Çubuklar 0,5 mikron.)

2.9.2. Konak Hücrede İnklüzyon Biyogenezi

A. phagocytophilum, hücre zarına bağlı inklüzyonlar içinde çoğalır. Bakteriler bölünüp çoğaldıkça, inklüzyonlar konak hücrenin sitoplazmasının çoğunu işgal edecek şekilde genişler. İnklüzyonların membran yapıları ve lümen bileşenleri benzersiz ve büyük ölçüde belirsizdir. *A. phagocytophilum* ile enfekte HL-60 hücrelerinde, hücre iskeleti bileşenleri, veziküler trafik, hücre sinyalleme ve enerji metabolizmasında yer alan proteinlerde artış tespit edilmiştir [49].

Nötrofiller, fagozomlardaki istilacı mikroorganizmaları antimikrobiyal peptitler (örn. defensinler ve lizozimler) ve lizozomal hidrolitik enzimler içeren granüllerle birleştirerek ya da hayati besinlerden (örn. demir) yoksun bırakarak öldürür [59].

A. phagocytophilum, vezikül içi öldürme trafiğine müdahale eder ve lizozomlardan kaçır. İnklüzyon içeriği asidik değildir ve V-tipi H-ATPaz'dan yoksundur. Miyeloperoksidaz, CD63, LAMP1 ve diğer geç endozomal / lizozomal belirteçleri bulundurmaz. İnklüzyonlar, sekretuar vezikülleri ve NADPH oksidazı bulunduran spesifik ve üçüncül granüllerle füzyonu önler [60].

A. phagocytophilum inklüzyonlarında majör doku uyumluluk kompleksi sınıf I (MHCI) ve MHCII bulunur, bunlar bakteri antijen sunumunda rol oynayabilir [60].

A. phagocytophilum hücre duvarının stabilizasyonunu kolesterol ile sağlar ve hayatta kalır. Enfeksiyon sırasında inklüzyon zarının genişletilebilmesi için, konakçı hücre kolesterolünü ve lipidlerini membran yapısında kullanır. *A. phagocytophilum* genomunda peptidoglikan sentezi için gerekli olan tamamlayıcı genler, kolesterolü sentezleyecek genler ve lipid A sentezi için gerekli genler bulunmadığı için ihtiyaç duyduğu kolesterol ve lipidleri eksojen olarak konakçısından temin etmek zorundadır. Konakçı hücre membranındaki kolesterolün önemli bir kısmını kullanır. Enfekte ettiği hücrelerde endojen kolesterol sentezini artırmaya zorlar ve işgal ettiği vakuolde (ApV) serbest kolesterol zenginleştirilir. Konakçı hücrelerde kolesterol artışı biyosentezle değil; bakterinin protein sentezlemesi, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörü ve LDL'nin veziküllere taşınmasıyla gerçekleşir. Konak hücrenin LDL kolesterolü hücre içine alımındaki yetersizlikler, bakteri gelişimini ve enfeksiyonu bloke eder [61].

2.9.3. A. *phagocytophilum* 'un Yüzey Antijenleri (P44/ Msp2)

A. phagocytophilum'un en önemli yüzey antijenleri P44/Msp2 proteinleridir. P44 proteinleri, hidrofilik küçük molekül besin maddelerinin dış zardan pasif difüzyon yoluyla atılımını sağlayan (porin aktivitesine sahip) transmembran fıçı proteinleridir ve serolojik tanıda da kullanılmaktadır. *A. phagocytophilum* genomunda P44/Msp2 proteinlerini kodlayan 113 adet paralog gen tespit edilmiştir [61]. P44 (msp2) genleri, 5' ve/veya 3' korunmuş sekanslarla çevrili merkezi hiperdeğişken bir bölgeden oluşur. Msp-2 gen bölgesi yüksek değişkenlik göstermesi nedeniyle tür içi varyantların belirlenmesinde etkin şekilde kullanılmaktadır. *A. phagocytophilum*'un farklı varyantları AP variant 1, AP-variant 2, AP-variant 3 ve AP-variant 4 belirlenmiştir [62].

Transkripsiyonel düzenleme mekanizması korunarak aynı promotörden, P44 antijen repertuarının hızla değiştirilmesine izin verilir [62]. P44 proteinleri antijenik varyasyonlar oluşturarak, etkenin konakçı bağışıklık sisteminden kaçmasına ve enfeksiyonun devam etmesine katkıda bulunur [40].

2.9.4. A. *phagocytophilum* Sekresyon Sistemi ve Anka Proteini

Bakteri sekresyon sistemleri, Tip I 'den Tip VI'ya kadar tiplendirilen en az altı farklı protein grubundan oluşur. Bakteriden konak nötrofil sitoplazmasına salgılanır. Tip IV salgılama sistemleri (T4SS'ler), bakteri hücre duvarını geçen büyük protein komplekslerinden oluşur. T4SS'ler yapısal olarak; multiprotein kompleksi ve ATP'ye bağımlı nükleoprotein kompleksinden oluşan bir porin kanalıdır. T4SS'ler son tanımlamalara göre F,P,I ve GI grupları olarak dört gruba ayrılmıştır. T4SS ailesi üyeleri; proteinler veya protein-DNA komplekslerinin yer değiştirmesini sağlayan çok çeşitli işlevleri olan kanallardır. Bir kısım T4SS'ler yatay gen transferini gerçekleştirerek çevresel değişikliklere adaptasyonu kolaylaştırır, bakteriler arasında antibiyotik direncinin yayılmasını sağlar [63].

A. phagocytophilum genomunda TipI (T1SS) ve TipIV (T4SS) sekresyon sistemi bileşenlerinin homologları bildirilmiştir [60].

A. phagocytophilum'da T4SS kodlayan geniş bir gen grubu bulunmaktadır ve insan hücrelerinde çok yoğun ekspresyon görülür. Bakteriyel enfeksiyon gelişimindeki rolü ve önemi substratların tanımlanmasıyla anlaşılmaktadır [63]. *A. phagocytophilum*'da altı T4SS'de efektör protein olarak; ankirin tekrar alanı içeren protein A (AnkA), Anaplasma transloke substrat 1 (Ats-

1) ve Ehrlichia transloke faktör 1 (Etf-1, ECH0825) substratları tespit edilmiştir. Ats-1 ve Etf-1 efektör proteinler enfeksiyon sırasında yoğun miktarda üretilerek konak sitoplazmasına salgılanır, konak hücre için toksik değildir. Ats-1 ve Etf-1 hücre içi enfeksiyon gelişiminde, doğuştan gelen iki önemli bağışıklık mekanizması olan hücresel apoptoz ve otofajiyi bozarak bakteriyel enfeksiyonun devamını sağlar. Otofajiyi manipüle ederek konakçı hücrelerden besin elde ederler. Zorunlu hücre içi bakterilerde T4SS'ler bakterinin konakta hayatta kalma ve beslenmesini sağlayarak, önemli virülans mekanizmalarını oluşturur [64].

A. phagocytophilum'un sitoplazmasındaki AnkA proteini, enfeksiyon sırasında ökaryotik konak hücrelere transfer edilerek konak nötrofillerinin metabolik aktivitelerini manipüle eder. AnkA proteini Abl-1 tirozin kinaz ile etkileşime girerek Abl-interaktör 1 (Abl-1)'e bağlanır ve AnkA fosforilasyonu gerçekleşir. Zorunlu hücre içi alfa-proteobakterilerde T4S substratı olarak ilk tanımlanan AnkA ve Abl-1 bakteriyel enfeksiyon için kritik öneme sahiptir. AnkA proteini Abl-1 sinyal yolunu aktive ederek hücre içi enfeksiyonu kolaylaştırmada önemli bir rol oynar. Konak hücre sitoplazmasına anti-AnkA antikörünün iletilmesi sonucu bakteriyel enfeksiyonun inhibisyonu sağlanır. Bazı araştırmacılar *A. phagocytophilum* moleküler yöntemle teşhisi için AnkA proteinini kodlayan gen bölgesini kullanmaktadır [65].

2.9.5. *A. phagocytophilum* Tür içi İzolat ve Enfektivite Farklılıkları

Kenelerden ve hayvanlardan *A. phagocytophilum*'un 16S rRNA, groEL, msp2, msp4 ve ankA genlerine dayalı olarak genetik varyantları tespit edilmiştir. Msp-2 gen bölgesi yüksek değişkenlik göstermesi nedeniyle tür içi varyantların belirlenmesinde etkin şekilde kullanılmaktadır. *A. phagocytophilum*'un farklı varyantları AP variant 1, AP-variant 2, AP-variant 3 ve AP-variant 4 belirlenmiştir [62].

A. phagocytophilum suşlarının konak enfektivitesi açısından farklılık gösterdiği bazı çalışmalarda bildirilmiştir. İnsanlarda hastalığa neden olan "prototip" varyantıyla aynı olan B varyantı atlarda tespit edilmiştir. Bu varyant daha önce köpeklerde, atlarda ve karaca, kızıl geyik ve koyunlarda belirlenmiştir. İnsanlar için apatojenik olduğu varsayılan Amerikan varyantı Ap-V1'in muhtemel doğal rezervuarı beyaz kuyruklu geyikler olarak gösterilmektedir [66].

Ap-Varyant 1 suşunun *I. scapularis* kenelerini, keçileri ve geyikleri enfekte ettiği, ancak fareleri enfekte etmediği bildirilmektedir. *A. phagocytophilum* suşlarından biri insan, at, koyun ve köpekleri aşırı derecede enfekte edebilmektedir. At suşlarından birisi sığırlarda asemptomatik bir enfeksiyon oluşturmuştur. İnsanlarda ve atlarda akut seyreden ve kendini sınırlayan enfeksiyon tipi görülürken, koyunlar ve kemirgenlerde hastalığın kronikleştiği tespit edilmiştir [67].

Kene hücre kültürü hatlarında (ISE6 ve IDE8) insan suşu, at suşu ve birkaç geviş getiren suşu üretilmiştir. İnsan izolatlarından sadece bir tanesi, insan promiyelositik lösemi hücre hattı'nda (HL-60 hücrelerinde) üretilmiştir. Bakterinin virülansını belirleyen faktörler, memeli konakçı tür spesifikliğinin nasıl oluştuğu ve bakteri kültürü için gerekli şartlar tamamıyla aydınlatılamamıştır [68].

A. phagocytophilum izolatlarının tamamının serolojik çapraz reaktiviteye sahip olduğu ve bireysel suşları ayırt etmediği tespit edilmiştir. En yaygın bakteriyel antijenler p44 (msp2) gen ailesi tarafından kodlanan ve dış membran üzerinde eksprese edilen 42 ila 49-kDa büyüklükteki proteinlerdir. *A. phagocytophilum* suşları, 16S rRNA ve groESL nükleotid sekanslarında küçük varyasyon gösterir. P44, p44ESup1 (omp-1N), msp2 (p44'ten farklı) ve ankA genleri, majör suş varyasyonunu oluşturur [38].

2.10. Patogenez

A. phagocytophilum enfeksiyon sırasında; omurgalı konakçı hücrelerinde ve kenede hücre iskeletinin yeniden şekillendirilmesi, hücre apoptozunun inhibisyonu ve konakçı immun yanıtını kendi lehine modülasyonu ile enfeksiyonun devamını sağlar. Konakçı hücrenin moleküler mekanizmalarını, hücre epigenetiğini ve metabolizmasını modifiye eder. Kene-konakçı-patojen etkileşimleri yeniden tanımlanmaktadır. Konakçılar; hücre apoptozunu uyararak patojenin hücre içi gelişimini inhibe eder, bağışıklık tepkisini oluşturur, metabolizmayı düzenler ve alternatif yolları aktive ederek enfeksiyona yanıt verir [61].

2.10.1. Konak Hücreye Giriş Mekanizması

A. phagocytophilum, çoğunlukla dolaşımdaki olgun nötrofilleri enfekte eder. Hematopoyetik dokuda ve periferik dokularda bulunan nötrofillerde daha az tutulum görülür [68]. *A. phagocytophilum* kemik iliği progenitörlerini ve endotel hücrelerini enfekte edebilir [69].

Kenelerin kan emmek için konakçı derisinde oluşturduğu lezyon bölgesindeki nötrofiller ve makrofajlarda *A. phagocytophilum* gösterilmiştir. Bu durum enfeksiyon gelişimi ve kene vektörlüğü için periferik lökositlerin rolünün olabileceğine işaret etmektedir [32].

Konakçıda enfeksiyon gelişiminin ilk adımı; duyarlı hücrelerde uygun reseptöre bağlanma ve sonrasında hücre içine invazyon sürecidir. *A. phagocytophilum*'un konakçı hücrelere

bağlanması ve invazyon mekanizmalarının tanımlanması için çoğunlukla hücre kültür hatlarından yararlanılmıştır [68].

A. phagocytophilum, konak nötrofillerine penetrasyon için sialillenmiş ligandlara ve en fazla P selektin glikoprotein ligandı-1 (PSGL-1)'e bağlanır [56]. Hematopoietik hücrelerin çoğunda PSGL-1 eksprese edilir [70]. PSGL-1'e bağlanma Syk ve ROCK1'in fosforilasyonu ve bakterinin hücreye invazyonunu destekleyen bir sinyal zinciri ile başlatılır [68].

PSGL-1'in bloke edilmesi ile enfeksiyona karşı duyarlılığın sınırlandığı gösterilmiştir. *A. phagocytophilum* ile enfekte HL-60 hücrelerinde PSGL-1 bloke edici antikorlar ve küçük interferans RNA (siRNA)'lar, ROCK1 fosforilasyonunu inhibe eder [70].

A. phagocytophilum enfeksiyonundan sonra ROCK1, tirozinle fosforile edilir. HL-60 hücrelerinin enfekte edilmesinden sonra, bakterinin T4SS efektör proteini olan AnkA'nın tirozin fosforilasyonu gerçekleşmektedir [71].

A. phagocytophilum ayrıca β 2-integrin'e ve Caveolin-1 ile zenginleştirilmiş lipit sallarına bağlanır. OmpA spesifik olarak, α 2,3-sialik aside bağlanır ve *A. phagocytophilum*'un bilinen tek invazyon reseptörüdür. Asp14, spesifik bir bölgede invazyon için önemlidir [68].

HL-60 hücrelerinde genç *A. phagocytophilum* inklüzyonları, kolesterolce zengin lipid yığınları veya Caveolin-1 yoğunlaşmasının birlikte lokalize olduğu bildirilmiştir [61].

A. phagocytophilum ile enfekte olan hücrelerde Tirozinle fosforile proteinler ve fosfolipaz C2 (PLC-2) biriktiği gösterilmiştir [65].

Yapılan bazı çalışmalarda bağlanma ve/veya invazyon için ana yüzey proteinleri olan P44 (Msp2), Asp55 ve Asp62'nin de içinde bulunduğu bazı yüzey proteinlerinin etkin rolünün bulunabileceği bildirilmiştir. Ayrıca tanımlanamayan *A. phagocytophilum* adhezin/invazinleri veya konakçı hücre reseptörlerinin olabileceği tahmin edilmektedir [38].

2.10.2. Nötrofil Savunmasının Aşılması

A. phagocytophilum, doğuştan gelen güçlü antimikrobiyal savunmaları yıkarak granülositleri enfekte eder, enfekte insanlar ve hayvanlar fırsatçı enfeksiyonlara karşı daha duyarlı hale gelir [72].

Nötrofiller, transmembran Toll benzeri reseptörler (Toll Like Receptor, TLR'ler) ve korunmuş patojenle ilişkili moleküler modelleri (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP) tanıyabilen ve bunlara bağlanabilen sitoplazmik protein reseptörlerine sahip nükleotid bağlayıcı

oligomerizasyon alanı (Nucleotide-binding Oligomerization Domain, NOD) benzeri patern tanıma yüzey reseptörlerini (Pattern Recognition Receptors, PRRs) ifade ederek yanıt oluşturur. PAMP'lerin bağlanması ile ortaya çıkan immün tepkiler; reaktif oksijen türlerinin (Reactive Oxygen Species, ROS) üretimi, lizozomların füzyonu, mitojenle aktive olan protein kinaz (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK)'ların aktivasyonu, otofaji, hücrel apopitoz ve sitokin / kemokinlerin indüksiyonu olarak sıralanabilir. Bu tepkiler genellikle enfeksiyon bölgesinde nötrofillerin kendileri veya nötrofil tarafından bölgeye toplanan hücrelerin istilacı mikroorganizmaları ortadan kaldırmasıyla sonuçlanır [73].

A. phagocytophilum, majör PAMP'lar, LPS ve peptidoglikandan yoksundur [42]. HL-60 hücreleri *A. phagocytophilum* ile enfekte edildiğinde; TLR2 ve makrofaj mannoz reseptörü 2 ile uyum içinde peptidoglikan ve lipoproteinleri tanıyan TLR1(triaçil)'i aşağı regüle ettiği gösterilmiştir [65].

2.10.3. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Üretiminin Azaltılması

Aerobik organizmalar fizyolojik koşullar altında, hücrenin sinyal iletim mekanizmalarını korumak, gen ekspresyonunu ve hücrel fonksiyonları düzenlemek için ROS üretimini kontrol altında tutar. Dinlenme halindeki nötrofillerde NADPH oksidaz bileşenleri (salgı veziküllerinin, spesifik granüllerin ve sitozolik komplekslerin zarları arasında çözünmüş halde) dağınık olarak bulunur. Hücrenin maruz kaldığı çeşitli patolojik oksidatif streslerde ve patojen enfeksiyonuna yanıt olarak mitokondri tarafından ROS üretimi gerçekleştirilir. Nötrofiller, monositler ve makrofajlar patojenlere maruz kaldıklarında ilk olarak ROS (süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri) üreterek oksijene bağlı bir savunma sistemi oluşturur. ROS üretimi ile nötrofillerin apopitozu aktive edilerek yaşam süresi sınırlanır. *A. phagocytophilum*, enfekte ettiği insan nötrofillerinde hayatta kalmak için ROS üretimini inhibe eder [74]. *A. phagocytophilum* ile enfekte insan nötrofilleri, en güçlü eksojen uyaranlara bile tepki veremez [75].

Sitokrom b β -alt ünitesi (Cytochrome B-245 Beta Chain, CYBB), konakçı immün yanıtının genel bir bileşenidir. *A. phagocytophilum* ile enfekte nötrofillerde bakteriyel T4S substratı olan AnkA'nın etkisiyle CYBB ekspresyonunun inhibe edildiği öne sürülmektedir. *A. phagocytophilum* enfeksiyonu ayrıca, nötrofil savunması ve olgunlaşması için önemli iki molekül olan insan nötrofil peptidi 1(HNP1) ve C/EBP γ , genlerin promotörlerine CDP'nin bağlanmasını artırır. CDP aktivitesi artışı ise nötrofil fonksiyonunu olumsuz olarak etkiler [75].

2.10.4. Konak Hücre Apopitozunun İnhibisyonu ve Enfeksiyon Gelişimine Etkisi

Apoptoz; hasarlı hücreler veya artık ihtiyaç duyulmayan hücrelerin uzaklaştırılması ve hücre içi patojenleri öldürmek için programlanmış hücre ölümü sürecidir. Doğuştan gelen hücrel bağışıklık mekanizmasıdır. Periferik kanda bulunan nötrofiller spontan apoptoz sürecindedir ve mikrobiyal enfeksiyon durumunda yanıt olarak apoptoz hızlandırılır. İnsan periferik kan nötrofillerinin *A. phagocytophilum* enfeksiyonunda, hem programlanmış apoptoz inhibe edilir, hem de indüklenmiş apoptoz 48 veya 96 saate kadar geciktirilerek, bakteri replikasyonu için yeterli zamanın kazanıldığı bildirilmektedir. Ayrıca *A. phagocytophilum*, insan nötrofillerinin anti-Fas kaynaklı programlanmış hücre ölümünü bloke ettiği savunulmaktadır [76].

İnsan nötrofillerinde apoptozu regüle eden kaspaz-3 aktivasyonu, proapoptotik Bax'ın mitokondriye translokasyonu, kaspaz-9'un aktivasyonu, intrinsik başlatıcı kaspazın aktivasyonu *A. phagocytophilum* enfeksiyonu sırasında güçlü bir şekilde inhibe edilir. Vertebralı ve omurgasız konakçılarda enfeksiyonun devamını sağlamak için apoptoz ve farklılaşma ile ilgili çok sayıda genin transkripsiyonun modüle edildiği, antiapoptotik bcl-2 aile üyelerinin ekspresyonu artırılarak, apoptozun inhibe edildiği tespit edilmiştir [77].

Nötrofillerden granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor GM-CSF), Janus kinaz/sinyal dönüştürücüler(JAK/STAT) ve transkripsiyon yolunun aktive edildiği ve bu yolla bakteri canlılığının sağlandığı gösterilmiştir. X-bağlı apoptoz proteini(XIAP)'nin inhibe edildiği, fosfoinositid kinaz-3/protein kinaz B (PI3K) ve IL-8 salgılanarak nötrofillerin apoptozunu geciktirdiği bildirilmiştir [76].

Bakterinin iki membranı ve inklüzyon membranı boyunca T4SS tarafından Ats-1 (Anaplasma translokasyon faktörü 1) salgılanır. Ats-1'in enfekte insan nötrofillerinin sitoplazmasına geçerek mitokondri matrisine lokalize olduğu bildirilmiştir. Hücre kültürü hatlarında (HL-60, HeLa hücreleri) Ats-1 lokalizasyonu gösterilmiştir Antiapoptotik mekanizmadan Ats-1'in kimen sorumlu olduğu bildirilmiştir [77].

2.10.5. Otofajinin Engellenmesi

Organizmayı korumak ve hücre içinde istenmeyen nesnelere ve hücre içi patojenlerin sindirilmesi için ökaryotik hücrelerde otofaji gereklidir. Bu nedenle önemli doğal immün yanıt mekanizmalarından biri olarak kabul edilir. *A. phagocytophilum*, otolizozomlara olgunlaşmaz. Önemli olarak, otofagozom *A. phagocytophilum*'u öldürmek yerine enfeksiyonu destekler: Otofajinin rapamisin tarafından uyarılması, *A. phagocytophilum* enfeksiyonunu artırır. *A.*

phagocytophilum, nötrofillerin iki önemli doğal bağışıklık mekanizmasını manipüle eder, (apoptozu inhibe edip otofajiyi indükleyerek) konakçı hücreyi canlı tutar ve güvenli bir sığınak oluşturur [78].

2.10.6. Konakçı Hücre Sinyallerinin Etkinleştirilmesi ve Tirozin kinaz Aktivasyonu

İnsan fagositer lökositlerinin enfeksiyonunda protein tirozin kinaz aktivitesi gerekir. Bakteriyel enfeksiyon, spesifik olmayan protein tirozin kinaz inhibitörü genistein ve Chariot aracılı protein transfeksiyon sistemiyle, konakçı sitoplazmik antifosfotirozin iletimini inhibe eder [71].

A. phagocytophilum ile enfekte olmuş HL-60 hücrelerinde ve periferik kan nötrofillerinde Anka proteini, baskın fosfotirozin proteini. Çoklu ankirin tekrarlarına (AR) sahip bir efektör protein olan Anka, konak nötrofil sitoplazmasına enjekte edilir. Nötrofil çekirdeğine geçerek epigenomu değiştiren Anka, bakterinin konak uyumunu ve patojenin hücre içi gelişimini sağlar [65].

A. phagocytophilum'dan salgılanan Anka, nötrofil çekirdeğine geçerek tüm kromozomlar boyunca heterokromatin DNA ile kompleks oluşturur. Gen promotörlerine bağlanır, kromatin mimarisini düzenler. Anka, genom boyunca cis-transkripsiyonu düzenler. Böylece Nötrofil kromozomlarının büyük birleşik bölgeleri enfeksiyon sırasında farklı şekilde eksprese edilir. Anka, nötrofil yeniden programlamayı, mikrobiyal canlılığın devamını ve patojeniteyi artıran fonksiyonel değişiklikleri teşvik etmektedir [79]

Hücre dışından iletilen sinyalle hücre içinde yoğun bir şekilde protein kinazlar ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) eksprese edilir ve hücre yüzeyindeki bir reseptörden çekirdekteki DNA'ya sinyal iletir. ERK'ler, mitojenle aktive olan protein kinazlar olarak da bilinirler. *A. phagocytophilum* ile enfekte insan nötrofillerde enfeksiyondan 3 saat sonra ERK/MAPK yolu aktive olur. *A. phagocytophilum* ile enfekte HL-60 hücrelerinde de belirgin bir şekilde ERK1/2 aktivasyonu tespit edilmiştir [80].

2.11. *A. phagocytophilum*'a Karşı Gelişen İmmun Yanıtlar

Konakçı, bağışıklık yanıt tepkileri ile patojenleri ortadan kaldırır. Patojenler, konak hücre fonksiyonunu düzenleyebilir ve savunma hücrelerini uygun konakçılara dönüştürebilir. Hücre içi bakteri, konakçı hücreye kıyasla daha küçük bir genoma sahiptir. Bu nedenle hücre

fonksiyonunda ve bağışıklık tepkisinde sürekli değişiklikleri indükleyerek konakçı hücrede hayatta kalmak için etkili mekanizmalar oluşturur [75]. Konak hücre de bakteriyel epigenetik regülasyon genel bir mekanizma gibi görünmektedir. Bu mekanizma konakçı hücre fonksiyonunu değiştirerek enfeksiyonu kolaylaştırır ve patojenin hayatta kalmasını artırır. *A. phagocytophilum*, konakçı kromatininde epigenetik değişiklikler yaparak gen transkripsiyonunu regüle eder ve fenotipik modifikasyona yol açar [76].

2.11.1. Doğal İmmun Yanıt Tepkisi

Hastanın immün yanıt yeteneği ile orantılı olarak Anaplazmoz'un seyri değişmektedir. *Anaplasma* enfeksiyonuna karşı konak immün yanıt gelişimi konusunda yapılmış sınırlı sayıda çalışmada; immunopatoloji ve immün disfonksiyonun hastalığın şiddetli seyretmesine neden olduğu varsayılmaktadır. Deney fareleri *A. phagocytophilum* proliferasyon mekanizmaları ve hematolojik anormalliklerin nedenlerini belirlemek için yararlı bulunmuştur. Enfekte farelerde, insanlardaki Anaplazmoz'a benzer şekilde anemi, lökopeni ve trombositopeni gözlenmiştir. Anaplazmoz olduğu doğrulanan hastalarda proinflamatuvar sitokin düzeyleri, sağlıklı bireylere göre önemli ölçüde yükselmektedir. Hastalarda İnterferon gama (IFN- δ), IL-1 β , IL-8, IL-6, TNF- α ve IL-10 konsantrasyonu kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Hastalarda sitokin seviyesi yükseldiği oranda trombositopeninin şiddetlendiği belirtilmiştir [81].

Anaplazmoz'da proinflamatuvar sitokinler önemli ölçüde yükselmiştir. İnterferon gama (IFN- γ) konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre 7 kattan fazla yükseldiği tespit edilerek, en yüksek bulunan sitokin grubu olmuştur. Bir grup sitokin (IL-1 β , IL-8, IL-6, TNF- α ve IL-10) koordineli olarak yükseldiği bildirilmektedir. Enfeksiyonun ilk günlerinde (≤ 4 gün hasta) hastalarda en yüksek IFN- γ , IL-12p70 ve IL-2 seviyeleri görülmüştür. İshal ve kusma görülen hastalarda IL-13 ve IL-5 konsantrasyonları daha yüksek bulunmuştur. HL-60 hücre kültürüne *A. phagocytophilum* inoküle edildiğinde IL-8 üretildiği bildirilmiştir. İnsan perifer kan lökositleri ve monositlerinin güçlü IL-1 β , TNF- α ve IL-6 tepkileri bulunmaktadır. İnsanda proinflamatuvar sitokin üretiminden nötrofiller değil monositlerin sorumlu olduğu gösterilmiştir [82].

A. phagocytophilum ile enfekte insan nötrofillerinde proinflamatuvar sitokin ve kemokin yanıtlarının zayıf ve/veya gecikmiş olarak indüklendiği invitro olarak gösterilmiştir. Nötrofiller TLR2 reseptörleri ile *A. phagocytophilum* tarafından etki altına alınabilmektedir. *A. phagocytophilum* hücre içi sinyal iletiminde değişikliğe neden olarak enfeksiyonun devamını sağlar ve Nötrofiller enfeksiyon sırasında savunma hücresi gibi davranmaz. Enfekte nötrofillerde IL-8 seviyeleri önemli ölçüde artar. IL-8; nötrofillerin enfeksiyon bölgelerine göçünü indükler.

Rekombinant P44 proteini, nötrofillerde ve uyarılmış HL-60 hücrelerinde IL-8 sekresyonunu indüklemektedir [82].

A. phagocytophilum ile enfekte insan nötrofillerinde Signaling transducer activator of transcription (STAT) fosforilasyonunda azalma, IFN reseptörü CD119 ekspresyon seviyesinde azalma ve sitokin sinyal baskılayıcı (Suppressor of Cytokine Signaling, SOCS1) ve SOCS3 ekspresyonunda artış gösterilmiştir. Enfekte nötrofillerde IFN ile indüklenebilir kemokinlerin (IP-10/CXCL10 ve MIG/CXCL9'un) sekresyonunda belirgin bir inhibisyon gözlenmiştir [83].

İnsan monositlerinde bakteri LPS'lerine yanıt olarak proinflamatuvar sitokinlerin indüklendiği, MAPK ve NF- κ B'nin aktive olduğu bildirilmiştir. *A. phagocytophilum* ile enfekte insan nötrofillerinin, p38 MAPK'nın çok az aktive olduğu ve enfeksiyondan üç saat sonra p38 MAPK üretiminin azaldığı gösterilmiştir. Fare makrofajları *A. phagocytophilum* ile enfekte edildiğinde monositlerin yüzeyinde bulunan TLR2 ile bakteriyel lipoproteinler tanınarak NF- κ B aktivasyonu olduğu in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. Monositler ve diğer lökositlerin proinflamatuvar sitokinleri üretmesi; bakteri klirensine ve hastalığın iyileşmesine katkıda bulunmaktadır [84].

A. phagocytophilum enfeksiyonuna yanıt olarak IFN üretimi yapılabilmesi için, NOD benzeri reseptör (NLR) aile üyesi IPAF /NLRC4 gereklidir. C3H farelerinde yapılan deneylerde *A. phagocytophilum* inokülasyonundan iki gün sonra dalakta IL-12 ve IFN- γ mRNA seviyelerinde artış ile birlikte serumda IFN- γ seviyesinde önemli bir artış gösterilmiş, enfeksiyondan beş ve sekiz gün sonra enfekte nötrofillerin sayısında ciddi bir artış görülmüş ve riketsiyeminin iki hafta sonra söndüğü tespit edilmiştir. *A. phagocytophilum* ile enfekte HL-60 hücrelerinde, IFN- γ 'nın hücre içine sinyal gönderemediği bildirilmiştir [85].

Kemik iliği hücrelerinin IL-8 ve MIP-1 gibi kemokinlere maruz kalması miyeloid progenitör hücrelerin proliferasyonunu baskılar. *A. phagocytophilum* enfeksiyonuna eşlik eden hematolojik anormalliklerde, kemik iliğindeki kemokin düzeylerindeki değişikliklerin payı olduğu ileri sürülmüştür [86].

2.11.2. Kazanılmış bağışıklık

Gen eksikliği olan farelerde, ilk savunma için doğal öldürücü (NK) hücreler tarafından IFN üretiminin önemli olduğu, ancak sonraki savunmanın çoğunun Th1(CD4+ T) hücrelerinden perforin ve Fas/FasL salınımına bağlı olarak gerçekleştiği gösterilmiştir. Dış membran proteinleri (OMP) purifiye edilerek immunize edilen sığırlarda IFN- γ salınımına neden olduğu ve CD4+ T hücre yanıtı geliştiği ve OMP'ye özgü IgG2 üretildiği bildirilmiştir. Bağışıklanmamış enfekte sığırlarda CD4+ T hücre ilişkili olarak yüksek seviyede OMP spesifik IgG1 ve IgG2 üretimi tespit

edilmiştir [86]. *A. phagocytophilum* enfeksiyonu sırasında p44/ Msp2 tanınan baskın proteindir. Msp2 proteinlerinde enfeksiyon süresince sürekli olarak yeni antijenik varyasyonlar şekillenmektedir. p44/Msp2 proteini ile aşılana farelerde *A. phagocytophilum* enfeksiyonu önlenememiştir. Bunun nedeni p44'/Msp2'nin yeni varyantlarının ortaya çıkması ile açıklanmaktadır. Her yeni varyanta karşı spesifik IgG2 antikor yanıt geliştirilerek bakterinin opsonizasyonu gerçekleştirilmektedir. Daha önceki varyantlara karşı üretilen IgG2 antikorları yeni *A. phagocytophilum* varyantlarının eliminasyonunda başarısız olmaktadır [88].

Spesifik olarak CD4+ T hücrelerinin sayısında bir azalma ve CD4+ T hücrelerinin CD8+ T hücrelerine oranında değişiklikler oluşur. CD4+ T hücreleri ve Treg hücrelerinde oluşan düzensizlikler nedeniyle, hücre yüzeyinde antijen tanıyan CD25'in ekspresyonunda aksamalar sonucu immun yanıt yetersizliği şekillenir [86]. *A. phagocytophilum*'un MSP2/P44 varyantına ve korunmuş MSP5'e özgü antikor tepkilerinin aşırı derecede azalmasının nedeni olarak, lenfopeni kaynaklı veya uzun ömürlü bellek T ve bellek B hücreleri ile plazma hücrelerinin proliferasyonunun oluşmamasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür [88].

2.12. Klinik ve Laboratuvar Tanı

Avrupa'da hastaların medyan yaşı 53.5 olarak tespit edilmiştir [6]. Hastaların çoğu (%78.8) kene ısırmasını hastalığın başlangıcından ortalama 12.7 gün önce olduğunu belirtmiştir. Yıl içinde vakaların çoğu Nisan ve Ekim ayları arasında meydana gelmektedir. Enfeksiyonun erken akut fazında laboratuvar incelemesi nadiren yapıldığından, HGA'lı insanlarda bakteriyeminin süresinin ve yoğunluğunun belirlenmesi zordur. Serolojik olarak doğrulanmış vakaların %79.3'ünün ateş, %89'unun baş ağrısı, %67.6'sının yorgunluk veya halsizlik, %63.3'ünün miyalji, %56.6'sının artralji ve %39.2'sinin bulantı sorunu olduğu bildirilmiştir. Raporların büyük çoğunluğu ateş sıklığının %90-100 arasında değişmekte olduğunu ifade etmektedir [22].

Ateş, lökopeni, trombositopeni ve serum transaminazlarında yükselme görülen ve kene ısırığı öyküsü bulunan hastalarda Anaplazmozdan şüphelenilmelidir. Anaplazmozun endemik olduğu bir bölgede yaşamak veya bu bölgeye seyahat etmiş olmak, hastalık belirtilerinin yıl içerisinde kene aktivitesinin arttığı dönemler (ilkbahar, yaz veya sonbahar) gibi epidemiyolojik faktörler göz önüne alınmalı *Ehrlichia*, *Anaplasma* düşünülmelidir [11].

Yaygın laboratuvar bulguları; hastaların %93.03'ünde CRP yüksek; %90'ında yüksek karaciğer enzimleri (alanin transaminaz ve aspartat transaminaz seviyeleri); %83,7'sinde trombositopeni ve %63'ünde lökopeni görülmektedir. Vakaların %50'sinden azında laktat

dehidrojenaz ve neopterin seviyeleri yükselmiştir. Bazı yazarlar Anaplazmoz ve Lyme Borreliyoza ko-enfeksiyonları ile uyumlu başka klinik vakalar bildirmektedir [13].

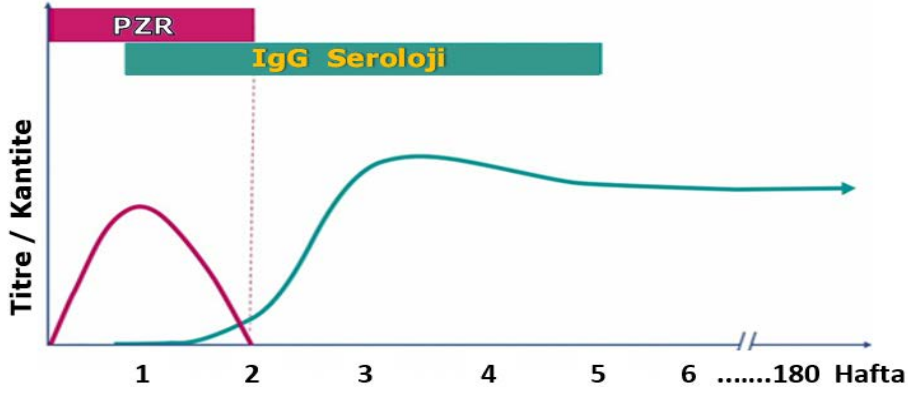
Diğer bazı klinik gözlemler; hastaların %51.5'inde sindirim sistemi belirtileri (kusma, ishal, karın ağrısı, splenomegali, hepatomegali), %23,8'inde ekzantem ve döküntü, %21,2'inde konjonktivit; %21,2'sinde lenfadenopati bildirilmiştir. Öksürük ve diğer solunum sistemi belirtileri %17.5 'inde görülmüştür. Hastaların %15.5'inde nörolojik belirtiler (en fazla vertigo, daha az olarak yüz felci, aseptik menenjit) bildirilmiştir. Taşikardi ve hipotansiyon bildirilen hastalar da bulunmaktadır. Anaplazmoz hastası ve aynı zamanda *B. burgdorferi* (s.l.) seropozitif hastalarda eritem/döküntü rapor edilmiştir [22].

Anaplazmoz ile uyumlu klinik hastalığı olanlara laboratuvar tanı testleri yapılmalıdır. Laboratuvar tanısında tercih edilecek yöntem klinik belirtilerin başlangıç zamanı ve mevcut numune materyalinin özelliklerine göre belirlenir. Hastalığın akut döneminde periferik kan granülositlerinin sitoplazmasında karakteristik bakteri kümeleri (morula) hastaların %20 ila %80 arasında değişen oranlarda gözlenir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) deneyi ile hastalığın akut döneminde *A. phagocytophilum* DNA'sı tespit edilerek veya iyileşme sonrasında kan serumunda antikorların saptanması ile geriye dönük olarak doğrulanabilir [90].

CDC'nin anaplazmoz olgu sınıflama algoritmasında;

- 1- Kliniği uyumlu hasta (kene ısırığı olan veya kene ile karşılaşmış, ateşli hastalığı olan).
- 2- Akut veya konvelesan dönemde tek pozitif IFA titresi $\geq 1/80$
- 3- Pozitif PZR veya kan örneğinde intrastoplazmik morula ların tespiti adımları tavsiye edilmektedir.

HGA ve HME olgu doğrulaması için; kliniği uyumlu hastalarda 2-4 hafta ara ile alınmış çift serum örneğinde IgG IFA titresinde 4 kat artışın görülmesi, DNA varlığının PZR ile kanda gösterilmesi, lökositler içinde morulanın gösterilmesi, biyopsi/otopsi örneklerinde antijenin immunolojik boyalar ile gösterilmesi gerektiği belirtilmiştir [91].



Şekil 2.4. HGA 'da laboratuvar tanı yöntemleri etkinliği [91].

2.12.1. Serolojik Tanı

İnsan granülositik anaplazmozis tanısında sıklıkla serolojik tanı yöntemleri kullanılmaktadır. Enfeksiyonun akut fazında (semptom başlangıcından <1 hafta ya kadar) serolojik testlerin duyarlılığının düşük olduğu gösterilmiştir [22]. Anaplazmoz tanısı için standart serolojik yöntem, İmmüoglobulin G (IgG) için geliştirilen indirekt immün floresan antikor (IFA) testidir. IgG IFA testleri hastalığın akut ve nekahat döneminde 2-4 hafta arayla alınmış serum örneklerinde dört kat serokonversiyon gösterilmeli veya en az 1/80 titrede antikor saptanmalıdır. HGA için $\geq 1/80$ antikor pozitifliği anlamlıdır [26].

Hastalığın ilk haftasında antikor titreleri çoğunlukla negatiftir. Anaplazmoz akut dönemde tek bir serum örneğindeki antikor sonuçları kullanılarak doğrulanamaz. Enfeksiyonun akut döneminde IgM IFA testleri uygulanabilir, ancak sadece IgM testi sonuçları hastalık belirteçleri olarak değerlendirilmemelidir. IgG antikorları daha spesifiktir. Yakın zamanda riketsiyoz geçirmiş olan ve başka destekleyici kanıt bulunmayan hastalarda. IgM antikorları yüksek kalabilir. Bu nedenle IgM antikor titreleri tek başına laboratuvar tanısında kullanılmamalıdır [26].

Enfeksiyon süresince *Anaplasma* türlerinin MSP2 ve MSP3 proteinlerinde sürekli olarak antijenik varyasyonlar şekillenmektedir. Bu varyasyonlara karşı varyant spesifik IgG2 yanıtı oluşmaktadır. IgG2 immün yanıtı yeni oluşan varyantların oluşturduğu enfeksiyonun tanısında kullanılabilmekte, fakat patojenlerin elimine edilmesinde başarısız kalmaktadır [88].

İmmün yetmezlik sorunu olan hastalarda serokonversiyon oluşmayabilir. HGA, *E. chaffeensis*, *E. ruminantum* ve diğer türler arasında çapraz reaksiyon görülebilir, bu nedenle türlerin ayırımını yapamaz ve yalancı pozitiflikler söz konusu olabilir [90]. Testlerde özgüllük

arayındaki artış, immunoblot yönteminin daha popüler olmasını sağlamıştır. Western blot (immunoblot) ve ELISA da tanıda kullanılır [89].

Avrupa'da henüz resmi HGA vaka tanımı olmamasına rağmen, hem Avrupa Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (ECDC) hem de Avrupa *Chlamydia*, *Coxiella*, *Anaplasma* ve *Rickettsia* Derneği yönergeleri, (daha önce ESCAR: ESCMID Çalışma Grubu; *Coxiella*, *Anaplasma*, *Rickettsia* ve *Bartonella* (ESCCAR)), CDC yönergeleri ile uyumludur [90].

2.12.1.1. Persiste Antikorlar

A. phagocytophilum'a karşı oluşan antikorlar, hastalık düzeldikten sonra aylarca yüksek kalabilir. Bazı kişilerde, akut hastalıktan dört yıl sonrasına kadar *A. phagocytophilum*'a karşı yüksek titrelere antikor gözlemlenmiştir. Tek bir serum örneğindeki antikor pozitifliği, şu anda aktif olan bir enfeksiyon mu, yoksa daha önce geçirilmiş enfeksiyona karşı oluşan immun yanıt mı olduğunun ayırımını yapamaz [91]. Tanıyı doğrulamak için serokonversiyon kanıtı veya akut ve nekahat dönemi serolojik testlerde IgG antikor titresinde 4 kat artış görülmesi gerekir [90].

Bazı bölgelerdeki sağlıklı insanların %5-10'u, *A. phagocytophilum* veya benzer organizmalara geçmişte maruz kalma nedeniyle yüksek antikor titrelerine sahip olabilir [89]. Yakın geçmişte enfeksiyon olduğunun kanıtı eşleştirilmiş ve uygun şekilde zamanlanmış serolojik testlerin karşılaştırılması ile sağlanır [92].

İnsanlarda *A. phagocytophilum* seroprevalansını tahmin etmek amacıyla dört kıtadan 56 ayrı çalışmanın verilerinin ele alındığı meta-analizde ortalama seroprevalans %8.4 (%6.6-10.4) bulunmuştur. Popülasyon dinamiği ve kıta türü gibi önemli enfeksiyon riski belirleyici unsurlar dikkate alınarak yapılan sınıflandırmalardan sonra bile prevalans heterojenliği yüksek bulunmuştur. Yüksek riskli gruplarda (orman alanlarındaki işçiler, hayvan yetiştiricileri, bitkisel üretim yapanlar ve hayvanlarla yakın teması olan diğer kişiler) tahmini *A. phagocytophilum* seroprevalansı %13,8 olarak tespit edilmiştir. Kene ile temas riski düşük popülasyonlarda bu oran daha düşük kalmaktadır [26].

2.12.2. PZR ile Laboratuvar Tanısı

Antikoagulanlı kan örneklerinden PZR ile amplifikasyon yapılır. Hastalığın ilk haftasında en duyarlı yöntem PZR'dır. Uygun antibiyotiklerin verilmesini takiben (24-48 saat içinde) duyarlılığı azalır. Pozitif PZR sonucu tanıya yardımcı olur, ancak negatif PZR sonucu tanıyı

dışlamaz ve negatif bir sonuç nedeniyle tedavi ertelenmemelidir. PZR ile DNA araştırmak için periferik kan, doku ve kemik iliği örnekleri kullanılabilir [91].

Bakterilerde ribozomal RNA genleri oldukça yüksek derecede korunmuşluğa sahiptir. Bu nedenle moleküler tanı ve identifikasyon çalışmalarında ve filogenetik karakterlerin araştırılmasında en çok tercih edilen gen bölgeleridir. Birçok bakterinin rRNA genleri tek bir operonda sıralanmış birçok kez tekrar eden bölgelerden oluşur. Genlerin yerleşimi genellikle benzerlik gösterir. *A. phagocytophilum*'un genomunda diğer *Rickettsia* türlerine benzer olarak yalnızca tek bir sıra *rrf*, *rrs* ve *rpl* kopyası bulunmaktadır [92].

ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC), anaplazmoz'la uyumlu klinik belirtileri olan hastalar için, PZR yöntemiyle *A. phagocytophilum* DNA'sının gösterilerek tanıya gidilmesini tavsiye etmektedir [90].

PZR uygulamaları hızlı sonuç veren oldukça duyarlı ve yüksek özgüllüğe sahip bir yöntemdir. Enfeksiyöz ajanı doğrudan tespit eder. Özellikle akut fazda IFA'dan daha duyarlıdır. PZR yöntemlerinin laboratuvar tanısında kullanımında hastalığın semptomlarının başlama zamanının bilgisine ihtiyaç bulunmaktadır [89].

Real-Time PZR ve Nested PZR; standart PZR'dan daha duyarlı olarak değerlendirilmektedir. PZR uygulamalarında dış membran proteinleri hedef alınmaktadır. Son zamanlarda Sitrat geni (*gltA*) de PZR hedefi olarak kullanılmaktadır [90].

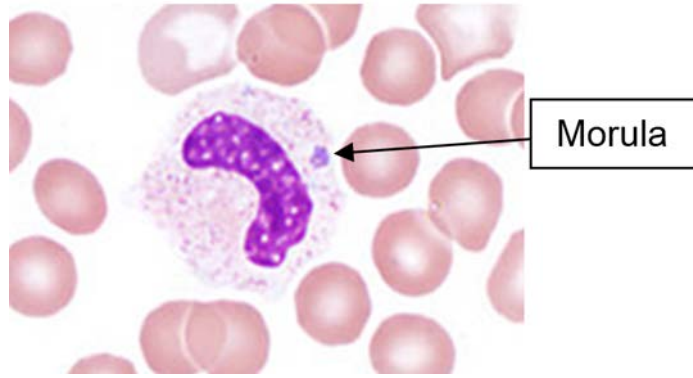
Anaplasma phagocytophilum'un moleküler tanımlamaları ve moleküler karakterizasyonun belirlenmesi çalışmalarında en çok kullanılan dominant protein *msp-2* geni olmuştur [38]. *Msp-2* gen bölgesi yüksek değişkenlik gösterdiği için tür içi varyasyonların belirlenmesi çalışmalarında da tercih edilmektedir. *Msp2* primerler *A. phagocytophilum* Amerika suşlarının teşhisinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Avrupa'da araştırmacılar farklı varyantların belirlenmesi amacıyla yeni primerler tasarlamışlardır [93].

AnkA, cis-transkripsiyonu azaltmak için nötrofil gen promotörlerine bağlanır ve ayrıca üç boyutlu kromatin mimarisini düzenler ve topolojik olarak ilişkili kromatin alanlarında kodlanan transkripsiyonel programları koordine eder. AnkA bağlanma bölgelerinin tanımlanması ile *A. phagocytophilum* enfeksiyonunun nötrofil genomunun yeniden programlanmasının sonuçlarını daha iyi aydınlatacağı düşünülmektedir. AnkA proteinini kodlayan gen bölgelerini çoğaltan LA1/LA6 primerleri tek basamaklı PZR protokolleri ile ANK-F1/ANK-R1 ve ANK-F2/ANK-R2 primerler kullanılarak iki basamaklı PZR uygulaması dizaynedilmiştir [79].

2.12. 3. Mikroskobik İnceleme

Periferik kan, kemik iliği ve BOS'ta yayma ile hazırlanan Giemsa boyalı preparatlarda, granülositlerin sitoplazmasında intrastoplazmik inklüzyonlar (kümeler veya organizmalar, morula) saptanır. Morulaların (anaplazmaların mikrokolonileri) tespit edilmesi tanıyı kuvvetle düşündürür [90].

Anaplazmoz'un ilk haftasında akut ateşli dönemde vakaların %25-75 'inde morulalar görülebilir. Mikroskopik incelemede morulaların görülmesi; *Anaplasma* soy düzeyinde özgüllüğü yüksek kabul edilmekle beraber, duyarlılığı düşüktür ve deneyim gerektiren bir yöntemdir. Dohle cisimleri ve toksik granülasyonlar yanlış pozitif olarak değerlendirmelere neden olabilir. Morulaların gözlenmesi ile *Anaplasma* türleri arasında kesin bir ayırım yapılamaz. Kan yayma incelemesinin nispeten duyarsız olduğu ve anaplazmoz teşhisi için yeterli güvenilirliğe sahip olmadığı belirtilmektedir [94].

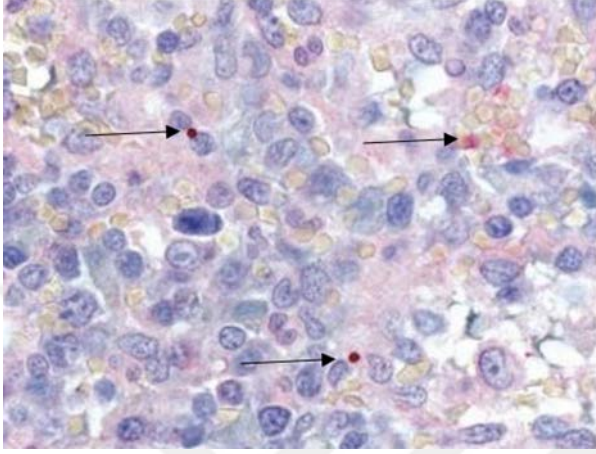


Şekil 2.5. Periferik kan yaymasında granülositte *A. phagocytophilum* morula yapısı. (Fotoğraf /Bobbi S. Pritt, Mayo Clinic'ten alınmıştır.)

2.12.4. İmmunohistokimya ve Kültür Uygulamaları

İmmunohistokimya uygulaması biyopsi/otopsi örneklerinde antijenin immun boyanması ile etkenin varlığının gösterilmesi esasına dayalı bir yöntemdir. *A. phagocytophilum*'un immunohistokimyasal testlerle gösterimi ve kültürde izolasyonu yalnızca uzmanlaşmış laboratuvarlarda yapılabilir. Kan kültürlerinde mikroorganizmanın kültürü yapılamaz. Otopsi doku örneklerine PZR, hücre kültürü ve IHC testleri uygulanabilir. Sitopeni araştırması için kemik iliği biyopsisi yapıp, kemik iliği biyopsi örneğinin immun boyanması ile *A. phagocytophilum* enfeksiyonu teşhis edilebilir [95].

Klinik örneklerde kültür en kesin tanı yöntemidir. Vakaların %40'ında inkübasyon döneminde pozitifdir. HGA, Avrupa, Asya ve ABD'de tanımlanmasına rağmen, *A. phagocytophilum* insan izolatları ABD dışında henüz bildirilmemiştir. Ancak çeşitli hayvan kökenleri üretilmiştir. İzolasyon en iyi insan promiyelositik hücre dizisi HL-60'ta başarılmıştır ve periferik kan yaymasında saptanmadığında da başarılı olduğu bildirilmektedir. Eritrositler HL-60 hücrelerine olumsuz etki yaratmadığından EDTA'lı antikoagülanlı kan doğrudan inoküle edilebilir [53].



Şekil 2.6. Immunohistokimyasal boyama ile dalakta *A. phagocytophilum* morularının (kırmızı) görünümü (Fotograf/CDC'den alınmıştır.) [79].

2.13. Tedavi

Klinik olarak anaplazmoz ile uyumlu hastalığı olanlarda laboratuvar tanı testi yapılmalı, aynı anda tedaviye başlanmalıdır [22]. Hemen hemen tüm hastaların antibiyotik tedavisinin tamamlanmasından sonra *A. phagocytophilum*'a karşı antikor geliştirdiği bildirilmiştir [90].

Hastalar Doksisisiklin ile genellikle hızlı iyileşme başarılı bir şekilde tedavi olur. *Anaplasma* infeksiyonlarının bir kısmı, spesifik antibiyotik tedavisi olmadan iyileşebilmektedir. Ancak ileri yaş ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda tanının gecikmesi, kötü prognoz ve ölüm riski oluşturabilir. Anaplazmozdan şüphelenilen bir durumda ve HGA'yı doğrulayan tüm vakalarda derhal antibiyotik tedavisinin başlatılması savunulmaktadır [13].

Anaplazmoz, Erlişiyoz ve Rocky Mountain Benekli Ateşi, doksisisiklin ile aynı şekilde tedavi edilir. Bu hastalıklardan herhangi birinin klinik şüphesi tedaviye başlamak için yeterlidir. Tedavi rejimleri hastanın yaşına, tıbbi geçmişine, altta yatan sağlık koşullarına, hamilelik durumuna veya allerjilerine bağlı olarak düzenlenmesi gerekebilir [96].

İnsan granülositik anaplazmoz vakalarının tedavisinde oral veya intravenöz olarak verilen doksisisiklin hiklat, 24-48 saat içinde klinik iyileşme sağlamaktadır. 7-10 gün süreyle doksisisiklin ile tedavi edilen hastalarda enfeksiyonun tamamen düzeldiği ve hiç nüks olmadığı belirtilmektedir.

İlaç reaksiyonu riski taşıyan hastalarda rifampin tedavisi düşünülmelidir [13]. Florokinolonlar in vitro olarak *A. phagocytophilum*'a karşı etkili olmasına rağmen, HGA hastalarında infeksiyonun nüksetmesine neden olabildiği için önerilmemektedir [96].

Prenilasyon inhibitörü manumisin A, *A. phagocytophilum* enfeksiyonunu etkili bir şekilde inhibe etmektedir. Manumisin A bakteriyi doğrudan etkisiz hale getirerek infeksiyonun azalmasına ve ERK1/2 aktivasyonunun azalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, manumisin grubu ilaçların HGA için terapötik bir potansiyeli olabileceği belirtilmektedir [97].

2.14. Korunma ve Kontrol

2.14. 1. Keneden Korunma

Evcil hayvanlarda mevcut hastalık önleme stratejileri kene istilasının azaltılmasına yönelik olarak belirlenmektedir. Meralarda kimyasal akarisitler kullanarak kene mücadelesi yapılmaya çalışılmaktadır. Kenelerin aktif olduğu sezon boyunca kene mücadelesi çalışmalarının tekrarlanması önerilmektedir [96].

Son zamanlarda kene yönetimi için biyolojik kene kontrolü çalışmaları çekici bir yaklaşım olmaya başlamıştır. Kenelerin az sayıda doğal düşmanı bulunduğu için kenelerin biyolojik kontrolü zordur. Biyolojik kontrol üzerine yapılan çalışmalar bakteri, entomopatojenik mantar ve nematod üzerinde yoğunlaşmış, ancak henüz doğal yaşam alanlarında sürdürülebilir başarılı bir biyolojik kontrol sağlanamamıştır [8].

2.14.2. *A. phagocytophilum*'a Karşı Aşı Geliştirme Çalışmaları

A. phagocytophilum'un aşı adayları olabilecek farklı antijenik yapılar kullanılarak; deney hayvanlarında çeşitli denemeler yapılmış ve kısmi immün yanıt olduğu rapor edilmiştir. Rekombinant VirB9-1, VirB9-2 ve VirB10 ile aşılanmış farelerde, spesifik olarak *A. phagocytophilum* ile reaksiyona giren antikor tepkileri tespit edilmiş, yalnızca VirB10 ile aşılanan fareler, IFN- γ CD4⁺ T hücrelerinde önemli bir artış ve *A. phagocytophilum* enfeksiyonuna karşı kısmi koruma geliştirmiştir [98].

A. phagocytophilum adhesin bağlama alanları AipA veya Asp14'e karşı farelerde yapılan bağışıklama çalışmalarında enfeksiyona karşı koruma sağlandığı belirtilmektedir. Periferik kan

bakteri yükünü azaltmak için yeterli olduğu ve in vitro hücresel enfeksiyonu inhibe eden antikoları ortaya çıkardığı gösterilmiştir. *A. phagocytophilum*'un tüm varyantlarını kapsayan korunmuş antijenleri seçmek aşı geliştirme sırasında karşılaşılan en önemli zorluk alanıdır. *A. phagocytophilum*'a karşı henüz mevcut bir aşı bulunmamaktadır. Birkaç aşı adayı önerilmiştir, ancak etkili bir aşı geliştirilememiştir [99].

2.14.3. Kene Aşısı Çalışmaları

Kenelere karşı aşı geliştirilmesi HGA'nın da içinde bulunduğu kene kaynaklı patojenlerin bulaşmasının önlenmesinde alternatif bir seçenek olarak değerlendirilmektedir. Başarılı bir kene aşısı geliştirilmesiyle hem kenelerin kontrolü, hem de patojen bulaşmasının engellenmesi amaçlanmaktadır. Risk altındaki insan ve hayvan popülasyonunun bağışıklanması veya patojen bulaşmasını en aza indirmek için rezervuar konakçıların bağışıklanması ile kene kaynaklı enfeksiyonlar kontrol edilebilir [45].

Hedeflenen antijenin saflaştırılmış veya rekombinant bileşenlerinden oluşan ikinci nesil aşı grubunda yer alan bağırsak, tükürük veya semen antijen aşıları (rekombinant Bm/Ba 86, Bm91 ve 64TRP) test edilmiş ve rekombinant Bm86 tipi aşı 1990'ların başlarından bu yana piyasada bulunmaktadır. Kenelerin beslenme ve üremesinde rol alan ve kene türleri arasında yüksek oranda korunmuş bir protein olan Subolesin bir diğer aşı hedefi olarak görülmüştür. Subolesin ekspresyonu inhibe edilmek suretiyle erkek kenelerde; bağırsak, tükürük bezi, üreme ve embriyonik dokularda oluşturulacak dejenerasyonlarla kısırlığa neden olması beklenen aşı adayları test aşamasındadır [100].

Tersine aşılama bilimi (Reverse Vaccinology, RV) kapsamında; sistem biyolojisi, biyoinformatik ve fonksiyonel genomik disiplinlerin metodolojilerinin kullanıldığı yeni nesil teknolojiler içeren aşı çalışmaları bulunmaktadır. Bu yöntemle kenenin tüm genomunun siliko taraması yapılarak önemli immunojenik yapıların kodlandığı genler tanımlanmakta ve immunojen bölgelerden geliştirilen antijenler RV aşı adayları olarak test edilmektedir. RV yöntemleri kullanılarak kene karşıtı iki farklı tip aşı çalışması devam etmektedir. Bunlardan biri gen yıkım yöntemi RNAi ve diğeri mikrodizi analizi yaklaşımlarının kullanıldığı çalışmalardır. Kene aşıları başarılı olduğu takdirde; kimyasal kontrol önlemlerine kıyasla maliyet etkin ve çevre dostu yöntemler olacağı değerlendirilmektedir [101].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışma planı;

(i) Araştırma sahasının, odaklarının belirlenmesi,

(ii) Saha çalışmaları,

(iii) Laboratuvar çalışmaları:

a- Kenelerin morfolojik tanımlaması,

b- PZR uygulamaları

(iiii) Verilerin yorumlanması ve değerlendirilmesi süreçlerinden oluşmaktadır

3.1. Araştırma Sahası (Odaklar) Belirlenmesi

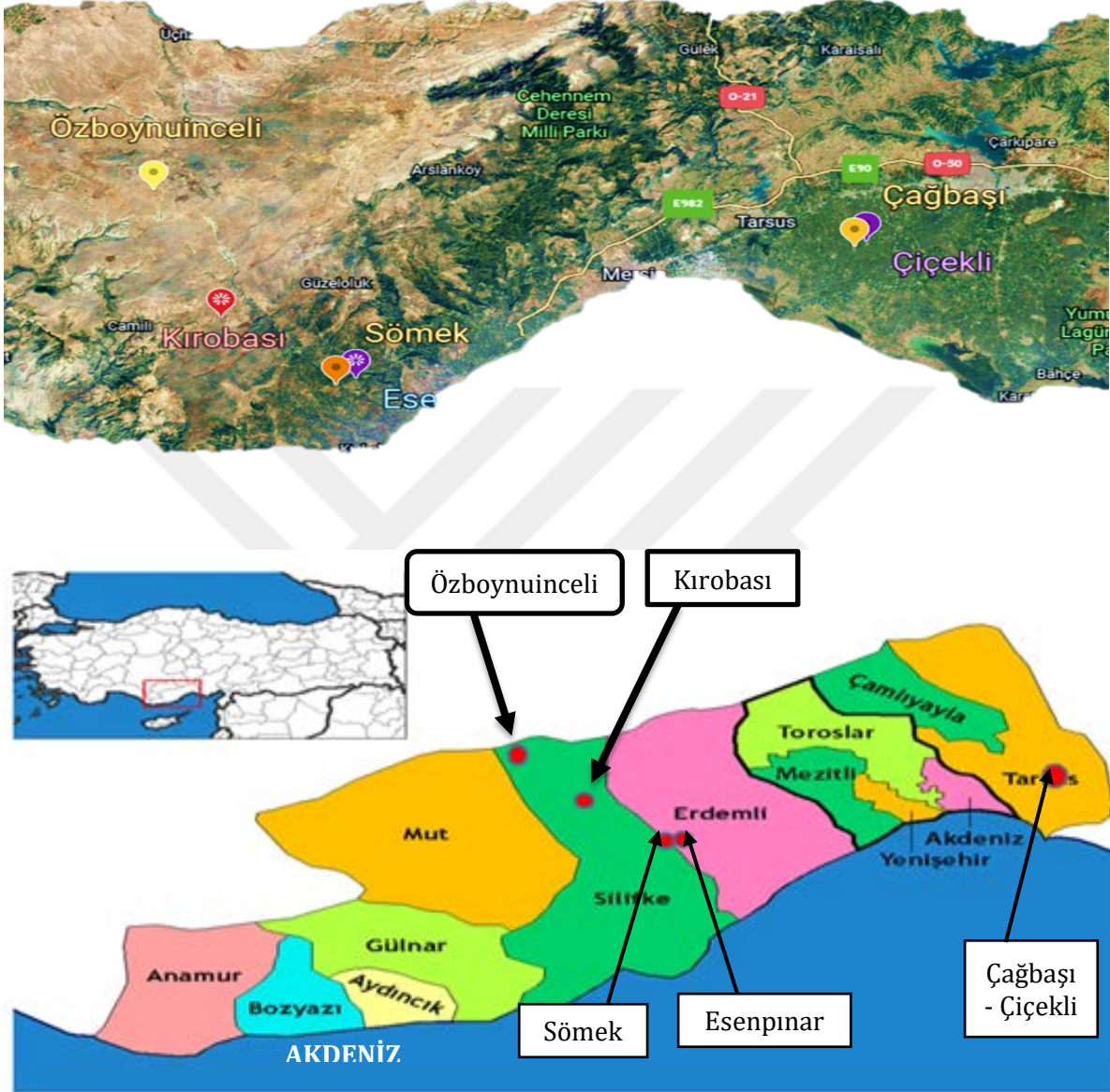
Araştırma odakları belirlenirken Mersin Yöresinin iklim ve coğrafik yapısı dikkate alınmıştır. Mersin Yöresi, Akdeniz kıyısında yer almaktadır. Köppen-Trewartha iklim sınıflandırmasına göre Mersin Yöresi; subtropikal iklim özelliklerine sahiptir. Kışları ılıman, yazları çok sıcak ve kuraktır. Rakım yükseldikçe bağıl nem oranı azalmakta, karasal iklim geçişi görülmektedir.

Kene türleri farklı iklim koşullarına adapte olmuştur. Bazı türler nemli ılıman iklim (Örn: *Ixodes ricinus*) koşullarında, bazı türler ise (Örn: *Dermacentor marginatus*) karasal iklim özellikleri gösteren kurak alanlarda yaşamaktadır. Daha fazla kene türüne ulaşmak için Mersin Yöresi'nde farklı iklim özelliklerine sahip odaklar tercih edilmiştir. Kenelerin toplandığı coğrafik lokasyonlar deniz seviyesine göre, nemli ılıman iklim özelliği gösteren bir bölge, yarı karasal iklime geçiş bölgesi ve yarı karasal iklim bölgesi olmak üzere üç bölge tercih edilmiştir. Çalışma lokasyonlarının koordinatları ve deniz seviyesine göre yükseklikleri aşağıdaki tabloda (Tablo 3.1.) verildi.

Tablo: 3.1. Kene toplanan odakların coğrafik bilgileri

Bölgeler	İlçe	Odaklar	Koordinatlar	Rakım
I. Bölge	Tarsus	Çiçekli Mah.	36° 53'26" N 35° 06'21"E	6 M
		Çağbaşı Mah.	36°51'45" N 35°03'41" E	5 M
II. Bölge	Erdemli	Esenpınar Mah.	36°36'13"N 34°07'13" E	836M
	Silifke	Sömek Mah.	36°35'38"N 34°04'50"E	874 M
III. Bölge	Silifke	Kırobası Mah.	36°43'53"N 33°51'51"E	1404 M
		Özboynuinceli Mah.	36°58'26"N 33°44'14" E	1886 M

Silifke, Erdemli ve Tarsus ilçelerinde (Şekil 3.1) seçilen bölgelerden *Ixodida* ailesine ait keneler toplandı.



Şekil 3.1. Kenelerin toplandığı araştırma sahası haritası

3.2. Saha çalışması (Kenelerin Toplanması)

Kenelerin aktif olduğu Nisan 2020 ile Kasım 2020 ayları arasında kene toplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Keneler doğal yaşam alanlarından (Tablo 3.1.) ve hayvanların (Sığır, Koyun, Keçi) üzerinden toplandı. Herbir lokasyondan her ay kene toplama çalışması yapıldı. Keneler

doğal yaşam alanlarından toplanırken çarşaflama yöntemi kullanıldı. Hayvanların üzerinde tutunmuş olan keneler, kene çıkarma aparatları ile çıkartıldı.



Şekil 3.2. Hayvanlardan ve sahadan kene toplama çalışmaları

3.3. Laboratuvar Çalışmaları

3.3.1. Kene Türlerinin Morfolojik İdentifikasyonu

Sahadan ve hayvanların üzerinden toplanan kenelerin laboratuvarında stereo mikroskopta, vücut organ yapılarındaki anatomik farklılıklar ile soy ve türlerin özel işaretlerinden oluşturulan teşhis anahtarı [8] yardımıyla karşılaştırılarak identifikasyon yapıldı. Odaklardan toplanan toplam 1497 adet *Ixodid* kenenin tanımlama çalışması tamamlandığında 4 soy içerisinde bulunan 11 türe ait olduğu tespit edildi. Örnekleme dahil edilen kenelerin odaklara göre dağılımları ve genel dağılım bilgileri (tür, cinsiyet, toplama tarihi, toplama odağı) bulgular bölümünde tablolar ve grafiklerle gösterilmiştir. Morfolojik tanımlama çalışmaları Şekil 3.3. 'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Stereo mikroskopta kene tanımlama çalışması

3.3.2. Kenelerin PZR Uygulaması için Gruplandırılması

Çalışmaya dahil edilen tüm kenelerin stereo mikroskopta (olympus SZX7, Japan) morfolojik identifikasyonu gerçekleştirildikten sonra bölge, soy, tür, cinsiyet ve toplama tarihlerine göre gruplar oluşturuldu. Gruplar PZR çalışmasında kullanılmak üzere her bir 1,5ml eppendorf tüp içerisindeki ağırlık ortalama yaklaşık 100 mg , hacimleri ortalama 450-500µl aralığında olacak şekilde standardize edildi. Gruplamada kene adedi doymuşluk durumlarına göre değişkenlik göstermektedir. Örneklemimizdeki 1497 adet keneden 210 adet grup/havuz oluşturuldu. Eppendorf tüpler üzerine kodlama yapılarak PZR çalışması yapılana kadar -20°C'de bekletildi. PZR çalışmasında kullanılmak üzere oluşturulan kene grupları Tablo:3.2.' de , Tablo 3.3.'te ve Tablo 3.4.'te gösterildi.

Tablo 3.2. Tarsus (Çağbaşı – Çiçekli,) odağı kene havuzları

Odak	Toplama Tarihi	Kene türü / havuz kodları / havuzda bulunan kene sayısı ve cinsiyeti	Havuz sayısı
Tarsus/ Çiçekli Mh., Çağbaşı Mh,	01.04.2020	<i>Rhipicephalus turanicus</i> ; 1-301 (5 ♀) , 1-302 (10 ♂) , <i>Rhipicephalus sanguineus</i> ; 1-303 (5 ♀) , 1-304 (5 ♀) , 1-305 (6 ♀) , 1-306 (6 ♀) , 1-307 (6 ♀) , 1-308 (10 ♂) , 1-309 (10 ♂) , 1-310 (15 ♂) ,	101 grup
	12.05.2020	<i>Hyalomma excavatum</i> ; 1-401 (6 ♀) , 1-402 (6 ♀) , 1-403 (6 ♀) , 1-404 (6 ♀) , 1-405 (6 ♀) , 1-406 (6 ♀) , 1-407 (6 ♀) , 1-408 (6 ♀) , 1-409 (10 ♂) , 1-410(10 ♂) , 1-411 (10 ♂) , 1-412(10 ♂) , 1-413 (10 ♂) , 1-414 (10 ♂) , He1-415 (10 ♂) , 1-416 (10 ♂) , 1-417 (10 ♂) , 1-418 (8 ♂)	
		<i>Hyalomma anatolicum</i> ; 1-419 (7 ♀) , 1-420 (6 ♀) , 1-421 (3 ♂) , <i>Hyalomma marginatum</i> ; 1-422 (1 ♀) , 1-423 (3 ♂)	
13.06.2020	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> ; 1-424 (6 ♀) , 1-425 (11♂) , <i>Rhipicephalus turanicus</i> ; 1-426 (4 ♂) , <i>Rhipicephalus bursa</i> ; 1-427(1 ♂) , 1-428(2 ♀)		
		<i>Hyalomma a. excavatum</i> ; 1-601 (5♀) , 1-602 (5 ♀) , 1-603 (5 ♀) , 1-604 (5 ♀) , 1-605 (5 ♀) , 1-606 (5 ♀) , 1-607 (10 ♂) , 1-608 (10 ♂) , 1-609 (10 ♂) , 1-610 (10 ♂) , 1-611 (10 ♂) , 1-612 (10 ♂) , 1-613 (10 ♂) , <i>Hyalomma marginatum</i> ; 1-614 (6 ♀) , 1-615 (5 ♀) , <i>Rhipicephalus turanicus</i> ; 1-616(7 ♀) , 1-617 (7 ♀) , 1-618 (16 ♂) , <i>Rhipicephalus sanguineus</i> ; 1-619 (8 ♀) , 1-620 (9 ♂)	

	11.07.2020	<p><i>Hyalomma excavatum</i>; 1-801 (6 ♀), 1-802 (6 ♀), 1-803 (6 ♀), 1-804 (6 ♀), 1-805 (6 ♀), 1-806 (6 ♀), 1-807 (6 ♀), 1-808 (6 ♀), 1-809 (6 ♀), 1-810 (6 ♀),</p> <p>1-811 (15 ♂), 1-812 (15 ♂), 1-813 (15 ♂), 1-814 (15 ♂), 1-815 (15 ♂), 1-816 (15 ♂), 1-817 (15 ♂), 1-818 (15 ♂), 1-819 (15 ♂), 1-820 (15 ♂), 1-821 (14 ♂), 1-822 (14 ♂),</p> <p><i>Hyalomma marginatum</i>; 1-823 (5 ♀), 1-824 (2 ♂),</p> <p><i>Hyalomma impeltatum</i>; 1-825(1♀)</p> <p><i>Rhipicephalus sanguineus</i>; 1-826 (8 ♀), 1-827 (8 ♀), 1-828 (8 ♂)</p> <p><i>Rhipicephalus turanicus</i>; 1-829(2 ♀), 1-830 (7 ♂),</p>	
	12.08.2020	<p><i>Hyalomma a. excavatum</i>; 1-1301 (6 ♀), 1-1302 (5 ♀), 1-1303 (6 ♀), 1-1304 (10 ♂), 1-1305 (10 ♂), 1-1306 (10 ♂), 1-1307 (10 ♂), 1-1308 (8 ♂)</p> <p><i>Rhipicephalus sanguineus</i>; 1-1309(7 ♀), 1-1310 (5 ♂),</p> <p><i>Rhipicephalus bursa</i>; 1-1311(4 ♀),</p>	
	14.9.2020	<p><i>Rhipicephalus sanguineus</i>; 1-2101(8 ♀), 1-2102 (4 ♂),</p>	

Tablo 3.3. Esenpınar-Sömek odağı kene havuzları

Odak	Toplama Tarihi	Kene türü / Havuz Numarası / Havuzda bulunan kene sayısı ve cinsiyeti	Havuz sayısı
Erdemli/ Esenpınar Mh., Silifke / Sömek Mh.	20.05.2020	<p><i>Hyalomma excavatum</i>; 2-201(1 ♀), 2-202 (1 ♂),</p> <p><i>Hyalomma marginatum</i>; 2-203 (2 ♀), 2-204 (6 ♂),</p> <p><i>Rhipicephalus sanguineus</i>; 2-205 (4 ♀),</p>	37 grup
	24.06.2020	<p><i>Hyalomma marginatum</i>; 2-1101 (7 ♂),</p> <p><i>Rhipicephalus bursa</i>; 2-1102(6 ♀), 2-1103(6 ♀), 2-1104(6 ♀), 2-1105(6 ♀), 2-1106(6 ♀), 2-1107(6 ♀), 2-1108(7 ♀),</p> <p>2-1109 (15 ♂), 2-1110 (14 ♂), 2-1111 (14 ♂), 2-1112 (14 ♂), 2-1113 (14 ♂),</p> <p><i>Rhipicephalus sanguineus</i>; 2-1114 (6 ♀), 2-1115 (5 ♀) 2-1116 (5 ♀),</p>	
	15.07.2020	<p><i>Hyalomma excavatum</i>; 2-1701(7 ♀), 2-1702(8 ♂), 2-1803(6 ♀),</p> <p><i>Hyalomma marginatum</i>; 2-1801(8 ♀), 2-1802(5 ♂),</p> <p><i>Rhipicephalus bursa</i>; 2-1804(5 ♀),</p> <p><i>Rhipicephalus sanguineus</i>; 2-1805(4 ♂),</p>	

20.08.2020	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> ; 2-1001(5 ♀), 2-1002(6 ♀), 2-1003(6 ♀), 2-1004 (6 ♀), 2-1005(13 ♂),
19.09.2020	<i>Rhipicephalus bursa</i> ; 2-1201(6 ♀), 2-1202(6 ♀), 2-1203(11 ♂)

Tablo 3.4. Kırobası-Özboynuinceli (Silifke) odağı kene havuzları

Silifke / Kırobası Mh., Özboynuinceli Mh.)	05.05.2020	<i>Rhipicephalus bursa</i> ; 3-501 (6 ♀), 3-502 (6 ♀), 3-503 (6 ♀), 3-504 (6 ♀), 3-505 (5 ♀), 3-506 (5 ♀), 3-507 (11 ♂), 3-508 (11 ♂) <i>Rhipicephalus sanguineus</i> ; 3-509(6 ♀), 3-510(6 ♀), 3-511 (6 ♀), 3-512 (3 ♂) <i>Rhipicephalus turanicus</i> ; 3-513 (7 ♀), 3-514 (6 ♀), 3-515 (10 ♂),3-516 (10 ♂), 3-517 (7 ♂) <i>Hyalomma excavatum</i> ; 3-518 (3 ♀), 3-519 (2 ♂) <i>Hyalomma marginatum</i> ; 3-520 (2 ♂) <i>Haemophysalis sulcata</i> ; 3-521 (1 ♂)	72 grup
	01.06.2020	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> ; 3-901 (6♀), 3-902 (4 ♂), <i>Hyalomma marginatum</i> ; 3-903 (6♀), 3-904 (10 ♂), 3-906 (7♀), 3-907 (9♂), <i>Hyalomma excavatum</i> ; 3-905 (5♀), <i>Hyalomma impeltatum</i> ; 3-908 (1 ♀), 3-909 (1 ♂),	
	03-07.07.2020	<i>Hyalomma marginatum</i> ; ; 3-1401 (6♀), 3-1402 (12 ♂), <i>Rhipicephalus bursa</i> ; 3-1403 (2 ♀), 3-14024(1 ♂), 3-1901(6 ♀), 3-1902(5 ♀), 3-1903(10 ♂) <i>Hyalomma excavatum</i> ; 3-1904(1 ♀)	
	1.08.2020	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> ; 3-101 (8 ♀), 3-102 (14 ♂), <i>Rhipicephalus bursa</i> ; 3-103 (1 ♀), <i>Hyalomma excavatum</i> ; 3-104 (1 ♀), 3-105(2 ♂),	

13-20.09.2020	<p><i>Dermacentor marginatus</i>; 3-2201 (5 ♀), 3-2202 (6 ♀), 3-2203 (11 ♂), 3-2308 (5 ♀), 3-2309 (12 ♂),</p> <p><i>Dermacentor reticulatus</i>; 3-2310 (5 ♂)</p> <p><i>Rhipicephalus bursa</i>; 3-2204 (5 ♀), 3-2205 (6 ♀), 3-2206 (6 ♀),</p> <p><i>Haemophysalis sulcata</i>; 3-2301 (5 ♀), 3-2302 (5 ♀), 3-2303 (6 ♀), 3-2304 (6 ♀), 3-2305 (6 ♀), 3-2306 (5 ♂),</p> <p><i>Rhipicephalus turanicus</i>; 3-2307 (2 ♀),</p>	
28.10.2020	<p><i>Haemophysalis sulcata</i>; 3-2401 (7 ♀), 3-2402 (7 ♀), 3-2403 (7 ♀), 3-2404 (7 ♀), 3-2405 (7 ♀), 3-2406 (7 ♀), 3-2407 (7 ♀), 3-2408 (7 ♀), 3-2409 (7 ♀), 3-2410 (7 ♀), 3-2411 (8 ♀), 3-2412 (3 ♂),</p> <p><i>Dermacentor marginatus</i>; 3-2413 (6 ♀), 3-2414 (9 ♂),</p>	

3.4. Kenelerden DNA Ekstraksiyonu

Örnekleme dahil edilen tüm kenelerin stereo mikroskopta morfolojik identifikasyonu yapıldıktan sonra genomik DNA'larını elde etmek için QIAmp DNA Mini kit 250 (QIAGEN, Valencia, California, USA) üreticinin talimatlarına göre kullanıldı. Elde edilen ekstraktlar PZR analizleri yapılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Genomik DNA ekstraksiyonunun basamakları aşağıda verildi.

- Her bir kene örneği biyogüvenlik kabini içerisinde steril bistüri ile kesilerek parçalara ayrıldı, ortalama 25mg olarak eppendorf tüplere yerleştirildi, üzerine 180ml buffer ATL eklendi ve 15sn vortekslendi.
- Bu homojenat üzerine 25µl proteinaz K eklendi. Kısa bir vortekleme sonrasında eppendorf tüpler 56°C ye getirilmiş ısıtıcı bloka konuldu. Isıtıcı blokta inkube edildi. 5-10dk aralıklarla vortekleme yapıldı. Isıtıcı blokta 2 saat inkubasyon sonunda dokular tamamen eridiğinde kısaca vortekslendi.
- Eppendorf tüpe 200ml Buffer AL eklendi. 10-15sn vortekslendikten sonra ısıtıcı blokta 70°C de 10dk inkube edildi. Vortekslendi, kısa süre santrifüj edildi.
- Eppendorfa 200ml absolut etanol eklendi. 10sn vortekslenerek, 15sn santrifüj edildi.
- Karışım koleksiyon tüp içerisinde bulunan spin koluma eklendi, 8000rpm (8g) de 1 dk santrifüj edildi.
- Spin kolum yeni bir koleksiyon tüpe yerleştirildi. 500µl AW1 eklendi. 8000rpm (8g) de 1dk. santrifüj edildi.

- Spin kolum yeni bir koleksiyon tüpe yerleştirildi. 500µl AW2 eklendi. 14.000rpm (14g) de 1dk. santrifüj edildi.

- Spin kolum 1,5ml eppendorf tüpe alındı, üzerine 50µl AE eklendi 1dk oda ısısında inkube edildi. sonra 8000rpm de 1dk santrifüj edildi. Spin kolum tüpten çıkarıldı ve eppendorf tüp içeriği hedef (template) DNA olarak kullanıldı. Aynı gün içerisinde PZR işlemi yapılana kadar +4°C de bekletildi. Daha sonra PZR yapılması planlanmış olan örnekler -20°C'de bekletildi.

3.4.1. DNA Konsantrasyonlarının Eşitlenmesi

Genomik DNA ekstraktlarının konsantrasyonları ASP-3700 (ACT Gene) nanodrop spektrofotometre cihazında 260/280 nm dalga boylarında ölçülerek belirlendi. DNA saflık derecesi A_{260}/A_{280} absorbans oranı ortalama 2.25 ± 0.32 olarak tespit edildi. PZR aşamasına geçilmeden önce genomik DNA konsantrasyonları, ultra grade distile su (sigma) ile uygun sulandırmalarla ortalama $35 \pm 10\text{ng/l}$ olması sağlandı. Konsantrasyonları eşitlenen genomik DNA örnekleri PZR için kullanılincaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.5. *Ehrlichia/Anaplasma* Soylarının 16S rRNA gen Ortak Bölgesi PZR amplifikasyonu

Örnekleme alınan kenelerde *Ehrlichia/Anaplasma* soylarının ortak gen varlığını araştırmak amacıyla 16S rRNA geninin tüm türlerde ortak korunmuş bölgesinin ileri (EHR16SD) ve geri (EHR16SR) primerleri (Tablo:3.5.) kullanılarak PZR yapıldı. Çalışmaya dahil edilen 1497 adet kene, tür, cinsiyet lokasyon ve tarihlere göre yapılan sınıflandırmaya göre 210 havuz/grup da Nested PZR çalışması yapıldı. Her grup PZR çalışmasında, uygulamanın doğruluğu ve validasyonu (geçerliliğini) sağlamak için bir pozitif kontrol örneği ve bir negatif kontrol ile çalışma yapıldı. Pozitif kontrol örneği olarak GenBank: MT498088.1 nolu çalışmanın genomik DNA'sı kullanıldı. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT498088.1>, Negatif kontrol olarak ise steril deiyonize su kullanıldı.

Tablo 3.5. *Ehrlichia/Anaplasma* soylarının 16S rRNA gen bölgesine ait primerler

Sekans	Uzunluk	Bağlanma ısısı	Kaynak
EHR16SD 5'-GGT-ACC-YAC-AGA-AGA-AGT-CC-3'	345 bp	55°C	[102]
EHR16SR 5'-TAG-CAC-TCA-TCG-TTT-ACA-GC-3			

3.5.1. PZR Karışımı Hazırlanması

PZR amplifikasyonu için her bir ependorf tüpüne 5µl hedef DNA ve 45µl master miks eklenerek her bir örnek için 50µl reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışımda 100µM (4µl) dNTP (Deoksinükleosid trifosfat: (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 12,5pmol ileri ve geri yönlü primerler (100 pmol/µl) her bir primerden (2,5 µl), 0,75 U TaqDNA polimeraz (Thermo Fisher), 1.6mM MgCl₂ (5 µl) (Thermo Fisher), 5µl 10 x PCR buffer (100 mM Tris-HCL, pH 9,0 (25 °C); 15mM MgCl₂; 500mM KCl; %0,1 gelatin; %1'lik Triton X-100) (Thermo Fisher), 25,75µl double distile su (Merck) kullanıldı.

3.5.2. *Ehrlichia/Anaplasma* Soylarının Ortak Gen Bölgesinden PZR Protokolü

PZR reaksiyon; otomatik ısı döngü cihazında (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler) gerçekleştirildi. PZR protokolü; başlangıç denatürasyon işlemi 95°C'de 5 dk. 1 defa yapıldıktan sonra; 95°C'de 30 sn. denaturasyon, 55°C'de 30 sn. primer bağlanması (annealing) ve 72°C'de 60 sn. uzama (ekstensiyon) aşamalarından oluşan 35 döngü devam ettirildi. PZR işlemi bittiğinde bir kez daha 72°C'de 5 dk. uzama basamağında tutulmuştur. PZR ürünleri ısı döngü cihazından çıkarılıncaya kadar +4°C'de beklemeye alınmıştır. PZR çalışması tamamlanan örneklerden elde edilen ampliconlar ethidium bromid içeren %1,5'lik agaroz jele yüklenerek elektroforezde yürütüldü. Ampliconların yürütüldüğü agaroz jel ultraviyole ışıkta incelendi.

3.6. Nested PZR Çalışması

Çalışmamızda *A. phagocytophilum* 16S rRNA geninin MSP2/p44 proteinini kodlayan gen bölgesininin 1462 bp lik kısmı çoğaltan EC9 ve EC12a primerleri ile PZR yapıldı, dış primerlerle pozitif bulunan örneklerden elde edilen ampliconlar kullanılarak, SSAP2f ve SSAP2r primerlerle yaklaşık 641 bp lik bölgenin nested PZR amplifikasyonu yapıldı.

3.6.1. Dış Primerlerle PZR Uygulama

Çalışmamıza dahil edilen 1497 adet kene örneğinden oluşturulan 210 kene havuzundan elde edilen genomik DNA ekstraktları kullanılarak *Anaplasma /Ehrlichia* 16S rRNA geninin ortak 1462 bp'lik bölgesini amplifiye eden primerler (Tablo:3.6) kullanılarak nested PZR uygulamasının

ilk basamağı gerçekleştirildi. Her parti PZR uygulamasında doğruluk ve geçerlilik denetimi için bir pozitif kontrol örneği ve bir negatif kontrol ile çalışma yapıldı. Pozitif kontrol örneği olarak GenBank: MT498088.1 nolu çalışmanın genomik DNA'ları kullanıldı. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MT498088.1>), Negatif kontrol olarak ise steril deiyonize su kullanıldı.

Tablo 3.6. *A. phagocytophilum*'un 16S rRNA gen bölgesine spesifik Nested PZR primerleri

Primer Adı		Dizilim (5'---3')	Sekans (bp)	Kaynak
<i>Ehrlichia/Anaplasma</i> ortak soy primer	EC9	TACCTTGTTACGACTT	1462	[103].
	EC12A	TGATCCTGGCTCAGAACGAACG		
<i>A. phagocytophilum</i> primer	SSAP2f	GCTGAATGTGGGGATAATTTAT	641	
	SSAP2r	ATGGCTGCTTCCTTTCGGTTA		

PZR için 50µl final hacimde reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışımında 5 µl 10XPCR buffer, 5 mM MgCl₂ (5µl), 1 µM primer F (2,5µl), 1µM primer R (2,5µl), 0,5mM her bir dNTP, 1,25U Taq DNA polimerase ve 50ng/µl hedef DNA (Örnek DNA'sı) (5µl) eklenerek hazırlandı.

İlk PZR ısı döngü protokolü;

İlk denaturasyon; 94°C'de 5 dk, (1 döngü.)

Denatürasyon: 94°C'de 30 sn, Bağlanma: 55°C'de 30sn, Uzama: 72°C'de 60 sn (35 döngü),

Uzama: 72°C'de 5dk (1 döngü)

3.6.2. İç Primerlerle (Nested) PZR

İç primer setiyle (SSAP2f, SSAP2r) oluşturulan reaksiyon karışımında ilk PZR'dan elde edilen DNA ampliconları hedef (Template) DNA olarak kullanıldı. Yuvalanmış PZR çalışmasında 641bp hedef bölgenin amplifikasyonu gerçekleştirildi. PZR için 50µl final hacimde reaksiyon karışımı hazırlandı.

PZR Karışımı; 5µl 10XPCR buffer, 5mM MgCl₂ (5µl), 1 µM primer F (2,5µl), 1µM primer R (2,5µl), 0,5 mM dNTP, 1,25U Taq DNA polimeraz ve 50ng/µl ilk PZR uygulamasında elde edilen DNA (5µl) eklenerek hazırlandı.

Nested PZR ısı döngü protokolü; İlk denaturasyon 94°C'de 5 dk bir defa gerçekleştirildi. Denatürasyon: 94°C'de 30 sn, bağlanma (annealing) 55°C'de 30 sn, Uzama (ektensiyon) : 72°C'de

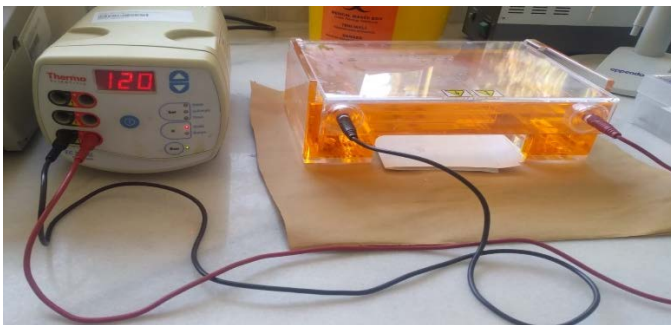
1dk uygulanan ısı çevirimi, 35 döngü çalıştırdıktan sonra 72°C'de 5dk uzama basamağı uygulandı. PZR işlemi tamamlanan örnekler +4°C'de beklemeye alındı. PZR analizlerinin geçerliliğinin sağlanması ve kontaminasyon kontrolü olup olmadığının test edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol örneğine ait genomik DNA'lar ve negatif kontrol olarak sterilize edilmiş deiyonize su kullanıldı. PZR reaksiyonu Applied biosystem 2720 Thermal Cyler cihazında gerçekleştirildi.

3.7. Elektroforez Uygulaması

PZR Amplifikasyonda elde edilen ürünlerin görüntülenmesi amacıyla yatay elektroforez tankı kullanılmıştır. Konsantre 5XTBE buffer (Tris Boric acid EDTA, Fermentas) solüsyonundan 200 ml alınıp, üzerine 800 ml deiyonize su konularak 1 lt toplam hacimde 1XTBE solüsyonu elde edilerek, elektroforez tankına dolduruldu.

Agaroz jel Hazırlama: DNA ürünlerinin görüntülenmesi için %1,5'lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için 100 ml'lik bir erlen içerisinde 0,75 mg agaroz tartılarak üzerine 50 ml 1XTBE ilave edildi. Hazırlanan karışım ısıtılarak agarozun tamamen erimesi sağlandı. Agaroz iyice eridiğinde soğumaya alındı, buharlaşma bittikten sonra 3 µl ethidium bromide (10mg/ml) eklenerek, yavaşça karıştırılıp homojenize edildi. Hazır hale gelen sıvı agaroz solüsyonu jel kalıbına dökülerek örnek sayısına göre taraklar yerleştirildi. Sıvı haldeki Jel tamamen soğuyup katılaştığında jel kalıbı ile birlikte elektroforez tankına (Şekil 3.4.) yerleştirildi.

PZR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi; PZR ile elde edilen ampikonların her birinden 10µl alınıp, 5µl 6X loading dye (Thermo Scientific) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. İlk kuyucuklara ampikon bantlarının boylarının ölçülmesinde kullanılan DNA ladder (Gene ruler 100bp Plus, Thermo Scientific 100- 1500bp arasında), ikinci kuyucuğa pozitif kontrol, 3. kuyucuğa negatif kontrol, sonraki kuyucuklara ise çalışma örnekleri konuldu. Cihaz 30 dk çalıştırılarak, ampikon DNA'ları negatif elektrik akımı ile pozitif akım yönüne doğru yürütüldü.



Şekil 3.4. Elektroforez cihazı ve tankı

3.8. UV Görüntüleme

Agaroz jelde yürütülen DNA fragmantları Ethidium bromid (10mg/ml) ile görünür hale getirilerek Biostep UV transilluminator UXT-20M-15K (www.biostep.de) cihazında (Şekil 3.5.) 312nm dalga boyunda ultraviyole ışığı altında görüntülendi.



Şekil 3.5. UV görüntüleme cihazı

3.9. Msp2 Gen Bölgesi için Real Time PZR Uygulaması

Kene örneklerinden elde edilen genomik DNA'larda *A. phagocytophilum* için *msp-2* gen bölgesini hedef alan Taq Man prob ile Real time PZR uygulaması yapıldı. *Msp-2* gen bölgesinin çoğaltılması için ApMSPF (5'-ATGGAAGGTAGTGGTTATGGTATT-3') ve ApMSP2r (5'-TTGGTCTTGAAGCGCTCGTA-3') primerleri, ile ApMSP2p-HEX (5'-TGG TGC CAG GGT TGA GCT TGA GAT TG-3') probu kullanıldı [104]. Gerçek zamanlı PZR reaksiyon karışımı için; 50ng genomik DNA, 20µM ApMSP2 F ve ApMSP2r primerleri, 5µM ApMSP2p-HEX prob, 5 mM MgCl₂ kullanıldı. Steril PZR grade deiyonize su ile toplam hacim 25µl'ye tamamlandı. Gerçek zamanlı PZR analizleri Light Cyler 480 Instrument II (Seri No:27223 Roche Diagnostics Corporation, USA) cihazında gerçekleştirildi. Kullanılan ısı protokolü aşağıda bildirildi.

95 °C 'de 5 dk	1 döngü
95 °C'de 15 sn	} 35 döngü
60 °C'de 30 sn	
72°C'de 30 sn	

Real Time PZR uygulamasının doğruluk (accuracy) ve geçerlilik (validasyonu) kontrolü için pozitif kontrol örneği ve negatif kontrol ile çalışma yapıldı. Gen-Bank'a kayıtlı (GenBank: MT498088.1 nolu) bir izolatın genomik DNA'sı pozitif kontrol örneği olarak kullanıldı. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT498088.1>) Negatif kontrol olarak ise steril deiyonize su kullanılmıştır.

3.10. Agaroz Jel'den DNA Purifikasyonu ve Dizileme Çalışması

Anaplasma phagocytophilum spesifik SSAP2f ve SSAP2r primerleri ile gerçekleştirilen nested PZR amplifikasyonu sonucu yaklaşık 641bç büyüklükteki ampliconlardan genetik karakterizasyon çalışması yapıldı. Nested PZR uygulamasından elde edilen ampliconlar agaroz jel üzerinden kesilerek eppendorf tüplere alındı. Eppendorf tüplerde agaroz jel içerisinde bulunan DNA parçaları, Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, WI, USA.) kiti üreticinin talimatına göre kullanılarak purifiye edildi. Sanger sekans dizileme için purifiye DNA ampliconları özel firmaya (Kurul Lab Ltd.Şti.) gönderildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Bölgesinden Toplanan Kene Türleri ve Dağılımı

Mersin ili'nin; Erdemli, Tarsus ve Silifke ilçelerinde altı mahallede sahadan ve konaktan toplanan 1497 adet ergin ixodid kene, çalışmanın örneklemini oluşturmaktadır. Stereo mikroskopta yapılan morfolojik identifikasyon çalışmasında 4 soy içerisinde 11 ayrı tür tespit edildi. Tüm odaklardan 1 Nisan 2020 ile 30 Kasım 2020 tarihleri arasında her odaya ayda en az bir defa olmak üzere her ay yapılan ziyaretlerde toplanan kenelerin tür dağılımı;

Rhipicephalus soyundan 614 adet ergin kene tanımlandı. *Rhipicephalus sanguineus* ergin 253 adet, *Rhipicephalus bursa* ergin 238 adet ve *Rhipicephalus turanicus* türü ergin 88 adet kene tanımlandı.

Hyalomma soyundan; *Hyalomma excavatum* ergin 581 adet, *Hyalomma marginatum* ergin 140 adet, *Hyalomma anatolicum* ergin 16 adet, *Hyalomma impeltatum* ergin 6 adet, *Hyalomma detritum* supense ergin 2 adet kene identifikasyonu gerçekleştirildi.

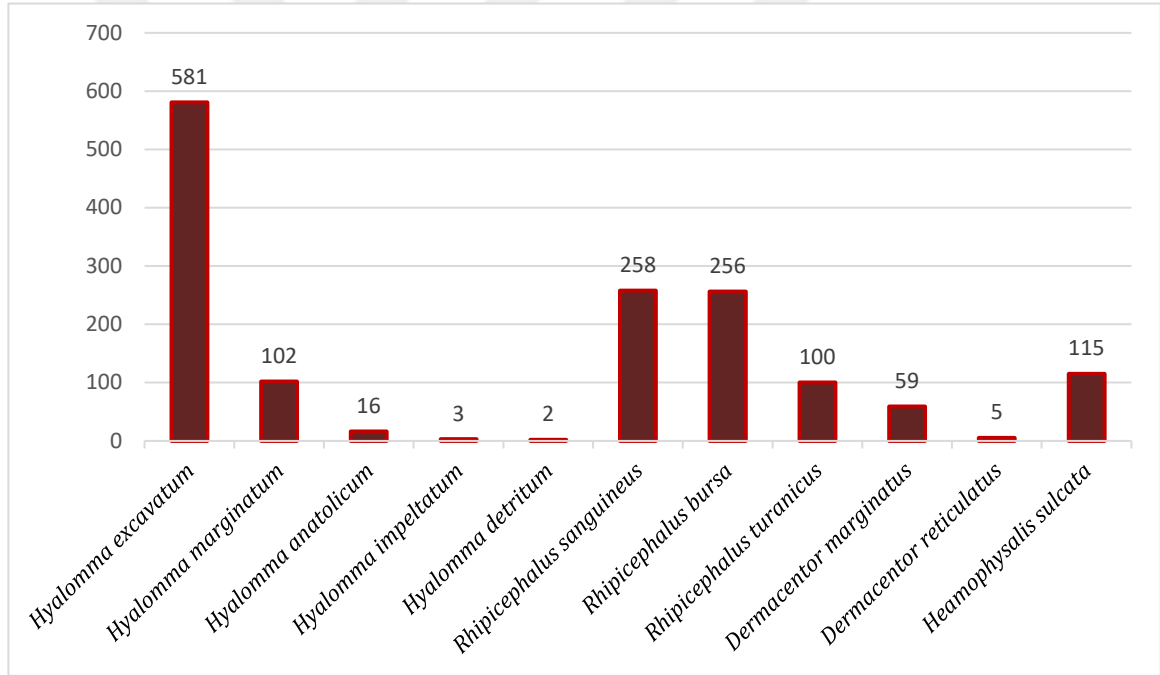
Dermacentor soyundan; *Dermacentor marginatus* türü ergin 44 adet ve *Dermacentor reticulatus* türü ergin 5 adet kene tanımlandı.

Heamophysalis soyundan; *Heamophysalis sulcata* türü ergin 115 adet kene, identifikasyonu gerçekleştirildi. Çalışma bölgemizdeki tüm odaklardan toplanarak örnekleme dahil edilen kene tür dağılımı Tablo 4.1.'de ve Şekil 4.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.1. Örnekleme'deki Kenelerin Tür Dağılımı

Kene türü	Tarsus/ Çiçekli Mah. Çağbaşı Mah.	Erdemli/ Esenpınar Mah. Silifke/ SömekMah.	Silifke/ Kırobası Mh. Özboynuinceli Mah.	Tür Toplamları
-----------	---	--	---	-------------------

<i>Hyalomma excavatum</i>	544	23	14	581
<i>Hyalomma marginatum</i>	22	28	52	102
<i>Hyalomma anatolicum</i>	16			16
<i>Hyalomma impeltatum</i>	1		2	3
<i>Hyalomma detritum</i>	2			2
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	145	60	53	258
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	58		42	100
<i>Rhipicephalus bursa</i>	7	141	108	256
<i>Dermacentor marginatus</i>		1	58	59
<i>Dermacentor reticulatus</i>			5	5
<i>Haemophysalis sulcata</i>			115	115
Toplam	795	253	449	1497



Şekil 4.1. Örneklemedeki kenelerin tür dağılım grafiği

Çalışma odaklarından toplanan kenelerin (soy, tür, cinsiyet) dağılımı Tablo: 4.2.'de gösterildi. Çalışmamızda tanımlanan kene türlerinin fotoğrafları Şekil:4.1'de gösterildi.

Tablo 4.2. Çalışma odaklarına göre kenelerin (soy, tür, cinsiyet) dağılımı.

	Kene Tür Adı	Dişi	Erkek	Tür Toplamı	Soy Toplamı
Tarsus (Çiçekli Mh.,	<i>Hyalomma excavatum</i>	155	389	544	585
	<i>Hyalomma marginatum</i>	17	5	22	

Çağbaşı Mh,)	<i>Hyalomma anatolicum</i>	13	3	16	
	<i>Hyalomma detritum supense</i>		2	2	
	<i>Hyalomma impeltatum</i>	1		1	
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	73	72	145	
	<i>Rhipicephalus turanicus</i>	21	37	58	210
	<i>Rhipicephalus bursa</i>	6	1	7	
(Erdemli/Esenpınar, Silifke/Sömek)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	47	13	60	201
	<i>Rhipicephalus bursa</i>	59	82	141	
	<i>Hyalomma marginatum</i>	10	18	28	51
	<i>Hyalomma excavatum</i>	14	9	23	
(Silifke/Kırobaşı, Özboynuinceli)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	32	21	53	203
	<i>Rhipicephalus turanicus</i>	15	27	42	
	<i>Rhipicephalus bursa</i>	65	43	108	
	<i>Hyalomma marginatum</i>	21	31	52	
	<i>Hyalomma excavatum</i>	10	4	14	68
	<i>Hyalomma impeltatum</i>	1	1	2	
	<i>Heamophysalis sulcata</i>	106	9	115	115
	<i>Dermacentor marginatus</i>	27	32	59	64
<i>Dermacentor reticulatus</i>		5	5		

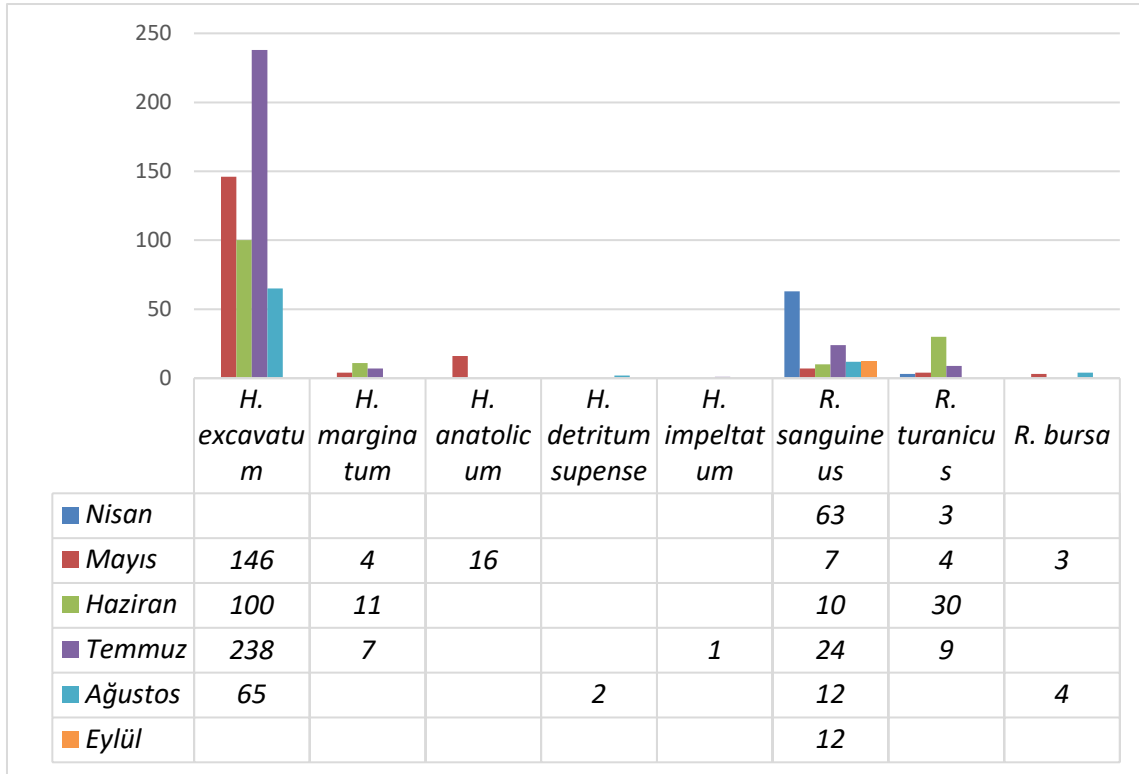
4.2. Tarsus (Çiçekli-Çağbaşı) Bölgesinden Toplanan Kene Örnekleri

Tarsus (Çiçekli-Çağbaşı) Bölgesi'ne kenelerin aktif olduğu 1 Nisan 2020 ile 30 Kasım 2020 tarihleri arasında aylık düzenli ziyaretler yapılarak iki soya ait 8 türden 797 adet kene tespit edildi.

Hyalomma soyuna ait 5 türden 590 adet kenenin Tür dağılımı; *Hyalomma excavatum* türünden 549 adet, *Hyalomma marginatum* 22 adet, *Hyalomma anatolicum* 16, *Hyalomma detritum supense* 2 adet, *Hyalomma impeltatum* türünden 1 adet olarak gerçekleşti.

Rhipicephalus soyuna ait üç türden 181 adet kene toplandı. *Rhipicephalus sanguineus* türünden 128 adet, *Rhipicephalus turanicus* türü 46 adet, *Rhipicephalus bursa* türünden 7 adet identifikasyon gerçekleştirildi.

Tarsus (Çiçekli-Çağbaşı) bölgesinden toplanan kene örneklerinin aylara göre kene tür dağılımı grafiği Şekil 4.2. 'de gösterildi.



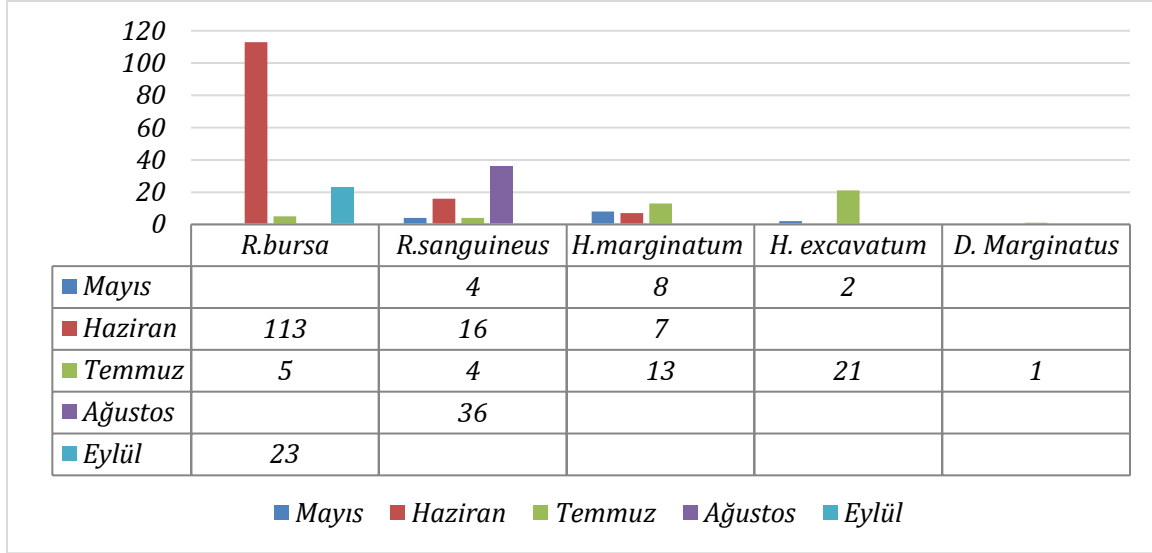
Şekil 4.2. Tarsus (Çiçekli-Çağbaşı) bölgesinden toplanan kenelerin yıl içi dağılımı.

4.3. Esenpınar – Sömek bölgesinden toplanan kenelerin dağılımı

Esenpınar – Sömek bölgesinden 1 Nisan 2020 ile 30 Kasım 2020 tarihleri arasında her ay yapılan ziyaretlerde Ixodida familyasından üç soya ait 5 türden toplam 252 adet kene toplandı.

Rhipicephalus soyuna ait 201 adet keneni; *Rhipicephalus bursa* türünden 141 adet, *Rhipicephalus sanguineus* türünden 60 adet olarak identifikasyonu yapıldı.

Hyalomma soyundan 51 kene tespit edilerek tür dağılımı; 28'si *Hyalomma marginatum*, 23'ü *Hyalomma excavatum* olarak identifikasyon gerçekleştirildi. *Dermaacentor marginatus* 1 adet ergin kene tespit edildi. Esenpınar – Sömek bölgesinden toplanan kenelerin aylık tür dağılım grafiği Şekil 4.3.'te gösterildi.



Şekil 4.3. Esenpınar – Sömek bölgesinden toplanan kenelerin yıl içi dağılımı

4.4. Kırobası- Özboynuinceli bölgesinden toplanan kenelerin dağılımı

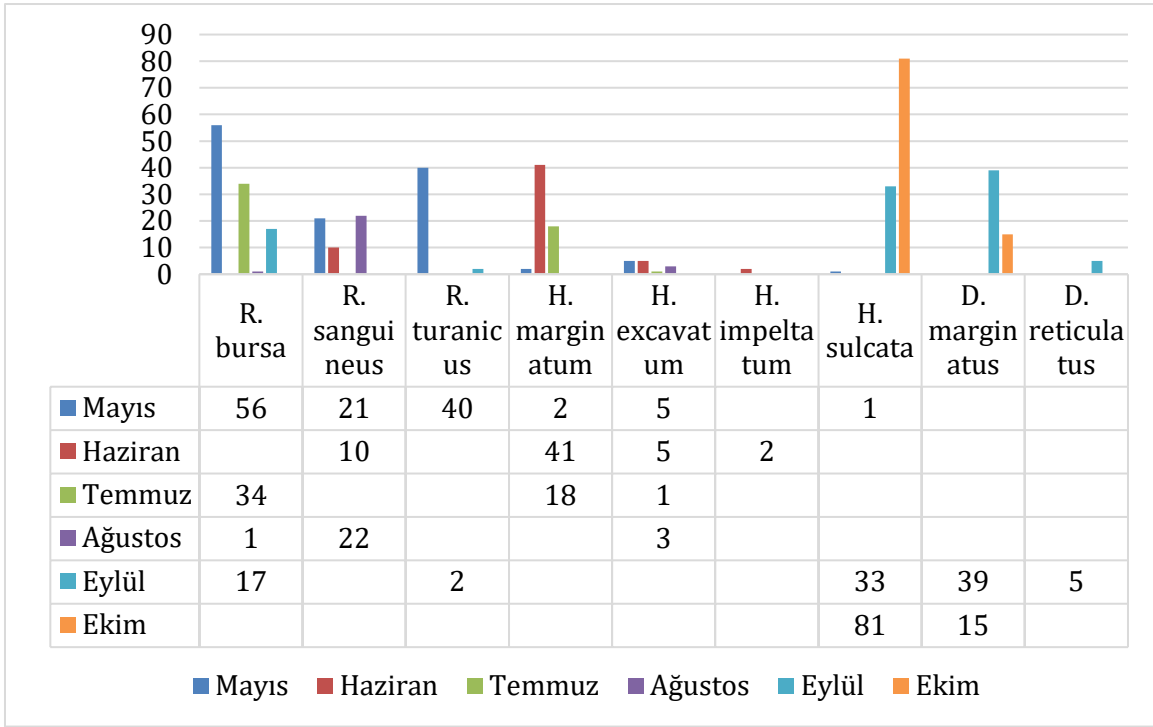
Kırobası -Özboynuinceli bölgesine 1Nisan 2020 ile 30 Kasım 2020 tarihleri arasında her ay yapılan ziyaretlerde 445 adet Ixodid kene toplandı. Keneler 4 soydan 9 tür içerisinde tanımlandı.

Rhipicephalus soyuna ait 193 adet kene tanımlanarak; *Rhipicephalus bursa* türünden 108 adet, *Rhipicephalus sanguineus* türü 53 adet, *Rhipicephalus turanicus* türünden 42 adet kene identifikasyonu yapılmıştır.

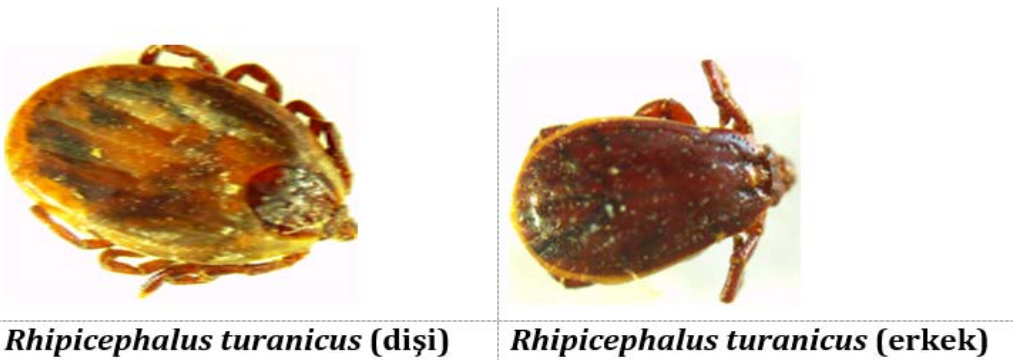
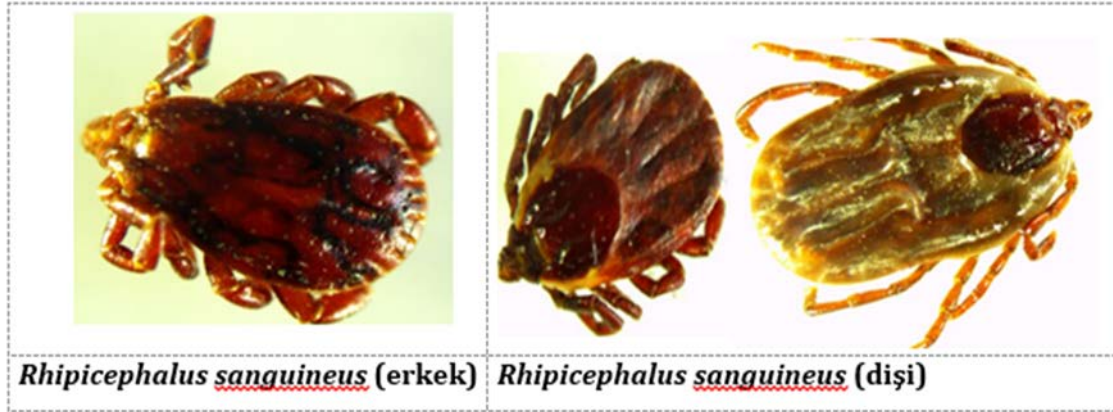
Hyalomma soyunda bulunan 3 türden 63 adet kene toplanarak; *Hyalomma marginatum* türü 61 adet, *Hyalomma excavatum* türü 14 adet, *Hyalomma impeltatum* türü 2 adet tanımlama yapıldı.

Heamophysalis sulcata türünden 115 adet kene tanımlandı.

Dermacentor marginatus türünden 54 adet ve *Dermacentor reticulatus* türünden ise 5 adet identifikasyon gerçekleştirildi. Kırobası- Özboynuinceli bölgesinden toplanan kenelerin aylara göre dağılımı Tablo 4.4 .'te gösterildi.



Şekil 4.4. Kırobası- Özboynuinceli bölgesinden toplanan kenelerin yıl içi dağılımı





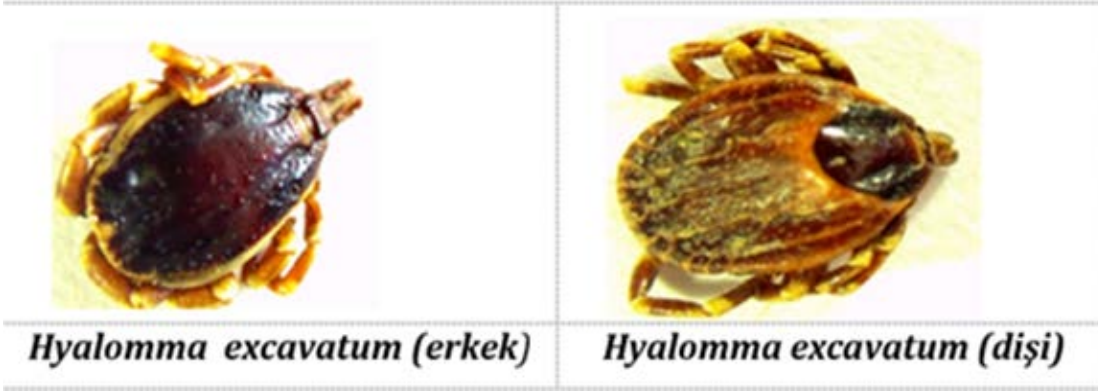
Rhipicephalus bursa Ergin (dişi)

Rhipicephalus bursa Ergin (Erkek)



Hyalomma marginatum (dişi)

Hyalomma marginatum (erkek)

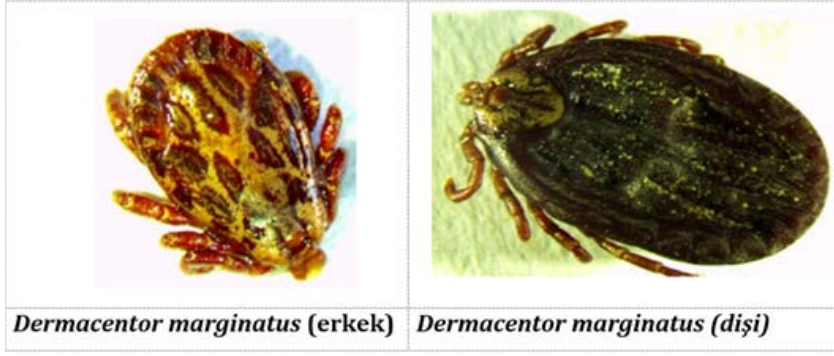


Hyalomma excavatum (erkek)

Hyalomma excavatum (dişi)



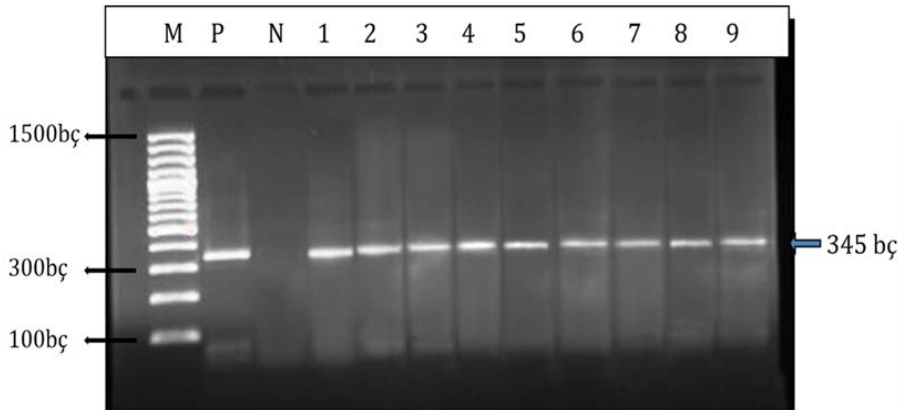
Haemophysalis sulcata (dişi)



Şekil 4.5. Kene tür ve cinsiyetleri resimler (Çalışmamızdan orijinal fotoğraflar)

4.5. Anaplasma ve Ehrlichia soylarının 16S rRNA geninin ortak bölgesi EHR primer setiyle PZR Çalışması Sonuçları.

Örnekleme alınan 1497 adet kene, PZR uygulamasına başlamadan önce; tür, cinsiyet lokasyon ve toplama tarihlerine göre sınıflandırılarak 210 çalışma havuzu oluşturuldu. Kene havuzlarından yapılan DNA ekstraksiyonu sonucu elde edilen genomik DNA'lar kullanılarak *Ehrlichia/Anaplasma* Soylarının ortak 16S rRNA geninin 345 bp lik kısmını çoğaltan EHR16SD ve EHR16SR primerlerle daha önce tarif edildiği şekilde konvansiyonel PZR uygulaması yapıldı. *Rhipicephalus* ve *Hyalomma* soylarına ait kenelerden oluşturulan havuzlarda pozitiflik tespit edildi. Parsiyel 16SrRNA gen bölgesinin PZR ile amplifikasyonu sonucu elde edilen amplikonların %1,5'lik agaroz jel görüntüleri Şekil 4.6.'de gösterilmiştir.



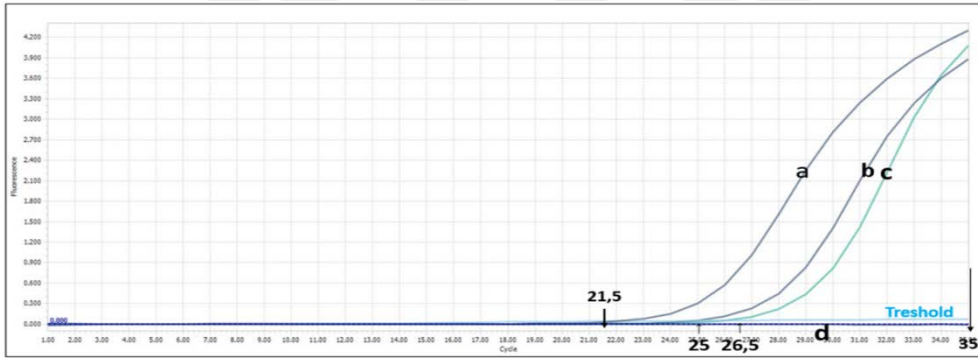
Şekil: 4.6. Anaplasma ve Ehrlichia soylarının ortak gen bölgesi soy PZR sonuçları

(M: DNA Ladder (100-1500bp); P: Pozitif Kontrol, N: negatif kontrol, 1,2,3,4,5,6,7,8,9 nolu örnekler *Anaplasma-Ehrlichia* soylarına ait pozitif amplikonlar)

4.6. A. phagocytophilum Msp2 Gen Bölgesinin Rt-PZR Çalışma Sonuçları

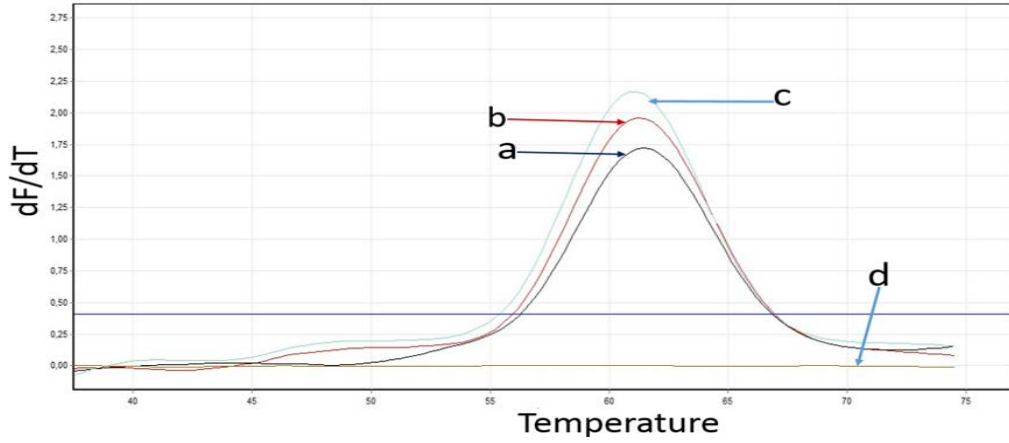
Örnekleme dahil edilen 1497 adet ergin ixodid kene, 210 havuza bölümlendirildi. Kene havuzlarından elde edilen genomik DNA'ların tamamına *A. phagocytophilum* DNA'sı araştırmak için, Msp-2 gen bölgesini hedef alan TaqMan prob tabanlı Rt-PZR uygulaması yapıldı. Örnek havuzlarımızın 2'sinde %0,95 (2/210) *A. phagocytophilum* DNA'sı pozitifliği belirlenmiştir. Pozitif bulunan örneklerden birisi dişi *Rh. sanguineus* havuzunda, diğer pozitif örneğimizde ise *H. excavatum* türü dişi ergin keneler bulunmaktaydı.

A. phagocytophilum DNA'sı pozitif bulunan *H. excavatum* türü 6 adet dişi ergin kenenin olduğu havuzda (1-807 kod numaralı), Rt-PZR sonucu döngü cycle-treshold Ct değeri 25. olarak tespit edilmiştir. Pozitiflik tespit edilen 1-827 kod numaralı kene havuzumuz *Rh. sanguineus* türü 6 adet ergin doymuş keneden oluşmaktaydı, Ct (dR) değeri 26,5 olarak bulunmuştur. Pozitif kontrol örneğimizin Ct değeri 21,5 olarak gözlemlenmiştir. Real time PZR uygulaması floresan ışına grafiği Şekil 4.7.'de gösterildi. Yüksek çözünürlüklü erime (High Resolution Melting, HRM) analiz (dF/dT) grafiği Şekil 4.8. de bildirildi.



Şekil 4.7. *A. phagocytophilum* Msp2 geni Real Time PZR (Rt-PZR) sonuçları

Kene havuzlarından *A. phagocytophilum* Msp2 gen bölgesinin TaqMan prob tabanlı Real Time PZR analiz sonuçları, **a**: Pozitif kontrol örneği, **b** ve **c**: Pozitif örnekler, **d**: Negatif kontrol



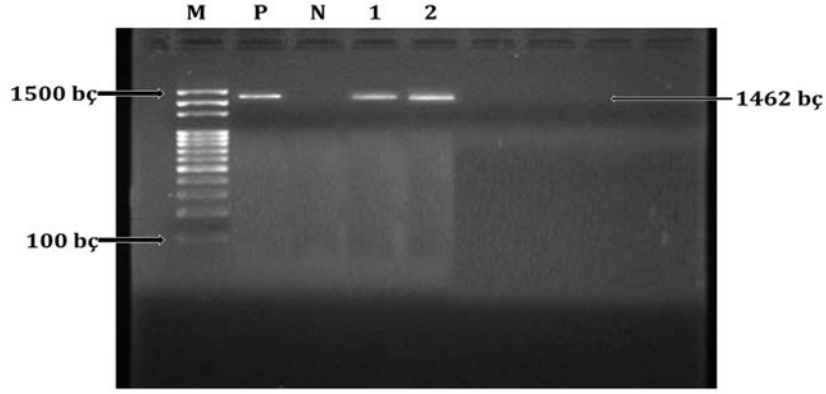
Şekil 4.8. *A. phagocytophilum* Rt-PZR erime eğrisi (Melting curve) grafiği

(Rt-PZR, amplikonlarının melting (erime) eğrisi, erime sıcaklığına karşı negatif türev eğrisi (dF/dT) **a**: Pozitif kontrol örneği, **b** ve **c**: Pozitif örnekler, **d**: Negatif kontrol.)

4.7. Nested PZR Çalışması Sonuçları

4.7.1. *Anaplasma* / *Ehrlichia* 16S rRNA ortak bölgesi (EC primer setiyle) PZR sonuçları

Çalışmamıza dahil edilen 1497 adet kene örneğinden oluşturulan 210 kene havuzunun genomik DNA ekstraktları kullanılarak *Anaplasma* /*Ehrlichia* soylarının 16S rRNA gen bölgesinin 1462 bç'lik ortak alanını hedefleyen PZR uygulaması yapıldı. Çalışmamıza dahil edilen tüm kene havuzlarında yapılan PZR uygulamasında çalışma sahamızda Tarsus (Çağbaşı-Çiçekli) bölgesinde Temmuz 2020'de toplanan örnekler arasında iki ayrı cins kene grubunda *Anaplasma* /*Ehrlichia* soy DNA pozitiflik tespit edildi. *Anaplasma* /*Ehrlichia* soy DNA pozitif bulunan havuzlardan birisi *R. sanguineus* türü 6 adet dişi ergin kenelerden oluşmaktaydı. Diğer DNA pozitif bulunan kene havuzunda ise *H. excavatum* türü 8 dişi ergin kene bulunmaktaydı. *Anaplasma* /*Ehrlichia* soy PZR uygulamasına ait sonuçlar Şekil: 4.9.'da gösterilmiştir.

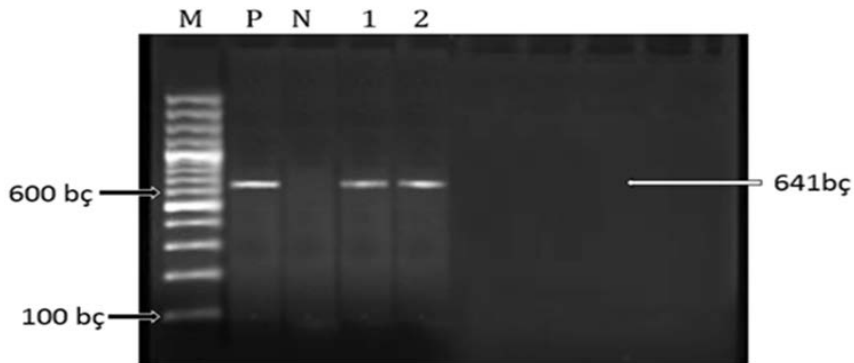


Şekil 4.9. *Anaplasma / Ehrlichia* 16S rRNA ortak gen bölgesi EC primer setiyle PZR sonuçları

(*Anaplasma / Ehrlichia* 16S rRNA ortak gen bölgesi PZR amplikonlarının elektroforez işlemi sonrası Agaroz jel'in UV görüntüsü. M: DNA Ladder (100-1500) baz çifti, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol örneği, **1**: *R. sanguineus* 6 adet dişi ergin kene havuzu (1-807 (6 ♀) kod nolu havuz) **2**: *H. excavatum* türü 8 dişi ergin kene havuzu (1-827 (8 ♀) kod nolu havuz)

4.7.2. *A. phagocytophilum* Nested PZR Çalışması Sonuçları

Anaplasma / Ehrlichia 16S rRNA ortak gen bölgesi EC primer setiyle gerçekleştirilen PZR 1462 bp amplikonlar kullanılarak, *A. phagocytophilum* spesifik SSAP2f ve SSAP2r primer setiyle Nested PZR uygulaması yapıldı. *A. phagocytophilum* DNA'sı pozitif bulunan kene havuzlarının yaklaşık 641 bp büyüklüğündeki amplikonların agaroz jel elektroforez uygulaması görüntüleri Şekil 4.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. *Anaplasma phagocytophilum*'un Nested PZR sonuçları

(M: DNA Ladder (100-1500 baz çifti), P: pozitif kontrol, N: negatif kontrol, 1: *R. sanguineus* 6 adet dişi ergin kene havuzu (1-807 (6 ♀) kod nolu havuz) 2: *H. excavatum* türü 8 adet ergin dişi kene havuzu (1-827 (8 ♀) kod nolu havuz)

4.8. *A. phagocytophilum* DNA'sı Pozitif Bulunan Odak ve Kene Bilgileri

Tarsus İlçesi'ne bağlı Çağbaşı ve Çiçekli mahallelerinden Temmuz 2020'de toplanan kenelerden oluşturulan kene havuzları arasında, iki ayrı soydan kene havuzunda PZR çalışmaları sonucunda *A. phagocytophilum* DNA'sı tespit edildi. *A. phagocytophilum* DNA'sı pozitif bulunan kene havuzlarının birisinde 8 adet dişi *Rhipicephalus sanguineus* türü doymuş ergin kenelerden oluşmaktaydı, diğer DNA pozitif havuz ise 6 adet dişi *Hyalomma excavatum* türü doymuş ergin kenelerdendi.



Şekil 4.11. *A. phagocytophilum* pozitiflik tespit edilen lokasyonlar; (Çiçekli Mahallesi (36° 53'26" N 35°06'21"E 6m), ve Çağbaşı Mahallesi(36°51'45" N 35°03'41" E 5m)

4.9. İstatistik Analiz

Örneklerden elde edilen havuzlardaki pozitif ve negatiflik durumları bölge, cinsiyet, kene türü, örneklenme ayına göre çapraz tablolar kullanılarak incelendi. Değerler açısından sıklıklar arasında fark olup olmadığını değerlendirmek için Fisher'in Exact Test yöntemi uygulandı. İstatistiksel analizler için SPSS 21 programı kullanıldı ve önem düzeyi $p < 0,05$ olarak belirlendi. Fisher'in Exact Testi'ne göre Kene toplama bölgeleri, cinsiyet, kene türü ve yıl içerisinde pozitiflik dağılımı Tablo 4.3.'te verilmiştir.

Tablo 4.3. İstatistik analiz tablosu (Bölge, Tür, Cinsiyet, Yıl içi dağılım)

		Sonuç				Fisher'in Exact Testi
		Negatif		Pozitif		
		Havuz sayısı	Negatif bulunan %	Havuz sayısı	Oran %	
Bölge	BÖLGE I	99	98,00%	2	2,00%	P=0,67
	Bölge II	37	100,00%	0	0,00%	
	BÖLGE III	71	100,00%	0	0,00%	
Cinsiyet	Dişi	121	98,40%	2	1,60%	P=0,51
	Erkek	86	100,00%	0	0,00%	
Tür	<i>Dermacentor marginatus</i>	7	100,00%	0	0,00%	P=1
	<i>Dermacentor reticulatus</i>	1	100,00%	0	0,00%	
	<i>Haemophysalis sulcata</i>	18	100,00%	0	0,00%	
	<i>Hyalomma anatolicum</i>	3	100,00%	0	0,00%	
	<i>Hyalomma excavatum</i>	71	98,50%	1	1,40%	
	<i>Hyalomma impeltatum</i>	3	100,00%	0	0,00%	
	<i>Hyalomma marginatum</i>	18	100,00%	0	0,00%	
	<i>Rhipicephalus bursa</i>	36	100,00%	0	0,00%	
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	36	97,30%	1	2,70%	
	<i>Rhipicephalus turani</i>	14	100,00%	0	0,00%	
Ay	Nisan	10	100,00%	0	0,00%	P= 0,60
	Mayıs	54	100,00%	0	0,00%	
	Haziran	45	100,00%	0	0,00%	
	Temmuz	45	95,70%	2	4,30%	
	Ağustos	20	100,00%	0	0,00%	
	Eylül	19	100,00%	0	0,00%	
	Ekim	14	100,00%	0	0,00%	

Nested PZR ve Real Time PZR uygulamalarımızda her iki yöntemle de aynı havuzlardan (2/210) *A. phagocytophilum* DNA'sı tespit edilmiş, Cohen'in Kappa Testine göre kappa sayısı 1,0 ($\kappa=+1$) olarak bulunmuş ve iki test sonucu birbiri içinde uyumlu ($p<0,001$) bulunmuştur.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsan Granulositik Anaplasmosis (HGA), kuzey yarım kürede daha fazla olmak üzere tüm dünyaya yayılma eğiliminde olan *Anaplasma phagocytophilum*'un neden olduğu, kene kaynaklı enfeksiyöz bir hastalıktır. İnsanlarda nötrofil ve eozinofillere tropizm gösteren, nötropeni ile doğal ve kazanılmış bağışıklığı inhibe edebilen, immun yetmezlikleri olan hastalarda ölümlere neden olabilen klinik hastalık tabloları oluşturabilmektedir [1]. *A. phagocytophilum* 1940 larda

sığırlarda TBF etkeni olarak keşfedilmiş, 1994 yılında ABD de insan enfeksiyonları tanımlanmıştır [2]. Hastalık 40-60 yaş erkeklerde daha fazla olmak üzere, her yaşta görülebilir [6]. HGA etkeni insanlara, evcil ve yabani hayvanlara Ixodidae ailesindeki kenelerle nakledilmektedir [31]. Vektör kenelerle transtadial nakil yapılmaktadır, transovarial nakil sadece *Dermacentor albipictus*'ta bildirilmiştir [33]. Keneler, insanlarda ve hayvanlarda görülen ve zoonotik öneme sahip birçok paraziter, bakteriyel ve viral patojenlerin en önemli vektörlerindedir [30]. Son yıllarda düzensiz göçler, insan ve hayvan hareketlerindeki artış, sosyo ekonomik ve çevresel değişiklikler ile özellikle küresel ısı artışı, çeşitli kene türlerinin yeni coğrafik alanlara yayılmasını kolaylaştırmış ve kene kaynaklı yeni enfeksiyonların ortaya çıkma riskini arttırarak global bir tehdit oluşturmaya başlamıştır [7]. Kenelerin dağılımı ve yaygınlığı direkt olarak halk sağlığı problemi olup, çiftlik hayvanı yetiştiriciliğinin yapıldığı bölgelerde ve kırsal alanlarda bulunan insanlara patojen etkenleri nakledebilmektedir. Konaklardan veya sahadan toplanan kenelerin soy ve türleri ile belirlenen türlerde patojen etkenlerin araştırılması, farklı coğrafik bölgelerde yeni ortaya çıkan kene kaynaklı hastalıkların risk faktörlerinin belirlenmesinde yararlı olmaktadır [31].

A. phagocytophilum, insanlara *Ixodida* ailesine ait sert kenelerle bulaşır. Avrupa'daki ana vektör *I. ricinus*'tur. Doğu ABD'de *I. scapularis* Batı ABD'de *I. pacificus* vektörlük etmektedir. Asya'da *I. persulcatus* bulaştırmadan sorumlu tutulmaktadır. Bazı araştırmalarda *Ixodida* ailesinin diğer cinslerinde; *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma dissimile*, *Amblyomma maculatum*, *Dermacentor variabilis*'de de *A. phagocytophilum* DNA'sı gösterilmiştir [5].

Küresel ısınma gibi faktörlerin etkisiyle dünya üzerinde kenelerin yayılma alanları giderek genişlemektedir. HGA'nın da içinde bulunduğu kene kaynaklı hastalıkların yayılma olasılığı artmaktadır [7].

Türkiye'de kenelerin coğrafik dağılımını tespit etmek için yapılan çalışmada *Ixodida* ve *Argasida* ailelerinden 32 kene türü tanımlanmış, Akdeniz Bölgesinde *Ixodida* ailesinden 18 tür bildirilmiştir [9]. Çalışmamızda *Ixodida* familyasından 11 tür tespit edilmiş, çalışma alanlarımızda örnek toplama sırasında diğer *Ixodid* kenelere rastlanmamıştır. Çalışmamızda tespit ettiğimiz kene türleri daha önce Akdeniz Bölgesinde tanımlanan türler arasındaydı. Araştırma sahamızda araştırma süresi içerisinde *Ixodida* familyası üyesi başka yeni tür keneye rastlanmadı. Örneklemimizde tanımlanamayan kene türü ile karşılaşılmadı. *Argasida* ailesi türleri bu çalışmada araştırılmamıştır. Bizim çalışmamızda yarı karasal iklim özelliklerine sahip odakta (Özboynuinceli-Kırobası) *H. sulcata* 115 adet bulunurken akdeniz kıyı şeridinde yarı nemli ılıman bölgede (Çağbaşı- Çiçekli) bu tür tespit edilmemiştir. Karadeniz Bölgesinde yapılan çalışmadaki kenelerin tür dağılımı ve iklim isteği ilişkisi ile çalışmamızda bulunan sonuçlar tutarlı

bulunmuştur. Kenelerin biyoekolojik yaşam istekleri dikkate alınarak farklı iklimsel özellik gösteren odakların seçilmesiyle daha fazla kene türüne ulaşılabileceği anlaşılmaktadır.

A. phagocytophilum'un ana vektörleri *Ixodes* türleridir [7]. Bu çalışmada *Hyalomma* ve *Rhipicephalus* türlerinde *A. phagocytophilum* pozitifliği saptanmıştır. Bu türlerdeki DNA pozitiflik enfekte hayvanlardan kan emme sırasında edinilmiş olabilir.

Çalışmamız, Mersin yöresi'nde *A. phagocytophilum* kaynaklı enfeksiyonların insanlarda ve hayvanlarda görülme riskinin ortaya konulması açısından bir ön çalışma niteliğindedir. Kene kaynaklı diğer patojenlerin vektörü olan veya naklinde rol oynayan kene türlerinin belirlenmesi, bölgesel risk haritalarının oluşturulması ve kene kaynaklı hastalıklarla ilgili epidemiyolojik çalışmalara katkı sağlayacak veriler elde edilmiştir. Kenelerde *A. phagocytophilum* prevalansının belirlenmesi, taşıyıcı kene türlerinin ortaya konması ve olası yeni vektör türler üzerine yapılacak araştırmalar için katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Karadeniz Yöresi'nde bir çalışmada; (i) nemli sık yağış alan ve ılıman kıyı bölge (Giresun, Trabzon, Rize) ve (ii) karasal yarı kurak iç kesimlerde kışları soğuk yazları daha sıcak biyoklimatik bölge (Tokat, Amasya ve Gümüşhane) olmak üzere iki ayrı iklim zonundan *Ixodes* ailesi kenelerin tür dağılımlarının farklı olduğu gösterilmiştir. Nemli ılıman iklim özellikleri gösteren kıyı şeridinden 289 adet *Ixodes ricinus* ve 10 adet *Ixodes hexagonus* tanımlanırken, yarı kurak soğuk bölgeden toplanan keneler arasında bu türler bildirilmemiştir. Aynı çalışmada nemli iklim bölgesinden 20 adet *H. Punctata* tanımlanırken, yarı kurak bölgede ise 37 adet *H. sulcata* bulunmuş, her iki kene türüne aynı bölgede birlikte rastlanmamıştır [125].

İnsan Granulositik Anaplazmoz vakalarının klinik durumu hakkında çok sınırlı bilgi bulunmaktadır. Hastalığın seyri sırasında test yöntemlerinin pozitifliği yakalama oranlarında önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Enfeksiyonun erken akut fazında PZR testinin duyarlılığı yüksek, ≥ 4 günden sonra akut hastalık döneminin bitişine kadar serolojik testlerden daha az duyarlılıkta, enfeksiyon bitimine kadar pozitifliği doğru tespit etme yeteneğine sahip olduğu, iyileşme sonrası PZR testi duyarlılığının çok düştüğü bildirilmiştir [107].

Hastalığın akut evresinde kan yayma preparatlarında duyarlılığın %60'a kadar ulaştığı, perifer kanda etken yoğunluğu azaldığında duyarlılığın çok hızlı bir şekilde düştüğü, iyileşme sonrası ise kullanışsız bir yöntem olduğu belirtilmiştir [90].

Anaplazmoz başlangıcından itibaren >4 gün sonrasında serolojik testler duyarlılık kazanmaya başlamakta, hastalık başlangıcından 22 ila 28 gün sonra test edilen hastalarda maksimum antikor titresi gözlemlenmekte ve iyileşmeden sonra da antikor pozitifliği uzun süre devam etmektedir [90].

İnsan Granulositik Anaplazmoz bireysel hasta tanısında ve toplum seroprevalans çalışmalarında en çok IFA testi kullanılmaktadır. Uygulanmakta olan IFA testinde referans antikor eşik titre değeri bulunmamaktadır. Çalışmalarda eşik değerin düşük seçilmesi, *A. phagocytophilum* seroprevalansının olduğundan fazla tahmin edilmesine yol açabilmektedir. Bu durum, IFA testinin daha az duyarlı kabul edilmesine neden olmaktadır [26].

Uygun antibiyotiklerle tedavi başlanmasından itibaren 24-48 saat içinde PZR duyarlılığı azalır. Pozitif PZR sonucu tanıya yardımcı olur, ancak negatif PZR sonucu tanıyı dışlamaz ve negatif bir sonuç nedeniyle tedavi ertelenmemelidir. PZR ile DNA araştırmak için periferik kan, doku ve kemik iliği örnekleri kullanılabilir [91].

Bakterilerde Ribozomal RNA genleri oldukça yüksek derecede korunmuşluğa sahiptir. Bu nedenle moleküler tanı ve identifikasyon çalışmalarında ve filogenetik karakterlerin araştırılmasında en çok tercih edilen gen bölgeleridir. Birçok bakterinin rRNA genleri tek bir operonda sıralanmış birçok kez tekrar eden bölgelerden oluşur. Genlerin yerleşimi genellikle benzerlik gösterir. *A. phagocytophilum*'un genomunda diğer *Rickettsia* türlerine benzer olarak yalnızca tek bir sıra *rrf*, *rrs* ve *rpl* kopyası bulunmaktadır [92]. PZR uygulamalarında en çok dış membran proteinleri (MSP2) hedef alınmaktadır. Son zamanlarda Sitrat geni (*glTA*) de PZR hedefi olarak kullanılmaktadır [90].

Amerika kıtasında Anaplasmosis prevalansının diğer ülkelere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Dünya'da surveyans çalışmalarının çoğu seroprevalans araştırması olarak yapılmaktadır. *A. phagocytophilum* seroprevalansını tahmin etmek amacıyla dört kıtada yapılan 56 ayrı araştırmanın bulguları derlenerek sistematik bir inceleme ve meta-analiz çalışmasına dahil edilmiş, tüm çalışmaların ortalama seroprevalansı %8.4 (%6.6-10.4) olarak tespit edilmiştir. Enfeksiyon riskini belirleyen önemli unsurlar dikkate alınarak yapılan sınıflandırmalara rağmen, HGA seroprevalansının yüksek heterojenlikte olduğu bildirilmiştir. Seroprevalans çalışmaları sonucunda bir kısım faktörlere bağlı olarak insanlar için küresel bir tehdit oluşturabileceği vurgulanmaktadır [26].

Ülkelerin *A. phagocytophilum* enfeksiyon yükü eşit değildir ve yeterli bildirim yapılmamaktadır. Yüksek riskli olarak değerlendirilen popülasyonlarda tahmini *A. phagocytophilum* seroprevalansı %13,8 olarak bulunmuştur. Seroprevalans heterojenliğinin en önemli kaynaklarından birinin yüksek riskli popülasyonlar olabileceği Meta-regresyon analizi ile gösterilmiştir [30].

A. phagocytophilum'un serolojik tanı çalışmalarında ELISA yöntemi, IFA yönteminden daha az kullanılmaktadır [11]. ELISA testinde kullanılan reaktiflerin, *Ehrlichia* türlerine karşı oluşan immün yanıtı karşı da çapraz pozitif reaksiyon vermesi nedeniyle Anaplasmosis olarak

değerlendirmede yetersiz kalmaktadır [16]. Anaplasmosis’de iyileşmeden sonra da antikor yanıtının uzun süre yüksek kaldığı, tek serum örneğinden elde edilen pozitif sonuçların hastalığı doğrulamada yetersiz kaldığı, doğru zamanlanmış çift serum örneğinde serokonversiyonun gösterilmesine ihtiyaç olduğu belirtilmiştir [22]. Ağır nötropeni ile seyreden Anaplasmosis olguları ve immunsuprese hastalarda immun yanıt şekillenmediği durumlarda serolojik testlerin yanlış negatif sonuçlar verdiği bildirilmektedir. İnsanlarda yürütülen mevcut sürveyans çalışmalarına hafif klinik belirtilerle seyreden HGA olguları ile asemptomatik enfeksiyonlar dahil edilmemiştir [26].

Avrupa’nın farklı ülkelerinde İnsanlarda HGA seroprevalans çalışmalarında %0 ile %21 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir [26]. Türkiye’de Antalya’da kene ısırmasına maruz kalan kişilerde *A. phagocytophilum*’a karşı antikor seroprevalansı %8 olarak bulunmuştur [105]. Trakya bölgesinde kene ısırığı öyküsü olan kişilerin %25’inde *A. phagocytophilum* seropozitifliği saptanmıştır [106]. *A. phagocytophilum*’a karşı reaktif antikorların prevalansı Tokat’ta %5.77 ve Sinop’un kırsal kesimlerinde %10.62 olarak tespit edilmiştir [107].

A. phagocytophilum’un bir insan patojeni olduğunun belirlenmesi ilk defa moleküler yöntemlerle ortaya konulmuştur [3]. PZR testleri HGA’nın klinik ve çevresel olarak laboratuvar tanısında kültür ve serolojik yöntemlere göre duyarlılık ve özgüllüğü çok yüksektir. Ancak PZR yöntemlerinin duyarlılıklarının değişken olduğu belirtilmiştir [89]. Ayrıca *A. phagocytophilum* suşları içinde önemli genetik farklılıklar olduğu tespit edilmiş [62], çeşitli konakçılardan veya coğrafi konumlardan gelen izolatlar, groESL, ankA ve msp4 gibi sıklıkla kullanılan PZR hedef genleri içinde genetik çeşitlilik ve farklılık gösterilmiştir [92,93]. Bazı testlerin, tüm varyantları veya ekotipleri tespit etmede yetersiz olduğu birçok çalışmada vurgulanmıştır [108].

Vektörlerde ve rezervuar konakçılarda *A. phagocytophilum*’un araştırılması çalışmalarında bakterinin farklı varyantlarının olduğu tespit edilmiştir. Farklı gen bölgelerine spesifik primerlerin tanımlama etkinliklerinin değişkenlik gösterdiği birçok çalışmada belirtilmiştir [108]. İnsanlarda ve vektör kenelerde *Anaplasma* türlerinin araştırılması için PZR ve diğer moleküler yöntemler duyarlılık ve özgüllüklerinin yüksek olması nedeniyle son yıllarda çok sık kullanılmaktadır [109]. *A. phagocytophilum* DNA’sının saptanmasında 16S rRNA gen bölgesinin diğer gen bölgelerine oranla daha duyarlı olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir [110]. Ribozomal RNA genleri, bakteri türleri arasında oldukça yüksek korunmuşluğa sahip genler olup, türlerin identifikasyonları ve filogenetik karakterlerinin ortaya konması açısından moleküler çalışmalarda en sık tercih edilen gen bölgeleridir [90].

Dünya genelinde kenelerde *Anaplasma* türlerinin prevalans belirleme çalışmalarında pozitiflik tespit oranları değişkenlik göstermektedir. Prevalans farklılıklarının nedenleri arasında;

vektör kene popülasyonu, hayvan hareketleri ve iklim koşulları gibi birçok faktörün etkili olabileceği ileri sürülmüştür [92].

İngiltere ve Galler'deki 20 rekreasyon alanında 2014-2019 yılları arasında altı yıl boyunca toplanan 3.919 adet *Ixodes ricinus* nimflerinde *A. phagocytophilum*'un prevalansı %0 ila %20.4 arasında değişen oranlarda bulunmuş, ortalama prevalans %3.6 olarak tespit edilmiştir. Pozitif bulunan örneklerde tür içi varyant çeşitliliği %86,8'i *A. phagocytophilum* ekotip I, diğer % 13.2'sinin ise *A. phagocytophilum* ekotip II'den oluştuğu tespit edilmiştir [110]. İsviçre'nin tamamını kapsayabilecek nitelikte seçilmiş 171 bölgeden 62.889 *Ixodes ricinus* kene, 8534 kene havuzuna bölünerek yapılan PZR analizinde *A. phagocytophilum* DNA'sının prevalansı %11,9 olarak tespit edilmiş, kenelerde bireysel tahmini prevalans %1.71 olarak belirlenmiştir [111]. Norveç'te *Ixodes ricinus* ergin ve nimflerinde *A. phagocytophilum* prevalansı Mayıs ayında Ağustos ayına göre çok daha yüksek bulunmuş ancak sezonlar arasında büyük farklılıklara rastlanmamıştır. Ortalama prevalans %8,8 olarak tespit edilmiştir [112]. Fransa'da kenelerde *A. phagocytophilum* prevalansı %0,4-15,0 aralığında değişken oranlarda bulunmuştur [113,114],

Güney batı Slovakya'da *Ixodes ricinus* tür kenelerde *A. phagocytophilum* prevalansı kentsel/banliyö habitatında %7,2; (%6,1- 8,3) doğal yaşam ortamında %3,1 (%2,5-3,9) olarak tespit edilmiştir. Her bir habitatta yıllar ve mevsimler arasında enfekte kenelerinin prevalansında önemli yerel farklılıklar olduğu bildirilmiştir [115]. Moldova Kişinev şehrinde yapılan bir araştırmada 198 adet *Ixodes ricinus* kenesinde sadece *A. phagocytophilum* %9, *Borrelia burgdorferi sensu lato* ile birlikte pozitiflik %2.5 oranında rapor edilmiştir [116]. Almanya Bavyera'da yapılan çalışmalarda *Ixodes ricinus* türü kenelerde *Anaplasma phagocytophilum* prevalansı %2,5-9 arasında bildirilmektedir [117]. Almanya'da 5424 kenede yapılan araştırmada sadece *A. phagocytophilum* DNA'sı pozitifliği %1.0(n=54) olarak bulunmuştur [118]. Avusturya'da *Ixodes ricinus*'ta *A. phagocytophilum*'un iki genetik varyantının prevalansı %5,1-8.7 aralığında gösterilmiştir [119].

Romanya'nın 40 ilçesinden 113 lokasyonda toplanan 10.438 *Ixodes ricinus* kenesinde *A. phagocytophilum*'un yaygınlığını ve coğrafi dağılımı araştırılmış, Genel enfeksiyon prevalansı %3.42, lokasyon prevalansları %0.29 ile %22.45 arasında değişirken, enfekte bölgelerde ortalama prevalans %5.39 olarak tespit edilmiştir. En yüksek prevalans dişi kenelerde kaydedilmiştir, bunu erkek ve nimfler izlemiştir. Sonuçlar ve dağılım modeli, Romanya'nın tüm bölgesini kapsayan geniş bir *A. phagocytophilum* dağılımı göstermiştir [120]. İtalya'nın Kuzey-Batısında kene kaynaklı patojenlerin araştırıldığı kesitsel bir çalışmada üç yıllık (2017-2019) dönemde farklı türlerden oluşan 500 keneden *Ixodes ricinus* türünde %1,2 (+/n=6/500) *A. phagocytophilum* DNA'sı bulunmuştur [121]. Mısır'da yapılan bir çalışmada *Rhipicephalus sanguineus* türü kenelerin ergin ve nimf formlarında *A. phagocytophilum* bildirilmiştir [124].

Çalışmamızda, Mersin Yöresi'nde, Erdemli, Silifke ve Tarsus ilçelerinden altı yerleşim biriminden 1497 adet *Ixodid* kene toplanmıştır. Kenelerin morfolojik identifikasyonu stereo mikroskopta yapılmıştır. Örneklerimizdeki kenelerin *Ixodida* familyasından dört soy içerisinde 11 farklı türde kümelendiği morfolojik tanımlama ile tespit edilmiştir. Keneler soy, tür ve cinsiyetlerine göre ayrıldıktan sonra, *A. phagocytophilum* prevalansını belirlemek amacıyla PZR tabanlı üç ayrı moleküler yöntem kullanılmıştır.

Yang ve arkadaşları [109]; sığır, koyun ve kene örneklerinde (n=363) *A. phagocytophilum* varlığının tespiti için; 16SrRNA bölgesinden 3 ayrı primer setiyle, groEL gen bölgesinden 1 primer seti ve Msp4 gen bölgesinden 1 set olmak üzere 5 ayrı primer setinin Nested PZR duyarlılıklarını karşılaştırmışlar. 16SrRNA bölgesinden hazırladıkları primer setleri EC (EC9/EC12a ve SSAP2f/SSAP2r), EE (EE1/EE2 ve EE3/EE4) ve ge (ge3a/ge10r, ge9f/ge2) ile sırasıyla 75 (%20,7), 42 (%11,6) ve 19 (%5,2) pozitiflik tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada Msp4 ve groEL genlerine özgü primer setleriyle yapılan Nested PZR çalışmasında örneklerin hiç birinde pozitiflik tespit edememişler, Msp4 ve groEL gen bölgelerinin *A. phagocytophilum* tanısında duyarlı olmadığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda tüm örneklerde 16S rRNA gen bölgesinden EC (EC9/EC12a ve SSAP2f/SSAP2r) primer setlerinin kullanıldığı Nested PZR uygulaması yapılmıştır. Çağbaşı-Çiçekli odayından Temmuz 2020'de toplanan kenelerde; *Rhipicephalus sanguineus* türü 8 adet ergin dişi doymuş kenenin bulunduğu bir havuzda ve *Hyalomma excavatum* türü 6 adet doymuş dişi ergin kene bulunan bir havuzda *A. phagocytophilum* DNA'sı tespit edilmiştir. Kenelerde *A. phagocytophilum* DNA'sı prevalansı %0,95 (2/210) olarak bulunmuştur.

A. phagocytophilum'un moleküler karakterizasyon araştırmaları için 16SrRNA gen bölgesinden EC (EC9/EC12a ve SSAP2f/SSAP2r), primer setleri ile hazırlanan Nested PZR yönteminin en yüksek duyarlılık ve özgüllük değerlerini sağladığı, karakterizasyon çalışmalarında en elverişli yöntem olduğu birçok çalışmada (32,95, 102,118,119, 122,123) savunulmaktadır. İlk PZR basamağında EC (EC9/EC12a) primer seti ile yaklaşık 1462bp uzunluktaki PZR ürünün elde edilmesi için deneyimli personel ile uygun bir çalışma ortamına ihtiyaç duyulmakta, yöntemin laboratuvar optimizasyon ve validasyonu için deneme uygulamalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Nested PZR yöntemi iki aşamalı PZR uygulamasından oluşması nedeniyle daha fazla manipülasyon gerektirmekte ve kontaminasyon riski bulunmaktadır. Real Time PZR yöntemine göre daha uzun sürede sonuçlanmaktadır.

Çalışmamızda 16S rRNA gen bölgesine özgü Nested PZR uygulamalarımızda *A. phagocytophilum* DNA'sı pozitif bulunan örneklerin amplikonları Sanger sekans dizilemesinde 548 bazlık sekans baz dizisi sonuçları kendi aralarında %100 nükleotid sıra eşleşmesi gözlemlendi. Tespit edilen izolatlarımızla dünyadan ve Türkiye'den daha önce GenBank'a girilmiş

A. phagocytophilum izolatları arasındaki pairwise kıyaslamalarında 16S rRNA gen bölgesine göre sığır, koyun, keçi gibi hayvanlarda ve ixodid kenelerden bildirilen *A. phagocytophilum* izolatları arasında çeşitli nükleotid varyasyonları tespit edilmiştir. Çalışmamızda tespit edilen *A. phagocytophilum* izolatlarının, Genbank'ta kayıtlı 48 izolatla (*Anaplasma spp.* ve *A. phagocytophilum*) %98 ile %98,72 aralığında benzerlikler bulunmuştur. Ruminant ve kenelerden elde edilen KT944029'numara ile GenBank'ta kayıtlı *A. phagocytophilum* izolatıyla çalışmamızda tespit edilen izolatımızın 548 bazlık pairwise dizi karşılaştırmasında aralarında %99 (541/549) identik bulunmuş ve sığır kanından izole edilen MZ148467.1 nolu izolat ile 98% (540/549) dizi benzerliği bulunmaktadır.

Real-Time PZR ve Nested PZR uygulamaları, konvansiyonel PZR'dan daha duyarlı olduğu değerlendirilmektedir. *A. phagocytophilum*'un moleküler tanımlamaları ve genetik karakterizasyon belirlenmesi çalışmalarında *msp-2* gen bölgesini hedef alan markırlar kullanılmıştır [38]. Yüksek değişkenlik gösteren *Msp-2* gen bölgesi tür içi varyasyonların belirlenmesi çalışmalarında tercih edilmektedir. *Msp2* primerler *A. phagocytophilum* Amerika suşlarının teşhisinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Avrupa'da araştırmacılar farklı varyantların belirlenmesi amacıyla yeni primer tasarımları yapmışlardır [93].

Çalışmamızda 210 kene havuzundan elde edilen genomik DNA'larda TaqMan prob bazlı Real Time PZR uygulamasıyla *A. phagocytophilum* DNA'sı araştırıldı. *Rhipicephalus sanguineus* türü ergin dişi doymuş 8 adet keneden oluşturulan bir havuzda ve 6 adet *Hyalomma excavatum* türü doymuş dişi ergin kene bulunan bir havuzda *A. phagocytophilum* DNA'sı pozitif bulundu. Kene havuz sayısına göre Real Time PZR ile *A. phagocytophilum* pozitiflik oranı %0,95 (2/210) olarak bulunmuştur. DNA pozitif bulunan keneler, Tarsus İlçesi'ne bağlı Çağbaşı ve Çiçekli mahallelerinden Temmuz 2020'de toplanmıştı. Çağbaşı-Çiçekli odağından saha çalışmalarımız sırasında 549 adet *H. excavatum* toplanmıştır. Pozitif örneklerin tespit edildiği tarihte (Temmuz 2020 'de) Çağbaşı-Çiçekli odağından 238 adet *H. excavatum* toplanmıştır. CDC raporlarında [90] mevsimsel HGA insidans raporlarında hastalıkların en fazla Haziran ayında görüldüğü, daha sonra ise Temmuz ayında artışların olduğu belirtilmektedir. Çalışmamızda Temmuz ayında toplanan kenelerde *A. phagocytophilum* DNA pozitifliği tespit edilmiş ve aynı dönemde en fazla kene toplanmıştır. Bulgularımız, Kene aktivitesi artışı ile patojen sirkülasyonu arasındaki pozitif korelasyon varlığını desteklemektedir.

Nested PZR ve Rt-PZR yöntemlerinin her ikisi ile de aynı kene havuzlarından (2/210) *A. phagocytophilum* DNA'sı tespit edildi. Cohen'in Kappa Testine göre kappa sayısı 1,0 ($\kappa=+1$) olarak bulunmuş ve iki yöntemin sonuçları birbiri içinde uyumlu ($p<0,001$) bulunmuştur.

Rt-PZR yöntemi tek aşamalı olması nedeniyle kısa sürede çok sayıda örneğin taranmasına olanak sağlar. Tür ayırımına olanak verir, daha az reaktif ve sarf malzemesine ihtiyaç duyulur.

Ayrıca kapalı bir sistem olması nedeniyle kontaminasyon riski diğer yöntemlere göre oldukça düşüktür. Rt-PZR yönteminin yüksek duyarlılığı, kolay uygulanması, hızlı sonuç vermesi ve kontaminasyon riskinin düşük olması nedeniyle tanı amaçlı kullanım için öncelikli olarak tercih edilmesinin uygun olacağı kanaati oluşmuştur.

Nested PZR yöntemi iki PZR amplifikasyonu gerektirdiğinden kısa sürede çok sayıda örneğin taranması için elverişli değildir. Sonucun değerlendirilebilmesi için jel elektroforeze ihtiyaç duyulması, sonuç verme süresini uzatmaktadır. Ayrıca, kontaminasyon riski de Rt-PZR'a göre daha yüksektir. Tüm bunların yanında Nested PZR yöntemi yüksek duyarlılığı nedeniyle moleküler karakterizasyon çalışmasında yaygın olarak kullanılmış ve araştırmacıların tavsiye ettiği bir yöntemdir.

İnsan Granulositik Anaplazmozunu risk değerlendirmesi yapılabilmesi için, kenelerdeki *A. phagocytophilum* prevalansı hakkında bilgi sahibi olmak önemli bir ön koşuldur [118]. *A. phagocytophilum*'un tüm dünyada bilinen vektörleri *Ixodes pacificus*, *I. scapularis* ve *I. ricinus*'tur [14]. Türkiye'de *I. ricinus*'un Karadeniz, Ege ve Akdeniz bölgeleri gibi nemli ve ılıman iklim özelliklerine sahip alanlarda bulunduğu bildirilmiştir [9]. *A. phagocytophilum* dünyanın ve Türkiye'nin farklı bölgelerinde ixodida ailesinden *Ixodes* soyu dışındaki soylara ait kene türlerinde tespit edilmiştir [14].

Türkiye'de daha önce yapılmış çalışmalarda *Haemaphysalis sulcata*, *Hyalomma marginatum* ve *H. excavatum* türlerinde *A. phagocytophilum* pozitifliği bildirilmiştir [102]. Çalışmamızda identifiye edilen *Haemaphysalis sulcata*, *Hyalomma marginatum* türlerinde *A. phagocytophilum* DNA'sı tespit edilmemiştir.

Karadeniz Bölgesi'nde sığırlarda kandan yapılan prevalans çalışmasında mikroskopik olarak %10,1'inde (n=720) *A. phagocytophilum*'a benzer intrastoplazmik inklüzyonlar görülmüş, aynı çalışmada IFAT yöntemi ile %15,2 (n=720) seropozitiflik tespit edilmiştir. Aynı araştırmacılar 183 sığır kan örneğini PZR ile incelemiş %3,75 oranında *A. phagocytophilum* pozitifliği saptamışlardır [122].

Bursa İlinde vektör kenelerin bulunduğu bölgelerde yaşayan insanlardan ve vektör kene bulunmayan bölgelerde yaşayan insanlarda IFAT ile yapılan seroprevalans çalışmasında kene ısırma öyküsü bulunan bir kişide (%0,7) seropozitiflik bildirilmiştir [123].

Aktas ve arkadaşları, 389 sığır kan örneğinde yaptıkları moleküler çalışmada *A. phagocytophilum* DNA'sının %1 oranında bulunduğunu bildirmişlerdir [124]. Çalışmamızda, kenelerden oluşturduğumuz 210 havuzda %0,95 (2/210) oranında bulduğumuz prevalans, Aktas ve arkadaşlarının [124] bildirdiği %1'lik prevalans ile benzer görülmektedir. Çalışmamızda evcil hayvanlar üzerinde araştırma yapılmamıştır.

Karadeniz Bölgesi'nden sığırlar üzerinden toplanan kenelerde örnekleme'deki tüm türlerde *A. phagocytophilum* prevalansı %6,78 olarak bildirilmiştir [125]. Karadeniz Bölgesinde yapılan çalışmanın örneklemindeki kene türleri içinde *A. phagocytophilum* prevalans dağılımı *Hae. sulcata*'da %3,32, *Ixodes ricinus*'ta %7,64 olarak bildirilmiştir. *Ixodes* türlerinde yüksek prevalans tespit edilmesi örneklemin tamamının prevalansını yükselttiği gözlemlenmektedir. Bizim çalışmamızda *A. phagocytophilum* prevalansı kenelerde %0,95 olarak tespit edilmiştir. İki çalışmanın sonuçları arasında uyum bulunmamaktadır. Örnekleminizde *Ixodes* soyundan kene örneği olmamasından kaynaklı olarak çalışmamızda prevalansın daha düşük (%0,95) bulunmuş olabileceği düşünülmektedir.

Aydın Yöresi'nde yapılan bir başka çalışmada (102), 20 kene havuzu içerisinde *H. excavatum* ve *H. marginatum* türlerinden oluşturulan 4 havuzda *A. phagocytophilum* DNA'sı tespit edilmiştir. Bunun yanında *H. excavatum* türünün bulunduğu bir havuz ile *H. marginatum*'un bulunduğu bir havuzda *A. marginale* ve *A. phagocytophilum* birlikte pozitiflik rapor edilmiştir. Çalışmamızda aynı tür keneden (*H. excavatum*) oluşan bir havuzda *A. phagocytophilum* DNA'sı tespit edilmiştir. Ancak çalışmamızda saptadığımız prevalans (%0,95), Aydın Yöresinden bildirilenden daha düşük bulunmuştur. Aydın yöresinde yapılan çalışmada sadece hayvanlara tutunmuş olan kenelerden çalışma yapıldığı için prevalansın yüksek bulunmuş olabileceği düşünülmektedir.

Kayseri Yöresi'nde sığırlardan toplanan kenelerde *A. phagocytophilum* prevalansı, 265 ergin ixodid kene örneğinden bir *R. turanicus* ve bir *H. marginatum* türü kenede olmak üzere %0,75 oranında bildirilmiştir [127]. Kayseri Yöresi'nde yapılan bu çalışmada bildirilen prevalans (%0,75) ile çalışmamızda tespit edilen prevalans (%0,95) benzer bulunmuştur. Kayseri yöresinde yapılan çalışmada *Hyalomma*, *Rhipicephalus* soylarına ait kenelerde *A. phagocytophilum* DNA'sı pozitifliği bildirilmiş, çalışmamızda da benzer olarak aynı soylardan kenelerde *A. phagocytophilum* DNA'sı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada Mersin Yöresi'nde Ixodid kenelerde *A. phagocytophilum*'un varlığı/prevalansı moleküler yöntemlerle araştırılarak, *H. excavatum* ve *Rh. sanguineus* türlerinde *A. phagocytophilum* varlığı ortaya konulmuştur. Türkiye'de daha önce yapılmış bazı çalışmalarda [124, 127] bildirilen prevalans oranlarıyla çalışmamızda tespit edilen *A. phagocytophilum* prevalansının yaklaşık benzer oranlarda olduğu görülmektedir. Bazı çalışmalarda [110,125] bildirilenlere göre ise daha düşük *A. phagocytophilum* prevalansı bulunmuştur. Örnekleminizde (1497 adet kene) *A. phagocytophilum* için vektörlüğü kanıtlanmış *Ixodes* soyuna ait türlerin olmamasından kaynaklı olarak çalışmamızda bulunan *A. phagocytophilum* DNA prevalansının (%0,95) bazı çalışmalarda belirtilenlerden daha düşük bulunmuş olabileceği düşünülmektedir.

Ixodes soyuna ait türlerin de dahil edileceği araştırmalarda prevalansın daha yüksek düzeylere çıkabileceği tahmin edilmektedir.

Kısıtlılıklar

Çalışmamızda *Ixodida* familyasından 4 soy ve 11 türden oluşan 1497 adet kenede *A. phagocytophilum* araştırması yapılmıştır. Kene toplama sırasında *A. phagocytophilum* için vektörlüğü kanıtlanmış *Ixodes* soyuna ait kene türlerine ulaşılammıştır. *Ixodes* türlerinin de dahil edileceği çalışmalarda *A. phagocytophilum* prevalansının daha yüksek olabileceği tahmin edilmektedir.

Çalışmamız yıl içerisinde kenelerin aktif olduğu dönem dikkate alınarak bir yıl süreli olarak planlanmış olup, vektör aktivasyon sezonunda toplanan kene sayısı ve tür çeşitliliği ile sınırlıdır. Birden fazla yılı kapsayacak kesitsel çalışmalar yapılması halinde; vektörlüğü kanıtlanmış kene türleri ile vektör potansiyeli olan başka türlere ulaşılabilir.

Araştırma alanı genişletilmesi ve daha çok lokasyonda, daha fazla araştırma bütçe olanaklarıyla daha fazla veri elde edilebilir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Granulositik Anaplazmoz genellikle hafif klinik belirtilerle veya asemptomatik enfeksiyonlar şeklinde seyrettiği için, hastalar tanı almayabilir veya yetersiz tedavi verilebilmektedir.

A. phagocytophilum enfeksiyonu için coğrafi konum, iklim, ekonomik ve sosyokültürel koşullar önemli risk faktörleridir. Granulositik Anaplazmoz'un toplumsal tehdit oluşturabilmesi için enfeksiyon bulaşma döngüsü açısından en önemli konu kenelerin *A. phagocytophilum*'la enfekte olmasıdır. Anaplazmoz'a ilişkin risk değerlendirmesi yapılabilmesi için, kenelerdeki *A. phagocytophilum* prevalansı hakkında bilgi sağlanması bir ön koşul olarak kabul edilmektedir.

Hayvanlarla teması olan risk gurubundaki bireylerde, *A. phagocytophilum* suşlarının ve yüksek patojenik alt tiplerin ortaya çıkması ve salgınlara neden olma olasılığı bulunmaktadır.

Bu çalışmada Mersin Yöresi'nde *Ixodida* ailesinden 4 soya ait 11 türden 1497 adet kene, 210 havuza bölümlendirilerek *A. phagocytophilum* varlığı moleküler yöntemlerle araştırılmıştır.

H. excavatum türü kenelerin bulunduğu bir havuzda ve *R. sanguineus* türü kenelerden oluşan bir havuzda Nested PZR ve Real time PZR çalışmaları sonucunda *A. phagocytophilum* DNA'sı tespit edilmiştir. Nested PZR ve Real time PZR yöntemlerinin duyarlılıkları aralarında

uyumlu bulunmuştur. Tanı çalışmalarında Real time PZR yönteminin uygun olacağı değerlendirilmiştir. Karakterizasyon çalışmalarında ise Nested PZR diğer yöntemlere göre uygulamaya daha elverişli bulunmuştur. Araştırma bölgemizde vektörlüğü kanıtlanmamış kene türlerinde *A. phagocytophilum* tespit edilmesi, HGA risk varlığını ortaya koymaktadır. Bu çalışmada Mersin Yöresi'nde daha sonra yapılacak çalışmalar için bir ön veri sağlanmıştır.

Çalışmamızda Argasidae familyasına ait kene türleri dahil edilmemiştir. Bu aileden kenelerin de içinde bulunacağı çalışmalarda hala büyük oranda soru işaretleri barındıran rezervuar konak çeşitliliği gibi konularda bilgi sağlanabilir. Daha fazla türden kenenin dahil edileceği çalışmalarda patojen etken prevalansındaki değişim gözlenebilir.

Birden fazla yılı kapsayacak çalışmaların yapılmasıyla; iklim değişimlerinin vektör ve patojen varlığına/yoğunluğuna etkisi ortaya konulabilecek ve birçok epidemiyolojik parametre değerlendirilebilecektir.

KAYNAKLAR

- [1] Bakken J. S., & Dumler, J. S. (2015). Human granulocytic anaplasmosis. *Infectious disease clinics of North America*, 29(2), 341–355. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.02.007>
- [2] Woldehiwet Z. (2010). The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol*, 167, 108-122.
- [3] Chen, S.M., Dumler J.S., Bakken J.S., and Walker, D.H. (1994). Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.* 32:589–595.
- [4] Dumler, J.S., et al. (2001). Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:2145–2165.
- [5] Jaarsma RI, Sprong H, Takumi K *et al.* (2019). *Anaplasma phagocytophilum* evolves in geographical and biotic niches of vertebrates and ticks. *Parasites Vectors* **12**, 328 <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3583-8>
- [6] Dumić, I.; Jevtić, D.; Veselinović, M.; Nordstrom, C.W.; Jovanović, M.; Mogulla, V.; Veselinović, E.M.; Hudson, A.; Simeunović, G.; Petcu, E.; et al. (2022). Human Granulocytic Anaplasmosis. A Systematic Review of Published Cases. *Microorganisms*, 10, 1433. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071433>
- [7] Parola P, Paddock CD, & Raoult D. (2005). Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 719–756. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.719-756>.
- [8] Walker A.R, Bouattour A, Camicas J.-L., Estrada-Peña A., Horak I.G., Latif A.A., Pegram R.G., Preston P.M., *Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region A Guide to Identification of Species*, The University of Edinburgh, 2003, (Revised 2014) <https://www.researchgate.net/publication/259576176>
- [9] Aydın, L., Bakırcı, S. (2007). Geographical distribution of ticks in Turkey. *Parasitol Res* 101: 163
- [10] Guzman N, Yarrarapu SNS, Beidas SO. (2022). *Anaplasma phagocytophilum*. In: *Stat Pearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513341/>
- [11] CDC United States Morbidity and Mortality Weekly Report (2016) Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever Group Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis. Recommendations and Reports / Vol. 65 / No. 2
- [12] Dumler JS, Choi K-S, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, Grab DJ, and Bakken JS. (2005). Human Granulocytic Anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 11, No. 12, 1828-1834
- [13] Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS. (2007). Ehrlichiosis in humans epidemiology, clinical presentation, diagnosis and treatment. *Clin Infect Dis*, 45(1), 45-51.
- [14] Henningsson AJ, Aase A, Bavelaar H, Flottorp S, Forsberg P, Kirkehei I, Lövmar M, Nilsson K, Nyman D, Ornstein K, Sjöwall J, Skogman BH, Tjernberg I and Aaberge I, (2021).

- Laboratory Methods for Detection of Infectious Agents and Serological Response in Humans With Tick-Borne Infections: A Systematic Review of Evaluations Based on Clinical Patient. Samples. *Front. Public Health* 9:580102. doi: 10.3389/fpubh.2021.580102
- [15] Rymaszewka, A., Grenda, S. (2008) Bacteria of the genus *Anaplasma*-characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. *Vet. Med.* 53(11): 573-584
- [16] Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia JC., (2004). *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne Rickettsia. *Parasitol.*, 129: 285–300.
- [17] Aubry P, Geale DW. (2011). A review of bovine anaplasmosis. *Transbound Emerg Dis.* 58(1):1-30. doi: 10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x.
- [18] Rajput ZI, Hu SH, Arijo AG, Habib M, Khalid M. (2005). Comparative study of *Anaplasma* parasites in tick carrying buffaloes and cattle. *J. Zhejiang Univ. Sci.*, 6B: 1057– 1062.
- [19] Mubashira M, Tariqa M, Khana MS, Safdar M, Ozaslan M, Imrana M, Qudratullah, Siddiquee F, Junejob Y. (2022). Review on anaplasmosis in different ruminants. *ZEUGMA BIOLOGICAL SCIENCE* v:3 n:2 p:32-45
- [20] Gaunt SD, Beall MJ, Stillman BA, Lorentzen L, Diniz PPV, Chandrashekar R and Breitschwerdt EB. (2010). Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: Hematologic, serologic and molecular findings. *Parasit. Vectors*, 3(1): 33.
- [21] Domic I, Jevtic D, Veselinovic M, Nordstrom C. W., Jovanovic M., Mogulla V., Veselinovic E. M., Hudson A., Simeunovic G., Petcu E., & Ramanan P. (2022). Human Granulocytic Anaplasmosis-A Systematic Review of Published Cases. *Microorganisms*, 10(7), 1433. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071433>
- [22] Matei IA, Estrada-Peña A, Cutler SJ. et al. (2019). A review on the eco-epidemiology and clinical management of human granulocytic anaplasmosis and its agent in Europe. *Parasites Vectors* 12, 599 <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3852-6>
- [23] Jahn P, Zeman P, Bezdekova B, and Praskova I. (2010). Equine granulocytic anaplasmosis in the Czech Republic. *Vet. Rec.* 166, 646–649. doi: 10.1136/vr.4852
- [24] Carrade DD, Foley JE, Borjesson DL, and Sykes JE. (2009). Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J. Vet. Intern. Med. Am. Coll. Vet. Intern. Med.* 23, 1129–1141. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0384.x
- [25] Schäfer I, Kohn B. (2020). *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats: A literature review to raise clinical awareness. *J Feline Med Surg.* 22(5):428-441. doi: 10.1177/1098612X20917600.
- [26] Wang F, Yan M, Liu A, Chen T, Luo L, Li L, Teng Z, Li B, Ji Z, Jian M, Ding Z, Wen S, Zhang Y, Yue P, Cao W, Xu X, Zhou G, Bao F. (2020). The seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in global human populations: A systematic review and meta-analysis. 16. doi: 10.1111/tbed.13548. PMID: 32180352.
- [27] Bakken JS, Dumler JS. (2006). Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. *Ann NY Acad Sci* 1078:236-247
- [28] Li H, Zhou Y, Wang W, Guo D, Huang S, Jie S. (2011). The clinical characteristics and outcomes of patients with human granulocytic anaplasmosis in China. *Int J Infect Dis.* 15(12):e859-66. doi: 10.1016/j.ijid.2011.09.008.

- [29] Scott, J. D., & Pesapane, R. R. (2021). Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia odocoilei*, *Babesia* sp., *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato, and *Hepatozoon canis* in *Ixodes scapularis* Ticks Collected in Eastern Canada. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 10(10), 1265. <https://doi.org/10.3390/pathogens1010126>
- [30] Rymaszewska A, Grenda S. (2008). Bacteria of the genus *Anaplasma* – characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. *Veterinarni Medicina*, 53 (11): 573–584
- [31] Stuen S, Granquist EG, and Silaghi C. (2013). *Anaplasma phagocytophilum* a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00031>
- [32] Granquist EG, et al. (2010). A morphological and molecular study of *Anaplasma phagocytophilum* transmission events at the time of *Ixodes ricinus* tick bite. *Acta Vet. Scand.* 52:43
- [33] Baldrige GD, et al. (2009). Transovarial transmission of Francisella-like endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* variants in *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 46:625–632
- [34] Keesing, F., Hersh, M. H., Tibbetts, M., McHenry, D. J., Duerr, S., Brunner, J., Killilea, M., LoGiudice, K., Schmidt, K. A., & Ostfeld, R. S. (2012). Reservoir competence of vertebrate hosts for *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerging infectious diseases*, 18(12), 2013–2016. <https://doi.org/10.3201/eid1812.120919>
- [35] Foley JE, et al. (2009). Distinct ecologically relevant strains of *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg. Infect. Dis.* 15:842–843
- [36] Massung RF, et al. (2005). *Anaplasma phagocytophilum* in white-tailed deer. *Emerg. Infect. Dis.* 11:1604–1606
- [37] Katargina O., et al. (2011). Identification of *Anaplasma phagocytophilum* in tick populations in Estonia, European part of Russia and Belarus. *Clin. Microbiol. Infect.* [doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03457.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03457.x)
- [38] Dugat T, Lagrée AC, Maillard R, Boulouis HJ and Haddad N (2015). Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives *Front. Cell. Infect. Microbiol* <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00061>
- [39] Wurutu, Gaowa, Kawamori, F., Aochi, M., Masuda, T., & Ohashi, N. (2009). Characterization of p44/msp2 multigene family of *Anaplasma phagocytophilum* from two different tick species, *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus*, in Japan. *Japanese journal of infectious diseases*, 62(2), 142–145.
- [40] Rikihisa Y. (2011). Mechanisms of Obligatory Intracellular Infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Microbiol.* 24: 469–489
- [41] Chmelař J., Kotál J., Karim S., Kopacek P., Francischetti IM., Pedra JH., et al. Sialomes and mialomes (2016). A systems-biology view of tick tissues and tick-host interactions. *Trends Parasitol.* 32(3):242–54. pii: S1471-4922(15)00213-5. doi: 10.1016/j.pt.2015.10.002 PMID: 26520005
- [42] de la Fuente J., Estrada-Peña A., Cabezas-Cruz A., Kocan KM. (2016). *Anaplasma phagocytophilum* uses common strategies for infection of ticks and vertebrate hosts. *Trends Microbiol.* 24(3):173–80. pii: S0966-842X(15)00277-2. doi: 10.1016/j.tim.2015.12.001 PMID: 26718986

- [43] Wikel S. (2013). Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Front Microbiol.* 4:337. doi: 10.3389/fmicb.2013.00337 PMID: 24312085
- [44] Dumler JS. The biological basis of severe outcomes in *Anaplasma phagocytophilum* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* (2012); 64:13–20. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00909.x PMID: 22098465
- [45] Severo MS, Pedra JHF, Ayllón N, Kocan KM, de la Fuente J. Anaplasma. In: Tang YW, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, editors. (2015). *Molecular Medical Microbiology* (2nd edition). Academic Press: Elsevier; Volume 3, Chapter 110, pp. 2033–2042.
- [46] Cabezas-Cruz A, Mateos-Hernández L, Pérez-Cruz M, Valdés J, Fernández de Mera IG, Villar M, et al. (2015) Regulation of the immune response to α -gal and vector-borne diseases. *Trends Parasitol.* 31: 470–476. doi: 10.1016/j.pt.2015.06.016 PMID: 26433250
- [47] Van Nunen SA, O'Connor KS, Clarke LR, Boyle RX, Fernando SL, (2009). An association between tick bite reactions and red meat allergy in humans. *Med J Aust* 190:510-1.
- [48] Commins SP, James HR, Kelly HA, Pochan SL, Workman LJ, Perzansowski MS, et al. (2011). The relevance of tick bites to the production of IgE antibodies to the mammalian oligosaccharide galactose- α -1,3-galactose. *J Allergy Clin Immunol* 127;1286-93.
- [49] Borjesson D, Kobayashi S, Whitney A, Voyich J, Argue C, Deleo F. (2005) Insights into pathogen immune evasion mechanisms: *Anaplasma phagocytophilum* fails to induce an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *J Immunol.* 174: 6364–6372.
- [50] Troese M.J., Kahlon A., Ragland S.A., Ottens A.K., Ojogun N., Nelson K.T., Walker N.J., Borjesson D.L., and Carlyon J. A., (2011). Proteomic Analysis of *Anaplasma phagocytophilum* during Infection of Human Myeloid Cells Identifies a Protein That Is Pronouncedly Upregulated on the Infectious Dense-Cored Cell. *INFECT. IMMUN. VOL. 79*, p. 4696–4707 doi:10.1128/IAI.05658-11
- [51] Rikihisa Y. (2004). Rickettsial diseases, p. 96–109 In Reed S. M., Bayly W., Sellon D. C. (ed.), *Equine internal medicine*, 2nd ed. W. B. Saunders, Philadelphia, PA
- [52] Huang W, Xiong Q, Lin M, Rikihisa Y. (2021). *Anaplasma phagocytophilum* hijacks flotillin and NPC1 complex to acquire intracellular cholesterol for proliferation, which can be inhibited with ezetimibe. *mBio* 12: e02299-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.02299-21>
- [53] Dunning Hotopp JC, et al. (2006). Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *PLoS Genet.* 2:e21. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020021>
- [54] Lin M. et al. (2011). Global proteomic analysis of two tick-borne emerging zoonotic agents: *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*. *Front. Microbiol. Cell. Infect. Microbiol.* 2:24 doi: 10.3389/fmicb.2011.00024 [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
- [55] Passos LM. (2012). In vitro cultivation of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in tick cell lines: a review. *Rev Bras Parasitol Vet.* 21(2):81-6. doi: 10.1590/s1984-29612012000200002. PMID: 22832744.
- [56] Troese MJ, Carlyon JA. (2009). *Anaplasma phagocytophilum* dense-cored organisms mediate cellular adherence through recognition of human P-selectin glycoprotein ligand 1. *Infect. Immun.* 77:4018–4027 <https://doi.org/10.1128/IAI.00527-09>

- [57] Oliva Chávez AS, Fairman JW, Felsheim RF, Nelson CM, Herron MJ, Higgins L, et al. (2015). An O-Methyltransferase Is Required for Infection of Tick Cells by *Anaplasma phagocytophilum*. *PLoS Pathog* 11(11): e1005248. doi:10.1371/journal.ppat.1005248
- [58] McGinn J, & Lamason RL (2021). The enigmatic biology of rickettsiae: recent advances, open questions and outlook. *Pathogens and disease*, 79(4), ftab019. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftab019>
- [59] Nordenfelt P, and Tapper H, (2011). Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*. 2 Vol. 90 DOI: 10.1189/jlb.0810457
- [60] Carlyon JA, Abdel-Latif D, Pypaert M, Lacy P, Fikrig E. (2004). *Anaplasma phagocytophilum* utilizes multiple host evasion mechanisms to thwart NADPH oxidase-mediated killing during neutrophil infection. *Infect. Immun.* 72:4772–4783
- [61] Xiong Q, Wang X, Rikihisa Y. (2007). High-cholesterol diet facilitates *Anaplasma phagocytophilum* infection and up-regulates macrophage inflammatory protein-2 and CXCR2 expression in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Infect. Dis.* 195:1497–1503
- [62] Huang H, Wang X, Kikuchi T, Kumagai Y, Rikihisa Y. (2007). Porin activity of *Anaplasma phagocytophilum* outer membrane fraction and purified P44. *J. Bacteriol.* 189:1998–2006 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- [63] Papanikou E, Karamanou S, Economou A. (2007). Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:839–851
- [64] Rikihisa Y. (2017). Role and Function of the Type IV Secretion System in *Anaplasma* and *Ehrlichia* Species. *Curr Top Microbiol Immunol*;413:297-321. doi: 10.1007/978-3-319-75241-9_12. PMID: 29536364.
- [65] Lin M, den Dulk-Ras A, Hooykaas PJ, Rikihisa Y. (2007). *Anaplasma phagocytophilum* AnkA secreted by type IV secretion system is tyrosine phosphorylated by Abl-1 to facilitate infection. *Cell Microbiol.* 9(11):2644-57. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00985.x. Epub 2007 Jun 24. PMID: 17587335.
- [66] Silaghi C, Liebisch, G. & Pfister, K. (2011). Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. *Parasites Vectors* 4, 161 <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-161>
- [67] Hoar BR, Nieto NC, Rhodes DM, Foley JE, (2008). Evaluation of sequential coinfection with *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma marginale* in cattle, *Am. J. Vet. Res.* 69 1171–1178, <http://dx.doi.org/10.2460/ajvr.69.9.1171>.
- [68] Truchan H. K, Seidman D., & Carlyon J. A. (2013). Breaking in and grabbing a meal: *Anaplasma phagocytophilum* cellular invasion, nutrient acquisition, and promising tools for their study. *Microbes and infection*, 15(14-15), 1017–1025. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.10.010>
- [69] Herron MJ, Ericson ME, Kurtti TJ, Munderloh UG. (2005). The interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, endothelial cells, and human neutrophils. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063:374–382
- [70] Reneer DV, et al. (2006). Characterization of a sialic acid- and P-selectin glycoprotein ligand-1-independent adhesin activity in the granulocytotropic bacterium *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell. Microbiol.* 8:1972–1984

- [71] Thomas V., Fikrig E. (2007). *Anaplasma phagocytophilum* specifically induces tyrosine phosphorylation of ROCK1 during infection. *Cell. Microbiol.* 9:1730–1737
- [72] Rikihisa Y. (2006). Ehrlichia subversion of host innate responses. *Curr. Opin. Microbiol.* 9:95–101
- [73] Müller BJ, Westheider A, Birkner K, Seelig B, Kirschnek S, Bogdan C and von Loewenich FD (2021) *Anaplasma phagocytophilum* Induces TLR- and MyD88-Dependent Signaling in In Vitro Generated Murine Neutrophils. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11:627630. doi: 10.3389/fcimb.2021.627630
- [74] Alberdi P, Cabezas-Cruz A, Prados PE *et al.* (2019). The redox metabolic pathways function to limit *Anaplasma phagocytophilum* infection and multiplication while preserving fitness in tick vector cells. *Sci Rep* 9, 13236 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49766-x>
- [75] Ge Y., Yoshiie K., Kuribayashi F., Lin M., Rikihisa Y. (2005). *Anaplasma phagocytophilum* inhibits human neutrophil apoptosis via upregulation of bfl-1, maintenance of mitochondrial membrane potential and prevention of caspase 3 activation. *Cell. Microbiol.* 7:29–38
- [76] Ge Y, Rikihisa Y, (2006). *Anaplasma phagocytophilum* delays spontaneous human neutrophil apoptosis by modulation of multiple apoptotic pathways. *Cell. Microbiol.* 8:1406–1416
- [77] Alberdi P, Espinosa P, Cabezas-Cruz A, de La Fuente j, (2016). *Anaplasma phagocytophilum* Manipulates Host Cell Apoptosis by Different Mechanisms to Establish Infection. *Veterinary Sciences, MDPI*, 3 (3), pp.15. [ff10.3390/vetsci3030015](https://doi.org/10.3390/vetsci3030015)[ff. fahal-02630160f](https://doi.org/10.3390/vetsci3030015)
- [78] Mitroulis I, et al. (2010). Regulation of the autophagic machinery in human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 40:1461–1472 [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- [79] Dumler JS, Sinclair SH, Pappas-Brown V and Shetty AC (2016) Genome-Wide *Anaplasma phagocytophilum* Anka-DNA Interactions Are Enriched in Intergenic Regions and Gene Promoters and Correlate with Infection-Induced Differential Gene Expression. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6:97. doi: 10.3389/fcimb.2016.00097
- [80] Sukumaran B., et al. (2011). *Anaplasma phagocytophilum* AptA modulates Erk1/2 signalling. *Cell. Microbiol.* 13:47–61
- [81] Torina A, Blanda V, Villari S, Piazza A, La Russa F, Grippi F, La Manna MP, Di Liberto D, de la Fuente J, Sireci G. (2020). Immune Response to Tick-Borne Hemoparasites: Host Adaptive Immune Response Mechanisms as Potential Targets for Therapies and Vaccines. *Int J Mol Sci.* 21(22):8813. doi: 10.3390/ijms21228813.
- [82] Schotthoefer AM, Schrodi SJ, Meece JK, Fritsche TR, Shukla SK (2017). Pro-inflammatory immune responses are associated with clinical signs and symptoms of human anaplasmosis. *PLoS ONE* 12(6): e0179655. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179655>
- [83] Choi K. S., Scorpio D. G., & Dumler J. S. (2014). Stat1 negatively regulates immune-mediated injury with *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(10), 5088–5098. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401381>

- [84] Dumler JS, Lichay M, Chen W-H, Rennoll-Bankert KE and Park J-h (2020) *Anaplasma phagocytophilum* Activates NF- κ B Signaling via Redundant Pathways. *Front. Public Health* 8:558283. doi: 10.3389/fpubh.2020.558283
- [85] Gussmann K, Kirschnek S. & von Loewenich, F.D. (2017). Interferon- γ -dependent control of *Anaplasma phagocytophilum* by murine neutrophil granulocytes. *Parasites Vectors* 10, 329 <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2274-6>
- [86] Johns J. L., Macnamara K. C., Walker N. J., Winslow G. M., Borjesson D. L. (2009). Infection with *Anaplasma phagocytophilum* induces multilineage alterations in hematopoietic progenitor cells and peripheral blood cells. *Infect. Immun.* 77:4070–4080
- [87] Birkner K., et al. (2008). The elimination of *Anaplasma phagocytophilum* requires CD4+ T cells, but is independent of Th1 cytokines and a wide spectrum of effector mechanisms. *Eur. J. Immunol.* 38:3395–3410
- [88] Brown W. C. (2012). Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: implications for bacterial persistence. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 35(3), 241–252. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.12.002>
- [89] Schotthoefer AM, Meece, J. K., Ivacic, L. C., Bertz, P. D., Zhang, K., Weiler, T., Uphoff, T. S., & Fritsche, T. R. (2013). Comparison of a real-time PCR method with serology and blood smear analysis for diagnosis of human anaplasmosis: importance of infection time course for optimal test utilization. *Journal of clinical microbiology*, 51(7), 2147–2153. <https://doi.org/10.1128/JCM.00347-13>
- [90] <https://www.cdc.gov/anaplasmosis/stats/index.html>
- [91] Granquist EG, Bårdsen K, Bergström K, & Stuen S. (2010). Variant and individual dependent nature of persistent *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Acta veterinaria Scandinavica*, 52(1), 25. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-25>
- [92] Langenwalder DB, Schmidt S, Gilli U, Pantchev N, Ganter M, Silaghi C, Aardema ML, von Loewenich FD. (2019). Genetic characterization of *Anaplasma phagocytophilum* strains from goats (*Capra aegagrus hircus*) and water buffalo (*Bubalus bubalis*) by 16S rRNA gene, ankA gene and multilocus sequence typing. *Ticks Tick Borne Dis.* doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.101267. Epub 2019 Aug 13. Erratum in: *Ticks Tick Borne Dis.* 12(2):101640. PMID: 31444126.
- [93] Barbet AF, Lundgren AM, Alleman AR, et al. (2006). Structure of the site reveals global diversity in MSP2 (P44) variants in *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect Immun.* 74: 6429–6437.
- [94] Silaghi C. , Santos A S, Gomes J, et al. (2017). Guidelines for the Direct Detection of *Anaplasma spp.* in *Diagnosis and Epidemiological Studies Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 17(1):12-22 DOI:10.1089/vbz.2016.1960
- [95] Granquist EG, Aleksandersen M, Bergström K, Dumler SJ, Torsteinbø WO, & Stuen S, (2010). A morphological and molecular study of *Anaplasma phagocytophilum* transmission events at the time of Ixodes ricinus tick bite. *Acta veterinaria Scandinavica*, 52(1), 43. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-43>
- [96] Chapman A.S., Bakken J.S., Folk S.M. (2006) Tickborne Rickettsial Diseases Working Group; CDC Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis United States: a practical guide for

- physicians and other health-care and public health professionals. *MMWR Recomm Rep.* 55(RR-4):1-27.
- [97] Xiong Q, and Rikihisa Y, (2011). The prenylation inhibitor manumycin A reduces the viability of *Anaplasma phagocytophilum*. *Journal of Medical Microbiology.* 60, 744-749
- [98] Crosby FL, Lundgren AM, Hoffman C, Pascual DW, Barbet A F. (2018). VirB10 vaccination for protection against *Anaplasma phagocytophilum* BMC Microbiology volume 18, Article number: 217
- [99] Naimi WA, Gumpf JJ, Green RS, Izac JR, Zellner MP, Conrad DH, Marconi RT, Martin RK, & Carlyon JA. (2020). Immunization against *Anaplasma phagocytophilum* Adhesin Binding Domains Confers Protection against Infection in the Mouse Model. *Infection and immunity*, 88(10), e00106-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00106-20>
- [100] Merino O, Alberdi P, Pérez de la Lastra JM, & de la Fuente J. (2013). Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 30. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00030>.
- [101] Muhanguzi D, Ndekezi C, Nkamwesiga J, Kalayou S, Ochwo S, Vuyani M, Kimuda MP. (2022). Anti-Tick Vaccines: Current Advances and Future Prospects. *Methods Mol Biol.* 2411:253-267. doi: 10.1007/978-1-0716-1888-2_15. PMID: 34816410.
- [102] Hoşgör M, Bilgiç HB, Bakırcı S. (2015). Detection of *Anaplasma / Ehrlichia* Species of Cattle and Ticks in Aydın Region *Turkiye Parazitoloj Derg.* 39: 291- 298.
- [103] Kawahara M, Rikihisa Y, Lin Q, et al. (2006) Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia sp.* in wild deer and ticks on two major islands in Japan. *Appl. Environ. Microbiol*; 72: 1102-1109.
- [104] Courtney, J. W., Kostelnik, L. M., Zeidner, N. S., & Massung, R. F. (2004). Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *Journal of clinical microbiology*, 42(7), 3164-3168. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3164-3168.2004>
- [105] Ongut G, Ogunc D, Mutlu G, Colak D, Gultekin M, Gunseren F, Donmez L, Tuncer D. (2006). Seroprevalence of antibodies to *Anaplasma phagocytophilum* in Antalya, Turkey. *Infection.* 34(2):107-9. doi: 10.1007/s15010-006-5040-9. PMID: 16703304.
- [106] Gürcan Ş, Eskiocak M, Kılıç H, Kunduracılar H (2010). Kene ısırığı öyküsü olan kişilerde Anaplazmoz seropozitifliği. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 27(1), 79 - 82.
- [107] Güneş T, Poyraz Ö, Ataş M, Turgut NH, (2011). The seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in humans from two different climatic regions of Turkey and its co-seroprevalence rate with *Borrelia burgdorferi*. *Turk J Med Sci.* 41 (5): 903-908 doi:10.3906/sag-1009-1148
- [108] Zhao S, Cui Y, Jing J, Yan Y, Peng Y, Shi K, Wang K, Zhou Y, Jian F, Zhang L, Wang R, Ning C, (2019). Rapid and sensitive detection of *Anaplasma phagocytophilum* using a newly developed recombinase polymerase amplification assay. *Experimental Parasitology*, Volume 201, Pages 21-25, ISSN 0014-4894 <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.04.010>.
- [109] Yang J, Liu Z, Niu Q, et al. (2016) Evaluation of different nested PCRs for detection of *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants and ticks. *BMC Vet Res* 12: 35.
- [110] Gandy S, Hansford K, McGinley L, Cull B, Smith R, Semper A, Brooks T, Fonville M, Sprong H, Phipps P, Johnson N, Medlock JM. (2022) Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in

- questing *Ixodes ricinus* nymphs across twenty recreational areas in England and Wales. *Ticks and Tick-borne Diseases* 13. 101965 <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101965>
- [111] Pilloux L, Baumgartner A, Jaton K, Lienhard R, Ackermann-Gäumann R, Beuret C, Greub G. (2008). Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Coxiella burnetii* in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland: an underestimated epidemiologic risk. *New Microbes New Infect.* 6;27:22-26. doi: 10.1016/j.nmni.. PMID: 30534383; PMCID: PMC6278774.
- [112] Mysterud A, Easterday WR, Qviller L, Viljugrein H, and Ytrehus B, (2013). Spatial and seasonal variation in the prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in questing *Ixodes ricinus* ticks in Norway. *Parasites & Vectors* 6:187 <http://www.parasitesandvectors.com/content/6/1/187>
- [113] Ferquel E, Garnier M, Marie J, et al. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Anaplasmataceae members in *Ixodes ricinus* ticks in Alsace, a focus of Lyme borreliosis endemicity in France. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 3074-3078
- [114] Halos L, Vourc'h G, Cotte V, et al. (2006). Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* sp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in Questing *Ixodes ricinus* Ticks from France. *Ann N Y Acad Sci* 1078, 316-319.
- [115] Svitálková Z, Haruštiaková D, Mahríková L, Berthová L, Slovák M, Kocianová E, and Kazimírová M. (2015). *Anaplasma phagocytophilum* prevalence in ticks and rodents in an urban and natural habitat in South-Western Slovakia. *Parasites & Vectors* 8:276 DOI 10.1186/s13071-015-0880-8
- [116] Kočij Movila, A Taragel'ová, V Toderas, et al. (2007). First report of *Anaplasma phagocytophilum* and its co-infections with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) from Republic of Moldova. *Exp. Appl Acarol* 41: 147-152.
- [117] von Wissmann B, Hautmann W, Sing A, Hizo-Teufel C, Fingerle V. (2015). Assessing the risk of human granulocytic anaplasmosis and lyme borreliosis after a tick bite in Bavaria, Germany. *Int J Med Microbiol.* 305(7):736-41. doi: 10.1016/j.ijmm.2015.08.026.
- [118] Hartelt K, Oehme R, Frank H, et al. (2004). Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp. *Rickettsia* sp, and *Babesia* sp. in Southern Germany. *Int J Med Microbiol.* 37: 86-92.
- [119] Polin H, Hufnagl P, Haunschmid R, Gruber F, Ladurner G. (2004). Molecular Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* Ticks and Wild Animals in Austria. *J Clin Microbiol.* 42: 2285-2286.
- [120] Matei IA, Kalmár Z, Magdaş C, Magdaş V, Toriay H, Dumitrache MO, Ionică AM, D'Amico G, Sándor AD, Mărcuţan DI, Domşa C, Gherman CM, Mihalca AD. (2015). *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks from Romania. *Ticks Tick Borne Dis.* Apr;6(3):408-13. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.03.010.
- [121] Audino T. et al. (2021). Ticks infesting humans and associated pathogens: a cross-sectional study in a 3-year period (2017–2019) in northwest Italy. *Parasites Vectors* 14:136 <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04603-x>
- [122] Gökçe HA, Genç O, Akça A. (2008). Molecular and Serological Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* Infection of Farm Animals in The Black Sea Region of Turkey. *Acta Vet Hung.* 56: 281-292.
- [123] Alver O, Selçuk Ö, ve AYDIN L. (2015). Seroprevalence of human *Anaplasma phagocytophilum* in Bursa Province, Turkey. Vol. 9(7), pp. 477-480,

DOI: 10.5897/AJMR2014.7238 <http://www.academicjournals.org/AJMR>

- [124] Aktas M, Altay K, Dumanli N. (2011). Molecular detection and identification of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in cattle from Turkey, Ticks Tick Borne Dis. 2: 62-65.
- [125] Aktas M, Altay K, Ozubek S, Dumanli N. (2012). A survey of ixodid ticks feeding on 62 cattle and prevalence of tick-borne pathogens in the Black Sea region of Turkey. Vet Parasitol 2012; 187: 567-571.
- [126] Ghafar M.W. ve Amer S.A. (2012). Prevalence and first molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum*, the agent of human granulocytic anaplasmosis, in *Rhipicephalus sanguineus* ticks attached to dogs from Egypt. Cairo University Journal of Advanced Research 3, 189-194
- [127] Türkmen, Ö. (2016) Sığırlardan toplanmış ixodid kenelerde *Anaplasma phagocytophilum*'un real time PCR'la araştırılması ve saptanan izolatların moleküler karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, Türkiye

EKLER

EK 1. Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Raporu



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 78017789/050.01.04/ 1187016

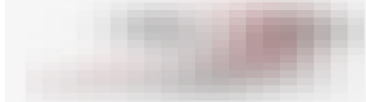
03/10/2019

Konu : Etik Kurul Kararı

Sayın Prof. Dr. Nuran DELİALİOĞLU
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi

Sorumluluğunuzda yapılması tasarlanan "İxodid Cinsi Kenelerde Anaplasma phagocytophilum'un Moleküler Yöntemlerde Araştırılması" adlı araştırmaya ilişkin 02/10/2019 tarihli ve 2019/431 sayılı Kurul Kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi arz/rica ederim.


Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Kurul Başkanı

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
02/10/2019	18	431

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilimi Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Naran DELIALIOĞLU'nun sorumluluğunda yapılması tasarlanan "İsohid Cinsi Kenelerde Anaplazma phagocytophilum'un Moleküler Yöntemlerde Araştırılması" adlı araştırma için hazırlanmış olan ve 26/09/2019 tarihinde sunulan Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar İçin Başvuru Formu ile ilgili belgeler araştırmanın gerekeceği, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, araştırmanın görülebilir üzerinde yapılmayacağı anlaşıldığından, yürürlükte olan ilgili yasal düzenlemeler gereğince Etik Kurul onayının gerekli olmadığına toplantıya katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

İmza
Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Başkan

İmza
Prof. Dr. Selma ÜNAL
Başkan Yardımcısı

İmza
Prof. Dr. F. Özlem KANDEMİR
Üye

İmza
Prof. Dr. Olgu HALLIOĞLU KILINÇ
Üye

İmza
Prof. Dr. Murat BOZLU
Üye

İmza
Prof. Dr. M. Sami SERİN
Üye

(Katılmadı)
Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN
Üye

İmza
Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE
Üye

İmza
Prof. Dr. İsmail ÜN
Üye

İmza
Dr. Öğr. Üyesi M. Türcan IŞIK
Üye

İmza
Dr. Öğr. Üyesi Nalan TİFTİK
Üye

İmza
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa AZIZOĞLU
Üye

İmza
Dr. Öğr. Üyesi Özge KURMUŞ
Üye

İmza
H. Betül LEVENT ERDAL
Üye

(Katılmadı)
Lale DAĞLI
Üye



Prof. Dr. Bahar Tunçtan
Başkanı
ASLI GİBİDİR



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ENSTİTÜ YÖNETİM KURULU KARARLARI



Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
13.09.2019	22	2019/441

Karar 441- Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığından gelen 10.09.2019 tarihli ve 1154570 sayılı yazı üzerine görüldü.

Prof. Dr. Nuran **DELİALIOĞLU**'nun danışmanlığında hazırlanan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı doktora öğrencisi Osman SEZER'in, "İxodid Cinsi Kenelerde Anaplasma phagocytophilum'un Moleküler Yöntemlerle Araştırılması" konulu tez önerisinin "Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin 49/1. maddesi uyarınca kabul edilmesine, durumun gereği için adı geçen öğrenciye, danışmanına ve duyurulmak üzere Anabilim Dalı Başkanlığına bildirilmesine oy birliğiyle karar verildi.

(İmza)
Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN
(Başkan)

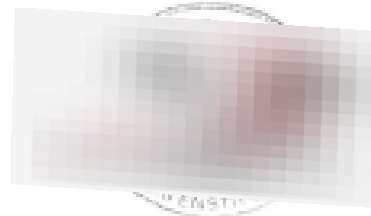
(İmza)
Doç. Dr. Seda TEZCAN ÜLGER
(Üye)

(İmza)
Doç. Dr. Gülay ALTUN UĞRAŞ
(Üye)

(İmza)
Prof. Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT
(Üye)

(İznil)
Prof. Dr. Öztekin ALGÜL
(Üye)

(İmza)
Doç. Dr. Meral GÜN
(Üye)



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı :

Doğum Tarihi :

E-mail :

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Veteriner Fakültesi	Yüzüncü Yıl Üniversitesi	2000
Yüksek Lisans	Veteriner/ Doğum ve Jinekoloji	Yüzüncü Yıl Üniversitesi	2005
Doktora	Tıbbi Mikrobiyoloji	Mersin Üniversitesi	2017-...

Görevler :

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Veteriner Hekim	Karaman İl Tarım Müdürlüğü	2004-2009
Hayvan Sağlığı Şube Müdürü	Karaman İl Tarım Müdürlüğü	2010-2013
Veteriner Hekim Parazitoloji Laboratuvarı	Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü	2013-2020
Müdür Yardımcısı V.	Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü	2020-....

ESERLER

Makaleler

1. Van Bölgesinde Dişi Sığırlarda Genital Sistem Hastalıklarının İnsidensinin Araştırılması (2007)
- 2- Investigation of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in Cattle in Adana Province by Serological and Molecular Methods (2019)

Görev aldığı projeler

- 1- Türkiye’de Vektör Kaynaklı Önemli Viral Hayvan Hastalıklarının (Mavi dil- BT, Epizootik Hemorajik Ateş-EHD, Üç Gün Hastalığı-BEF ve AKABANE) Teşhisi, Vektörlerin Tespiti ve Erken Uyarı Sisteminin Oluşturulması Projesi’nde araştırmacı
- 2- Akdeniz Bölgesinde Yetiştiriciliği yapılan Bal Arısı (*A. Mellifera*) Kolonilerinin Gezginci Arıcılık Koşullarında Ahşap, Plastik ve Strafor Kovanlarda Yaşama, Gelişme, Verim, Hastalık ve Zararlıların

Gelişimi ve Kışlatma Üzerine Etkilerinin Araştırılması Projesi'nde araştırmacı

- 3- 'Türkiye'de Bal Arıları ve Bazı Yabani Arılarda Ölümlere Neden Olan Hastalıkların ve Toksikolojik Etkenlerin Araştırılması Projesi'nde araştırmacı

