

Shell-Vial Hücre Kültürü Yöntemi ile *Dermacentor marginatus* Türü Kenelerden *Rickettsia slovaca* İzolasyonu

Isolation of *Rickettsia slovaca* by Shell-Vial Cell Culture Method from *Dermacentor marginatus* Ticks

Bekir ÇELEBİ¹, Hülya KARADEMİRTOK², Selçuk KILIÇ²

¹ Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı, Ankara.

¹ Ministry of Health, General Directorate of Public Health, Zoonotic and Vector-borne Diseases Department, Ankara, Turkey.

² Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara.

² Ministry of Health, General Directorate of Public Health, Department of Microbiology Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

Makale Atfı: Çelebi B, Karademirtok H, Kılıç S. Shell-vial hücre kültürü yöntemi ile *Dermacentor marginatus* türü kenelerden *Rickettsia slovaca* izolasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2019;53(2):224-232.

ÖZ

Rickettsia türleri, gram negatif, küçük pleomorfik kokobasil şeklinde, zorunlu hücre içi yerleşim gösteren bakterilerdir. Bu bakterilerin çoğunluğu keneler tarafından taşınır. *Dermacentor* cinsi kenelerin taşıdığı, benekli ateş grubu içindeki *Rickettsia* türlerinden *Rickettsia slovaca* ve *Rickettsia raoultii*, kene kaynaklı lenfadenopatiye (Tickborne Lymphadenopathy-TIBOLA veya *Dermacentor*-borne necrotic erythema and lymphadenopathy- DEBONEL) neden olmaktadır. *Rickettsia* türleri zorunlu hücre içi bakteriler olduğu için hücre kültürlerinde üretilirler. Shell-vial santrifüjasyon hücre kültürü yöntemi ile hem klinik hem de kene örneklerinden *Rickettsia* türlerinin izolasyon şansı artırılmıştır. Bu çalışmada, insanlarda saptanan iki adet *Dermacentor marginatus* türü keneden, VERO hücresi kullanılarak shell-vial santrifüjasyon hücre kültürü yöntemi ile *R.slovaca* izolasyonun yapılması amaçlanmıştır. Kültür aşamasına geçmeden önce kenelerin tiplendirilmesi, dezenfeksiyonu, diseksiyonu, hemolenf testi, homojenizasyonu, DNA ekstraksiyonu ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) yöntemlerini içeren bir algoritma izlenmiştir. Stereo mikroskopta kenelerin tiplendirilmesinin takibinde iyodin-alkol dezenfeksiyonu yapılmıştır. Ekstremitelere diseksiyonu ile kenelerin hemolenfleri elde edilmiş ve *Rickettsia* pozitif serumla indirekt floresan antikor testi (IFAT) uygulanmıştır. Hemolenf içinde *Rickettsia* benzeri bakterileri içerdiği belirlenen keneler homojenize edilmiş ve bir bölümünden DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. *Rickettsia* cins spesifik PanR8 primer ve problemleri kullanılarak Rt-PCR ile kenelerde *Rickettsia* spp. PCR pozitifliği saptanmıştır. *Rickettsia* kültürü için Vero hücreleri kullanılarak shell-vial içine pasajlanan Vero hücrelerinin monolayer oluşturması beklenmiştir. *Rickettsia* yönünden hemolenf ve Rt-PCR pozitif homojenize kene örneklerinden Vero hücre kültürlerine inokülasyon yapılmış ve shell-vial santrifüjasyon yöntemi ile inokulum içinde süspansiyon olan bakterilerin hücrelere yaklaştırılmaları sağlanmıştır. Hücreler, 36°C'de %5 CO₂'li etüvde beş günlük inkübasyondan sonra kazınarak kaldırılmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonundan bir miktar lamalara fikse edildikten sonra *Rickettsia* pozitif serum kullanılarak IFAT çalışılmıştır. Floresan mikroskopta Vero hücreleri içinde floresan veren bakteriler gözlenmiştir. Bu hücre süspansiyonu, bakteri üremesini artırmak amacıyla tekrar Vero hücre kültürüne inoküle edilerek 5-7 gün inkübe edilmiştir. Üretilen bakteri süspansiyonundan

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Bekir Çelebi, Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı, Adnan Saygun Caddesi No: 55, 06100, Sıhhiye, Ankara, Türkiye.
Tel (Phone): +90 312 565 6382, E-posta (E-mail): vetbekir@yahoo.com

DNA ekstraksiyonu yapılarak *Rickettsia* türlerinin tanımlanmasında kullanılan sitrat sentez (*gltA*) ve dış membran protein A (*ompA*) gen bölgeleri konvansiyonel PCR yöntemi uygulanarak gösterilmiştir. PCR amplifikasyon ürünlerinin DNA dizi analizi yapılmıştır. DNA dizi analiz sonuçları Genbank verileri ile karşılaştırıldığında *gltA* dizi analizi accession number AY129301.1 *R.slovaca* ile *OmpA* dizi analizi, accession number KF791242.1 *R.slovaca* ile %100 benzer bulunmuştur. Ayrıca, filogenetik analizlerde izole edilen iki suşun da *R.slovaca* olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışma sonucunda, ülkemizde ilk defa *D.marginatus* türü kenelerden hücre kültürü yöntemi ile *R.slovaca* izolasyonu bildirilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Rickettsia slovaca*; *kene*; *hücre kültürü*.

ABSTRACT

Rickettsia species are gram negative, small pleomorphic coccobacilli, obligate intracellular bacteria. The majority of these bacteria are transported by the ticks. *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* are among the *Rickettsia* species in the spotted fever group and carried by *Dermacentor* species ticks, that cause tick-borne lymphadenopathy (Tickborne Lymphadenopathy-TIBOLA or Dermacentor-borne necrotic erythema and lymphadenopathy- DEBONEL). *Rickettsia* species are obligate intracellular bacteria and they can be cultivated in cell cultures. The chance of isolation of *Rickettsia* species from clinical and tick specimens has been increased by the shell-vial centrifugation cell culture method. The aim of this study was to isolate *R.slovaca* from two *Dermacentor marginatus* species ticks which were detected in humans by the use of shell-vial centrifugation cell culture method using VERO cell. Before proceeding to the culture stage, an algorithm including description, disinfection, dissection of ticks and methods of hemolymph, homogenization, DNA extraction and real-time PCR was performed. Iodine-alcohol disinfection was performed following identification of the ticks with the use of a stereo microscope. Ticks hemolymph were obtained with extremity dissection of ticks and indirect fluorescence antibody (IFA) test was performed with *Rickettsia* positive sera. Ticks identified as containing *Rickettsia* like bacteria in hemolymph were homogenized and DNA extraction was performed from homogenate of ticks. By real-time PCR, using *Rickettsia* genus-specific PanR8 primers and probes, PCR positive *Rickettsia* spp. were determined among the ticks. Vero cells that have formed monolayer in vials were used for *Rickettsia* culture. Homogenized tick samples which were positive for *Rickettsia* in hemolymph and real-time PCR methods were inoculated to cell culture vials. Suspended bacteria in the inoculum were allowed to approach the cells by the shell-vial centrifugation method. Cells were scraped after five days of incubation in 5% CO₂ at 36°C. An aliquot of the determined cell suspension was fixed to the slides and then IFA was performed using *Rickettsia* positive sera. In fluorescence microscopy examination, adhered and proliferated bacteria were observed on Vero cells. This cell suspension was again inoculated into the Vero cell cultures to increase bacterial replication and taken for 5-7 days of incubation. DNA was extracted from the suspension of the cultivated bacteria. Conventional PCR of citrate synthase (*gltA*) and outer membrane protein A (*ompA*) gene regions were used to identify *Rickettsia* species. DNA sequence analysis of PCR amplification products were determined. DNA sequence results were compared to Genbank data and found that the *gltA* sequence was 100%, similar to *R.slovaca* with accession number AY129301.1 and the *ompA* sequence was 100%, similar to *R.slovaca* with accession number KF791242.1. In addition, the two strains isolated in phylogenetic analysis were found to be *R.slovaca*. As a result, *R.slovaca* isolation from of *D.marginatus* type ticks has been reported for the first time in our country by the cell culture method.

Keywords: *Rickettsia slovaca*; *tick*; *cell culture*.

GİRİŞ

Rickettsia türleri, *Rickettsiaceae* cinsinde bulunan gram negatif, küçük pleomorfik kokobasil şeklinde bulunan zorunlu hücre içi bakterilerdir. *Rickettsia* cinsi, serolojik ve genotipik olarak benekli ateş grubu (BAG), tifüs grubu, *Rickettsia belli* ve *Rickettsia canadensis* olarak dört gruba ayrılır¹. BAG'daki *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia africa*, *Rickettsia slo-*

vaca, *Rickettsia raoultii*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia monacensis*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia conorii* Avrupa, Asya ve Afrika'da rapor edilmiş insan patojen türlerdir¹. BAG'daki *Rickettsia* türlerinin çoğunluğunda vektör kenelerdir. *Dermacentor* cinsi kenelerin taşıdığı BAG içindeki *Rickettsia* türlerinden *R.slovaca* ve *R.raoultii* kene kaynaklı lenfadenopatiye (Tickborne Lymphadenopathy-TIBOLA veya *Dermacentor*-borne necrotic erythema and lymphadenopathy- DEBONEL) neden olur². Yetişkin *Dermacentor* kenelerinin aktivitele- rine bağlı olarak TIBOLA genellikle Mart-Mayıs ve Eylül-Kasım aylarında gözlenmektedir. *Dermacentor* türü keneler genellikle saçlı bölgelere tutundukları için ilk gelişen lezyon saç arasındaki deri dokusunda eskar (tache noire) oluşur ve takiben servikal lenfadenopati gelişir. Klinik bulgular genellikle 1-2 hafta içerisinde baş ağrısı, ağrılı lenfadenopati, hafif ateş, ciltte döküntü, ısırık bölgesinde ağrılı eskar ve nadiren yüzde ödem ile kendini gösterir^{1,2}. Birçok riketsiyal enfeksiyonda makülopapüler, veziküler ve peteşiyal lezyonlar da gözlenir³.

Riketsiyal enfeksiyonların laboratuvar tanısında serolojik, moleküler ve kültür yöntemleri kullanılmaktadır. Serolojik yöntemlerden indirekt floresan antikor tekniği (IFAT) ve "enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)" en çok kullanılan yöntemlerdir⁴. Moleküler yöntemlerden polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve ardından amplifikasyon ürünlerinin DNA dizi analizi *Rickettsia* türlerinin tanımlanması ve ayırımında kullanılmaktadır. Tanımlama ve ayırımında en çok kullanılan gen bölgeleri sitrat sentez (*gltA*) ve dış membran proteinlerini (*OmpA* ve *OmpB*) kodlayan gen bölgeleridir¹. *Rickettsia* türleri zorunlu hücre içi bakteriler olduğu için üretilmelerinde hücre kültürleri, embriyonlu tavuk yumurtaları ve deney hayvanları kullanılmaktadır. İzolasyon çalışmalarında biyogüvenlik düzeyi 3 laboratuvarlar kullanılmalıdır⁴.

Bu çalışmada, shell-vial santrifügasyon hücre kültürü yöntemi ile insanlarda bulunan *Dermacentor marginatus* türü iki keneden *R.slovaca* izolasyonu ve moleküler yöntemlerle tür tayinin yapılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kene Tiplendirmesi ve Dezenfeksiyonu

İnsanlar üzerinden çıkartılan iki kene stereo mikroskop altında morfolojik özelliklerine göre değerlendirilerek tür tayini yapıldı⁵. Keneler iyodin-alkol içinde 10 dakika dezenfeksiyon için bekletildi. Alkolden çıkartılan keneler steril distile su ile birkaç kez yıkandı ve steril kurutma kağıdında kurutuldu⁶.

Hemolenf İmmün Floresan Antikor Testi

Steril bistüri ve pens yardımı ile kenelerin son ekstremitesi kesilerek kene hemolenfinin IFAT lamı üzerine bir miktar damlaması sağlandı. Lamdaki hemolenf kurutulduktan sonra asetona fikse edildi. Fikse edilmiş hemolenf, *Rickettsia* pozitif serum (1/100 dilüe) kullanılarak IFAT uygulandı. IFAT testinde elma yeşili *Rickettsia* benzeri bakteri görülmesi ile *Rickettsia* hemolenf testi pozitif kabul edildi^{6,7}.

Kene Homojenizasyonu, DNA Ekstraksiyonu ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Hemolenf testi pozitif olarak belirlenen keneler beyin kalp infüzyon buyyon içine alınarak Magnalyser homojenizasyon cihazında (Roche, Rotkreuz, İsviçre) homojenize edildi. Homojenizasyondan 100 µl alınarak doku ekstraksiyon kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapıldı.

Patojen *Rickettsia* türlerini belirlemek için Kato ve arkadaşları⁸ tarafından tanımlanmış olan ve PanR8 primer ve prob kullanılan Rt-PCR yöntemi kullanıldı. PCR, LightCycler prob master karışımı (Roche, Mannheim, Almanya) kullanılarak, LightCycler96 (Roche, Mannheim, Almanya) Rt-PCR cihazında uygulandı.

Hücre Kültürü

Rickettsia türlerinin bazılarının virülansının yüksek olması dolayısıyla kültür işlemleri bakteri süspansiyonundan DNA elde edilme aşamasına kadar Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü biyogüvenlik düzeyi 3 laboratuvarında gerçekleştirildi. PCR ve hemolenf testleri pozitif olarak saptanan örnekler hücre kültürü yapıldı. Vero (ATCC CCL-81) hücreleri penisilin ve streptomisin içeren "Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)" ve %5 fetal sıçır serum (FBS) içeren viallere pasajlandı ve monolayer oluşturması sağlandı. Monolayer oluşturulan viallere hemolenf ve PCR pozitif kene homojenizatından 100 µl inoküle edildi. İnokülumdaki bakterilerin monolayer oluşturmuş hücrelere yaklaştırmak için hücre vialleri 1 saat 700 xg'de santrifüj edildi. Bir gün süreyle 36°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Birinci gün, kültür vasatı %5 FBS içeren antibiyotiksiz DMEM ile değiştirildi ve beş gün inkübasyona bırakıldı^{6,9}. İnkübasyondan sonra enfekte hücreler kazanarak toplandı ve iyice süspanse edildi. Enfekte hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak IFAT lamalarına kaplandı, kurutulduktan sonra asetona fikse edildi ve *Rickettsia* pozitif serum kullanılarak IFAT ile hücrelerde üreme olup olmadığı kontrol edildi⁶. Üreme olan hücreler tekrar Vero hücre kültürüne inoküle edilerek çoğaltıldı. Üretilen hücreler toplandı ve parçalanarak *Rickettsia* bakteri süspansiyonu elde edildi. *Rickettsia* bakteri süspansiyonundan DNA ekstraksiyonu yapıldı ve tür tayininde kullanıldı.

Konvensiyonel Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve DNA Dizi Analizi

Rickettsia türlerinin tür düzeyinde tanımlanmasında, DNA dizi analizi öncesi *gltA* ve *ompA* gen bölgelerinin tespiti için PCR uygulandı^{10,11}. Bu amaçla, *gltA* (sitrat sentez) gen bölgesinin amplifikasyonu için Regnery ve arkadaşlarının¹¹ önerdiği RpCS.877/RpCS.1258 primerler ve protokol, *ompA* (dış membran protein A) gen bölgesinin amplifikasyonu için Roux ve arkadaşlarının¹⁰ önerdiği Rr190.70/Rr190.701 primerler ve protokol kullanıldı.

Sekans analizi için, PCR amplifikasyon ürünlerini saflaştırmada, "ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific, ABD)" kiti, prosedürlerine uyularak kullanıldı. ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılarak DNA sekansı elde edildi. DNA dizi analizi verileri "Basic Local Alignment Search Tool (Blast version 2.0)" programı kullanılarak GenBank verileri ile karşılaştırıldı.

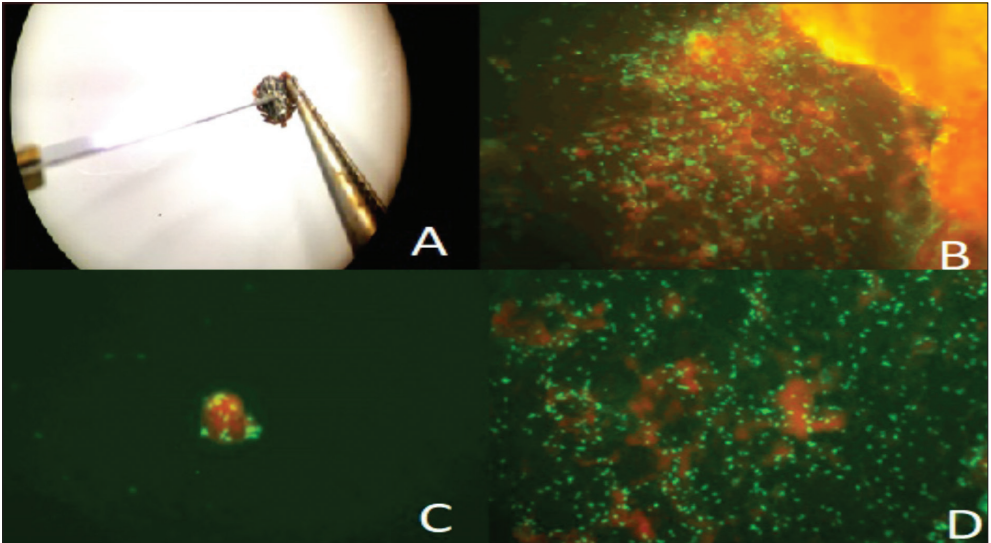
Filogenetik Analiz ve Ağaç Oluşturulması

Bu amaçla MEGA5 programından yararlanıldı. Filogenetik ağaç oluşturmak için “neighbour-joining” yöntemi, istatistiki güvenilirliği ortaya koymak için filogenetik test olarak Bootstrap yöntem, Kimura 2 parameter model uygulandı.

BULGULAR

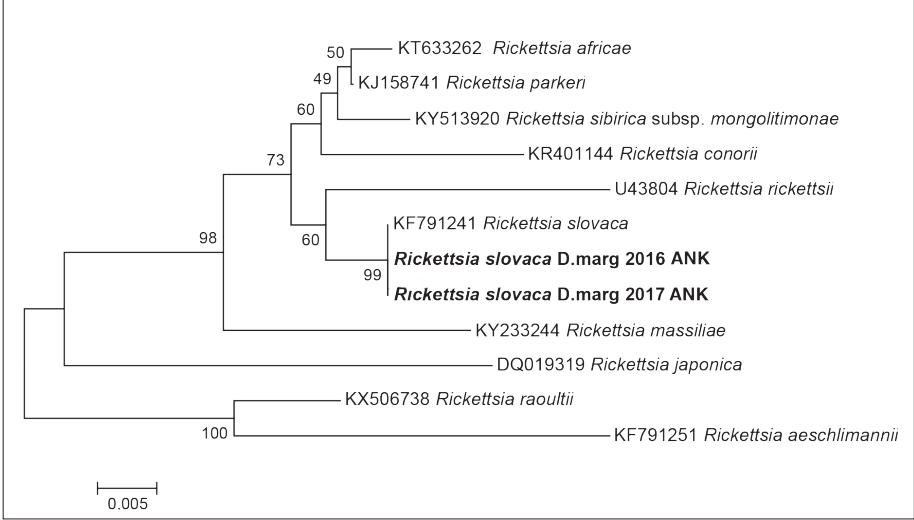
Kene tutunmuş iki bireyden çıkarılan keneler morfolojik özelliklerine göre *D.marginatus* olarak tiplendirilmiştir (Resim 1A). İki kenenin hemolenf IFA testleri yapılarak kırmızı zemin üzerinde elma yeşili renkte bakteri benzeri oluşumlar gözlenmiştir (Resim 1B). Kenelerden elde edilen DNA'larda Rt-PCR yöntemi ile *Rickettsia* spp. pozitif olarak belirlenmiştir. Hemolenf IFAT ve *Rickettsia* Rt-PCR pozitif örneklerin Vero hücre kültürlerine inokülasyonları sonrasında toplanan enfekte hücrelerin *Rickettsia* pozitif serum kullanılarak gerçekleştirilen IFAT testi sonucu, hücrelere tutunmuş ve hücreleri sarmış durumda bakteriler gözlenmiştir (Resim 1C). *Rickettsia* spp. enfekte Vero hücrelerinin parçalanması ve homojenize edilmeleri ile bakteri süspansiyonu elde edilmiştir (Resim 1D).

Bakteri süspansiyonundan yapılan DNA izolasyonu sonrası çalışılan konvansiyonel PCR ürünleri jel elektroforezinde yürütüldüğünde *gltA* bölgesi 381 baz çifti (bp), *ompA* bölgesi 630 bp büyüklüğünde gözlenmiştir. Elde edilen PCR ürünlerine uygulanan DNA dizi analizi sonuçları Genbank verileri ile karşılaştırıldığında *gltA* sekansları erişim numarası AY129301.1 *R.slovaca* ile *ompA* sekansları, erişim numarası KF791242.1 *R.slovaca* ile %100 benzer bulunmuştur. Filogenetik analiz sonrası izolatlarımızın *ompA* gen dizisi, Genbank kayıtlı tanımlanmış izolat sekans verileri de kullanılarak, MEGA5 programında

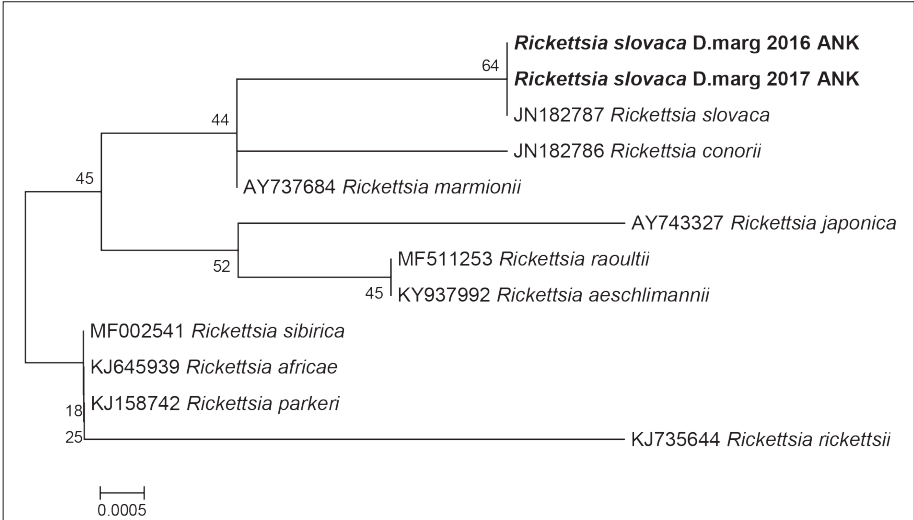


Resim 1. A. Stereo mikroskopta kene tanımlaması ve diseksiyonu. B. Hemolenf IFAT'da *Rickettsia* benzeri bakteriler. C. IFAT ile hücre kültüründe bakterilerin Vero hücrelerine tutunmasının belirlenmesi. D. Hücre kültüründe üretilmiş *Rickettsia* bakterisi süspansiyonunun IFAT'da görüntüsü.

neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik ağaçta bootstraps değeri %99 ile yüksek güvenilirlikle, erişim numarası KF791241 *R.slovaca* grubunda bulunmuştur. *gltA* gen dizisi, oluşturulan filogenetik ağaçta boorstraps değeri %64 ile zayıf güvenilirlikle erişim numarası JN182787 *R.slovaca* grubunda belirlenmiştir (Şekil 1,2).



Şekil 1. *D.marginatus* türü kenelerden izole edilen *R.slovaca* ompA geni 630 bp sekans verileri ve GenBank'ta kayıtlı diğer *Rickettsia* türlerinin ompA verileriyle MEGA5 programında neighbour-joining istatistiksel yöntem, Bootstrap yöntem, Kimura 2 parameter model ile oluşturulan filogenetik ağaç.



Şekil 2. *D.marginatus* türü kenelerden izole edilen *R.slovaca* gltA geni 380 bp sekans verileri ve GenBank'ta kayıtlı diğer *Rickettsia* türlerinin gltA verileriyle MEGA5 programında neighbour-joining istatistiksel yöntem, Bootstrap yöntem, Kimura 2 parameter model ile oluşturulan filogenetik ağaç.

TARTIŞMA

Riketsiyal enfeksiyonların laboratuvar tanısında serolojik, moleküler ve kültür yöntemleri kullanılmaktadır. Kültür işlemleri komplike olduğu ve teknik ekipman gerektirdiği için genellikle referans laboratuvarlarda yapılabilmektedir⁴. Ülkemizden ilk *Rickettsia* spp. izolasyon çalışması 2000'li yılların başında klinik örneklerden Kuloğlu ve arkadaşları¹² tarafından Fransa *Rickettsia* Referans Laboratuvarında yapılmıştır. Riketsiyal enfeksiyonların tanısında serolojik ve moleküler yöntemlerin kullanımının yaygınlaşmasına ve kolay olmasına bağlı olarak tanı ve epidemiyolojik çalışmalarda her iki yöntem kültüre göre daha çok kullanılmaktadır¹³⁻²¹. Serolojide BAG içindeki *Rickettsia* türlerinin ortak antijenik yapısına bağlı çapraz reaksiyon gözlenmesinden dolayı IFAT, tür düzeyinde bir ayırım yaparak etiyolojik etkenin belirlenmesinde yetersiz kalmaktadır^{1,3,4}. Ülkemizde klinik örneklerden ve vektör konumundaki kenelerden yapılan moleküler çalışmalarda PCR ve DNA dizi analizi uygulanmış, insanlar için patojen veya patojen olmayan türlerden *R.aeschlimannii*, *R.africa*, *R.slovaca*, *R.raoultii*, *R.monacensis*, *R.conorii*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia mongolitimonae*, *R.helvetica*, *Rickettsia felis* ve *Rickettsia hoogstraalii* bildirilmiştir^{13-18,21}. Çalışmamızda hücre kültürü yöntemi ile *D.marginatus* türü kenelerden *R.slovaca* izolasyonu yapılmıştır.

Riketsiyal enfeksiyonların tanısında kültürün duyarlılığı seroloji ve PCR'ye göre daha azdır. Kültür duyarlılığı kullanılan klinik materyale göre değişiklik göstermektedir^{4,9}. Etken mikrovasküler dokuya yerleşim göstermeye meyilli olduğu için kanda bakteri yoğunluğu düşüktür. Kandan izolasyon için enfeksiyonun erken fazında örnek alınmalıdır. Mikrovasküler dokuya yerleşime bağlı deride gelişen lezyonlardan yapılan deri biyopsi örnekleri, *Rickettsia* türlerinin hücre kültüründe üretilmelerinde kullanılan önemli klinik materyallerdendir⁹. Gelişen lenfadenopatiye bağlı alınan aspirasyon materyalleri steril şartlarda alındığında kültür materyali olarak da kullanılabilir. Kültür için klinik örnekler tercihen dondurulmamış, taze ve antibiyotik tedavisi başlamadan önce alınmalıdır. Homojenize edilmiş doku biyopsi örneklerinin shell-vial santrifüjasyon yöntemi ile hücre kültürlerine ekimleri yapılarak izolasyon ihtimalleri yükseltilebilmektedir⁹. *Rickettsia* kültüründe Vero, L929, HEL, XTC-2, veya MRC5 hücreleri ve kene hücrelerinden elde edilmiş hücre hatları kullanılabilir⁴. Bu çalışmada Vero hücre hattı kullanılmıştır. İzolasyon aşamasındaki hücre kültürü çalışmaları, kontaminasyonu ve laboratuvar kaynaklı bulaşı önlemek için biyogüvenlik düzeyi 3 laboratuvar da yapılmıştır. Belirli aşamadan sonra antibiyotiksiz vasat kullanılması ve komplike işlemlerin yapılması kontaminasyon riskini artırmaktadır. Çalışmalarda kontaminasyonu engellemek ve *Rickettsia* türlerinin bazılarının virülansının yüksek olması nedeniyle, uygulamalar biyogüvenlik düzeyi 3 laboratuvarlarında yapılmalıdır. Klinik örneklerin alınması sırasında çapraz kontaminasyona neden olmamak için aseptik/antisepsi kurallarına dikkat edilmelidir.

D.marginatus türü keneler *R.slovaca* ve *R.raoultii* için ana rezervuar olarak bildirilmektedir². Ülkemizde insanlardan çıkarılan kenelerde yapılan moleküler çalışmalarda *D.marginatus* türü kenelerin Ankara'da %65'inin, Yozgat'ta %23'ünün, Çorum'da %76'sının çoğunlukla *R.slovaca*, nadiren ise *R.raoultii* ile enfekte olduğu bildirilmiştir¹⁵⁻¹⁸. Ülkemizde kenelerde yapılan çalışmalar moleküler tabanlı *Rickettsia* türlerinin DNA'sının be-

lirlenmesine yönelik olup, etkenin izolasyonuna yönelik bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu çalışmada, ülkemizde ilk defa *Rickettsia* türlerinin vektörü konumundaki kenelerden *R.slovaca* shell-vial hücre kültürü yöntemi ile üretilerek izole edilmiştir. Ülkemizde izolasyon çalışmalarının, ulusal suşların üretilmesi, serolojik çalışmalarda kullanılması; yerel suşlardan antijen hazırlanması ve yurt dışına bağımlılığın azaltılması, yeni *Rickettsia* türlerinin belirlenmesi, bir sonraki çalışmalarda araştırmacılar için lokal bir suş olarak kullanılması açısından faydalı olacağı düşünülmektedir.

Shell-vial hücre kültür yöntemi, *Bartonella* spp., *Coxiella burnetti*, *Rickettsia* spp., *Francisella tularensis* gibi geç ve güç üretilen bakterilerin izolasyonunda uluslararası referans laboratuvarlarında etkin olarak kullanılan bir yöntemdir⁹. *Bartonella* spp. ve *F.tularensis* izolasyonuna yönelik çalışmalarda agar tabanlı besiyerleri kullanılabilmesine karşın, insan kanından izolasyonlarında shell-vial hücre kültürü önerilmektedir⁹. *C.burnetti* ve *Rickettsia* türlerinin izolasyonunda, deney hayvanına inokülasyon kullanılan ilk yöntemlerden biri olmasına karşılık, shell-vial hücre kültürü yöntemi önerilen en önemli yöntemlerden biridir⁹. Bu çalışmada, ülkemizde izolasyonları yapılamayan bakteriyel etkenler için kullanılacak bir yöntem olarak değerlendirdiğimiz shell-vial hücre kültürü yöntemi uygulanarak kenelerden *Rickettsia* spp. izolasyonuna yönelik bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışma, ülkemizde shell-vial hücre kültürü yöntemi ile yapılabilecek sonraki çalışmalar için farkındalık yaratacaktır.

Bu çalışmada, *Rickettsia* türlerinin moleküler tanımlanmasında en çok kullanılan iki gen bölgesi olan *ompA* (630 bp) ve *gltA* (380 bp) gen bölgeleri kullanılmıştır³. Bu bölgelerin sekans verilerinden filogenetik ağaç oluştururken, birbirlerine genetik uzaklığı en az olan türler birleştirilerek oluşturulan uzaklık tabanlı filogenetik ağaç yöntemi olan neighbour-joining yönteminden yararlanılmıştır. Filogenetik ağaç güvenilirliğini değerlendirmek için bootstraps yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan 380 bp *gltA* gen bölgesi *Rickettsia* cinsi için özgül bölgedir fakat cins içinde yer alan türler arasında bu bölgede nükleotid farklılıkları çok fazla olmadığı için tür ayrımı amaçlı oluşturulan filogenetik ağacın güvenilirliği zayıf çıkmaktadır. Tür ayrımında *gltA* (380 bp) gen bölgesinin, güvenilirliği yüksek *ompA* gen bölgesi ile birlikte kullanılması veya *gltA* geninde nükleotid farklılığının daha fazla gözlenebileceği uzun bir bölgenin kullanılması faydalı olacaktır.

Mevcut veriler ışığında ülkemizde *Dermacentor* türü keneler insan patojen *Rickettsia* türlerini yüksek oranda taşımaktadır. *Dermacentor* türü kenelerin doğada aktivasyonları genellikle ilkbahar ve sonbahar aylarında olmaktadır². Genellikle insanlarda saçlı deriye (baş bölgesine) tutunmakta, bu nedenle kenelerin belirlenmesi çoğunlukla gözden kaçabilmektedir. Buna bağlı nedeni bilinmeyen servikal lenfadenopatiler ve gribal enfeksiyon semptomlarına benzer semptomlar gelişebilir. Bu durumlarda saçlı deride eskar (tache noire) varlığı kontrol edilmelidir. İlkbahar ve sonbahar aylarında saçlı deri bölgesine kene tutulumu olaylarında TIBOLA veya DEBONEL gelişiminin olabileceği akılda bulundurulmalıdır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev* 2013;26(4):657-702.
2. Silva-Pinto A, Santos ML, Sarmento A. Tick-borne lymphadenopathy, an emerging disease. *Ticks Tick Borne Dis* 2014;5(6):656-9.
3. Chapman AS, Tickborne Rickettsial Diseases Working Group. 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. CDC. *MMWR* 2006;31:55(RR-4):1-27.
4. Biggs HM, Behravesh CB, Bradley KK, Dahlgren FS, Drexler NA, Dumler JS, et al. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: rocky mountain spotted fever and other spotted fever group rickettsioses, ehrlichioses, and anaplasmosis United States. *CDC-MMWR* 2016/65(2):1-44.
5. Estrada-Peña A, Mihalca AD, Petney TN (eds). *Ticks of Europe and North Africa A Guide to Species Identification*. 2017, 1st ed. Cham, Switzerland.
6. Peter O, Raoult D, Gilot B. Isolation by a sensitive centrifugation cell culture system of 52 strains of spotted fever group rickettsiae from ticks collected in France. *J Clin Microbiol* 1990;28(7):1597-9.
7. Burgdorfer W. The hemolymph test. *Am J Trop Med Hyg* 1970;19:1010-4.
8. Kato CY, Chung IH, Robinson LK, Austin AL, Dasch GA, Massunga RF. Assessment of real-time PCR assay for detection of *Rickettsia* spp. and *Rickettsia rickettsii* in banked clinical samples. *J Clin Microbiol* 2013;51(1):314-7.
9. Gouriet F, Fenollar F, Patrice JY, Drancourt M, Raoult D. Use of shell-vial cell culture assay for isolation of bacteria from clinical specimens: 13 years of experience. *J Clin Microbiol* 2005;43(10):4993-5002.
10. Roux V, Fournier PE, Raoult D. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. *J Clin Microbiol* 1996;34(9):2058-65.
11. Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol* 1991;173(5):1576-89.
12. Kuloglu F, Rolain JM, Fournier PE, Akata F, Tugrul M, Raoult D. First isolation of *Rickettsia conorii* from humans in the Trakya (European) region of Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23(8):609-14.
13. Gargili A, Palomar AM, Midilli K, Portillo A, Kar S, Oteo JA. *Rickettsia* species in ticks removed from humans in Istanbul, Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012;12(11):938-41.
14. Bursalı A, Keskin A, Keskin A, Köprülü T, Tekin Ş. Çorum yöresinde insanlar üzerinde parazitlenen kenelerde riketsiya varlığının araştırılması. *Türk Hij ve Deney Biyo Derg* 2017;74(4):293-8.
15. Keskin A, Bursalı A, Keskin A, Tekin S. Molecular detection of spotted fever group *Rickettsiae* in ticks removed from humans in Turkey. *Ticks and Tick-borne Dis* 2016;7(5):951-3.
16. Orkun O, Karaer Z, Cakmak A, Nalbantoğlu S. Spotted fever group *Rickettsiae* in ticks in Turkey. *Ticks and Tick-borne Dis* 2014;5(2):213-8.
17. Orkun Ö, Karaer Z, Çakmak A, Nalbantoğlu S. Identification of tick-borne Pathogens in Ticks Feeding on Humans in Turkey. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;7;8(8):e3067
18. Karasartova D, Gureser AS, Gokce T, Celebi B, Yapar D, Keskin A, et al. Bacterial and protozoal pathogens found in ticks collected from humans in Corum province of Turkey. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12(4):e0006395.
19. Güneş T, Poyraz Ö, Ataş M, Turgut NH. The seroprevalence of *Rickettsia conorii* in humans living in villages of Tokat Province in Turkey, where Crimean-Congo hemorrhagic fever virus is endemic, and epidemiological similarities of both infectious agents. *Turk J Med Sci* 2012;42(3):441-8.
20. Öztoprak N, Çelebi G, Aydemir H, Pişkin N, Bektaş S, Koca R, Kuloğlu F. Köpek kenesi ile temas sonrasında gelişen Akdeniz benekli ateşi. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42(4):701-6.
21. Kuscu F, Orkun O, Ulu A, Kurtaran B, Komur S, Inal AS, et al. *Rickettsia sibirica mongolitimonae* infection, Turkey, 2016. *Emerg Infect Dis* 2017;23(7):1214-6.