

# Türkiye’de Yayılış Gösteren Bazı İxodid Kene Türlerinin *16S rDNA* Filogenisi Temelli Moleküler Karakterizasyonu

Molecular Characterization Based on *16S rDNA* Phylogeny of Some Ixodid Ticks in Turkey

Ömer Orkun 

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

**Cite this article as:** Orkun Ö. Molecular Characterization Based on 16S rDNA Phylogeny of Some Ixodid Ticks in Turkey. Türkiye Parazit Derg 2018; 42: 122-9.

## Öz

**Amaç:** Türkiye’deki kene türlerine ait genetik veriler kısıtlıdır ve belirli bir kaç kene türüne veya grubuna aittir. Bundan dolayı bu çalışmada Türkiye’de yayılış gösteren bazı ixodid kene türlerinin *16S rDNA* filogeni temelli moleküler karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

**Yöntemler:** Bu çalışmada, Türkiye’de yerleşik doğal kolonileri bulunan 17 ixodid kene türüne ait birer izolatin parsiyel *16S rDNA* bölgelerinin moleküler karakterizasyonları yapılmış ve ilgili gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri belirlenmiştir.

**Bulgular:** Çalışma ile *16S rDNA* gen bölgesi karakterizasyonu yapılan kene türlerine ait izolatların Dünya’daki homolog izolatlarla filogenetik ilişkileri ortaya konmuştur. *Ixodes laguri* türünün ilk defa *16S rDNA* verisi elde edilmiş ve filogenetik yerleşimi gösterilmiştir. Ayrıca, genetik olarak hakkında sınırlı veri bulunan *Haemaphysalis inermis*, *Ha. parva* ve *Ha. sulcata* türlerine ait orijinal veriler elde edilmiş ve kayıt altına alınmıştır. Bunların yanında, Türkiye’de günümüze kadar üzerine moleküler karakterizasyon verisi bulunmayan *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus*, *Hyalomma anatolicum*, *H. detritum*, *Ha. inermis*, *Ha. parva*, *Ha. punctata*, *Ha. sulcata* ve *I. laguri* türlerine ait genetik veriler bu araştırma ile ilk defa kayıt altına alınmıştır.

**Sonuç:** Bu çalışma ile Türkiye’de yayılış gösteren 17 ixodid kene türüne ait nesillerin *16S rDNA* gen bölgesine göre moleküler filogenetik karakterizasyonu yapılmış olup elde edilen çıktılar dünyada ilgili kene türleri üzerine mevcut genetik bilgiye önemli katkıda bulunmuştur.

**Anahtar Sözcükler:** Kene, *16S rDNA*, moleküler karakterizasyon, Ixodidae, Türkiye

**Geliş Tarihi:** 05.02.2018

**Kabul Tarihi:** 23.03.2018

## ABSTRACT

**Objective:** The genetic data related to Turkish ticks is limited. Therefore, this study was aimed to perform of the molecular characterization based on *16S rDNA* gene region of some ixodid tick species in Turkey.

**Methods:** The molecular characterizations of partial *16S rDNA* gene region belonging to 17 individual ixodid tick species in Turkey have been made and their phylogenetic relationships based on the relevant gene region have been analysed.

**Results:** The *16S rDNA* phylogenetic relationships between the isolates obtained from this study and the homolog isolates have been revealed. The *16S rDNA* data belonging to *Ixodes laguri* has been obtained for the first time and its phylogenetic location has been demonstrated. Original genetic data related to *Haemaphysalis inermis*, *Ha. parva* and *Ha. sulcata*, which have a limited number of genetic information, has been obtained. Besides, the new genetic data belonging to *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus*, *Hyalomma anatolicum*, *H. detritum*, *Ha. inermis*, *Ha. parva*, *Ha. punctata*, *Ha. sulcata* and *I. laguri* has been recorded for the first time from Turkey.

**Conclusion:** The molecular phylogenetic characterization based on *16S rDNA* gene region of 17 ixodid tick species in Turkey has been performed. The obtained data has made a significant contribution to the genetic knowledge of the mentioned ticks species.

**Keywords:** Tick, *16S rDNA*, molecular characterization, Ixodidae, Turkey

**Received:** 05.02.2018

**Accepted:** 23.03.2018

## GİRİŞ

Omurgalıların ektoparaziti olan keneler, zorunlu kan emici artropodlardır. Keneler dünyanın bütün karasal bölgelerinde yaşamlarını sürdürürler ve bu bölgedeki hayvan ve insanlardan kan emerek beslenirler (1, 2). Keneler konaklarından kan emerek direkt olarak zarar verdiği gibi aynı zamanda birçok bakteriyel, viral ve protozoon etkenin naklinde de rol oynayarak insan ve hayvanlara indirekt olarak zarar verirler (1, 3). Kene-kaynaklı hastalıklar bir yandan önemli bir halk sağlığı

tehdidi oluştururken, diğer yandan da özellikle çiftlik hayvanlarında hastalığa ve hatta ölümlere sebep olarak ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadırlar (4, 5). Keneler dünyadaki hayvan sağlığı bakımından en önemli hastalık vektörü ve halk sağlığında ise sivrisineklerden sonra 2. önemli vektör olarak tanımlanırlar (3).

Kene-kaynaklı hastalıkların önemi dolayısıyla kenelerin önemi tüm dünyada giderek artmaktadır (6). Bu hastalıklardan bazıları ülkemizde de yaygın olarak görülmektedir (7). Keneler

**Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Ömer Orkun E.posta: omerorkun@yahoo.com.tr

DOI: 10.5152/tpd.2018.5882

©Telif hakkı 2018 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.turkiyeparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2018 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.turkiyeparazitolog.org

hastalık yapan mikroorganizmaların naklinde sadece vektörlük rolü üstlenmezler, aynı zamanda da rezervuardırlar. Bundan dolayı kene kaynaklı hastalıkların dağılımı vektör keneler tarafından belirlenmektedir. Dolayısıyla kenelerle ilgili ayrıntılı epidemiyolojik, ekolojik, biyolojik ve moleküler genetik çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Son yıllarda giderek artan kene-kaynaklı salgınlar bu durumun ne kadar önemli olduğunun göstergesidir (6, 8). Bu salgınlara en iyi örneklerden bir tanesi de 2002 yılında Türkiye'nin kuzeyinde başlayan Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi epidemisi. Bu yıldan sonra hastalık diğer bölgelere yayılmış ve insan vakaları da giderek artmıştır (9, 10). Halen de bölgedeki kenelerde virüs tespit edilmekte (11) ve maalesef her yıl insan vakaları ve ölümler devam etmektedir (12). Benzer bir durum ülkemizdeki hayvanlarda hastalık meydana getiren ve özellikle çiftlik hayvanlarında mortaliteye ve ekonomik kayıplara sebep olan theilariosis, babesiosis ve anaplasmosis gibi kene-kaynaklı hastalıklarda da söz konusudur (7). Bu açıdan Türkiye için de bir hayli öneme sahip olan keneler üzerine detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Keneler hakkında yapılan ilk çalışmalardan bu yana taksonomisinde uzun yıllar sadece morfolojik özellikler kullanılmıştır. Ancak son yıllarda gelişen moleküler yöntemlerin sayesinde birçok kene türü moleküler olarak karakterize edilmiş ve bazı türlerin taksonomisindeki muğlak noktalar aydınlatılmıştır (13). Kenelerin moleküler genetik özellikleri Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PZR) keşfi ve sekans analizlerinin yaygınlaşmasından sonra ortaya çıkmış ve ilk moleküler filogenetik veriler elde edilmeye başlanmıştır (14). Bu tip çalışmalar ilerleyen yıllarda giderek artmış ve kene taksonomisine, genetiğine, moleküler biyolojisine ve epidemiyolojisine önemli katkılar sağlamıştır (15). Bu sayede yeni kene türlerinin varlığı ortaya çıkmış ve hatta soy bazında değişiklikler olmuştur. Örneğin, önceleri morfolojik olarak soy şeklinde tanımlanan *Boophilus* soyu yapılan filogenetik analizler sonucunda ayrı bir soy

olmadığı anlaşılmış ve *Rhipicephalus* soyunun içerisine dahil edilmiştir (16). Diğer yandan günümüzde yeni kene türü tanımlama çalışmalarında morfolojik ve genetik verilerin bir arada kullanılması yapılmaktadır (17). Ayrıca ülkeler bazındaki kene türlerine ait ilk bildirimler de her iki metot kullanılarak yapılmaktadır (18). Bu durum kene taksonomisinde sağlam temelli verilerin yer alması ve doğru epidemiyolojik verilerin elde edilmesini sağlamaktadır.

Türkiye'de bugüne kadar var olan kene türlerinin moleküler karakterizasyonu üzerine çok az veri bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde *Ixodes ricinus* (19), *I. arboricola* (20), *I. kaiseri* (18), *Dermacentor marginatus* (21) ve soy/genogrup/kompleks bazında *Haemaphysalis erinacei* (22), *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ve *Rh. bursa* (23), *Hyalomma* soyundaki bazı türler (*H. aegyptium*, *H. asiaticum*, *H. excavatum*, *H. marginatum*) ve *I. ricinus* (24) nesillerine ait parsiyel gen bölgeleri üzerine verilerin bulunduğu görülmektedir. Bu çalışmada ise, Türkiye'nin bazı bölgelerinde yerleşik doğal kolonileri bulunan 17 ixodid kene türüne ait birer neslin parsiyel 16S rDNA gen bölgesine göre filogenetik karakterizasyonu yapılmıştır.

## YÖNTEMLER

### Morfolojik Analizler

Bu çalışmada, farklı zaman dilimlerinde Ankara, Bolu ve Kırşehir yörelerinden toplanmış ve moleküler analizler açısından uygun koşullarda (%70 alkol içerisinde -20°C'de) muhafaza edilmiş ixodid kene örneklerinden 17 türe ait birer nesil materyal olarak kullanılmıştır. İncelenen kene nesillerine ait bilgiler Tablo 1'de sunulmuştur. Öncelikle Zeiss (Stemi 2000-C, Zeiss, Almanya) marka stereo mikroskop (üzerine montajlanmış AxioCam dijital kamera ve ZEN yazılımı ile birlikte) altında kenelerin morfolojik tür tayinleri yapılmıştır. Tür tayinleri morfolojik kriterlere göre ya-

**Tablo 1.** Çalışmada incelenen kene örneklerine ait bilgiler

Kene türü	Gelişim evresi/cinsiyet	Kaynak/konak	Lokasyon
<i>Hyalomma marginatum</i>	Erişkin/Erkek	Aç (Konak arayan)	Çubuk/Ankara
<i>Hyalomma excavatum</i>	Erişkin/Erkek	Aç (Konak arayan)	Polatlı/Ankara
<i>Hyalomma aegyptium</i>	Erişkin/Dişi	Aç (Konak arayan)	Mucur/Kırşehir
<i>Hyalomma detritum</i>	Erişkin/Erkek	Sığır	Kızılcahamam/Ankara
<i>Hyalomma anatolicum</i>	Erişkin/Erkek	Sığır	Kalecik/Ankara
<i>Dermacentor marginatus</i>	Erişkin/Dişi	Aç (Konak arayan)	Kızılcahamam/Ankara
<i>Dermacentor reticulatus</i>	Erişkin/Erkek	Aç (Konak arayan)	Kızılcahamam/Ankara
<i>Haemaphysalis parva</i>	Erişkin/Erkek	Aç (Konak arayan)	Ayaş/Ankara
<i>Haemaphysalis punctata</i>	Erişkin/Erkek	Aç (Konak arayan)	Kızılcahamam/Ankara
<i>Haemaphysalis sulcata</i>	Erişkin/Erkek	Aç (Konak arayan)	Akyurt/Ankara
<i>Haemaphysalis erinacei</i>	Erişkin/Dişi	Kirpi	Çubuk/Ankara
<i>Haemaphysalis inermis</i>	Erişkin/Dişi	Aç (Konak arayan)	Gerede/Bolu
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Erişkin/Erkek	Köpek	Merkez/Ankara
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	Erişkin/Erkek	Aç (Konak arayan)	Kızılcahamam/Ankara
<i>Rhipicephalus bursa</i>	Erişkin/Dişi	Aç (Konak arayan)	Nallıhan/Ankara
<i>Ixodes ricinus</i>	Erişkin/Dişi	Aç (Konak arayan)	Mengen/Bolu
<i>Ixodes laguri</i>	Erişkin/Dişi	Anadolu Yer Sincabı	Mucur/Kırşehir

**Tablo 2.** Sekanslanan kene örneklerine ait GenBank'taki nükleotid benzerlikleri

Sekanslanan kene türü <sup>a</sup>	Sekanslanan gen bölgesi	Nükleotid benzerliği (%) <sup>b</sup>	Eşleşen kene türü (aksesyon numarası) <sup>c</sup>	GenBank aksesyon numarası <sup>d</sup>
<i>Hyalomma marginatum</i>	16S rDNA	99.7	<i>H. marginatum</i> isolate Hymr1 (KT391060)	KR870973
<i>Hyalomma excavatum</i>	16S rDNA	99.7	<i>H. excavatum</i> isolate TRY17 (MG418672)	KR870972
<i>Hyalomma aegyptium</i>	16S rDNA	100	<i>H. aegyptium</i> isolate Haegy2 (KU130408)	KR870970
<i>Hyalomma detritum</i>	16S rDNA	98.6	<i>H. detritum</i> isolate XJ142 (KC203346)	KR870974
<i>Hyalomma anatolicum</i>	16S rDNA	99.7	<i>H. anatolicum</i> isolate Izatnagar LHa (HM176656)	KR870971
<i>Dermacentor marginatus</i>	16S rDNA	100	<i>D. marginatus</i> isolate WQ-DM12 (KX555654)	KR870968
<i>Dermacentor reticulatus</i>	16S rDNA	99.7	<i>D. reticulatus</i> isolate Z0015 (JF928493)	KR870969
<i>Haemaphysalis parva</i>	16S rDNA	92.2 <sup>e</sup>	<i>Ha. sulcata</i> (KX576650)	KR870977
<i>Haemaphysalis punctata</i>	16S rDNA	100	<i>Ha. punctata</i> isolate Xinjiang-CBCE2 (MF002566)	KR870978
<i>Haemaphysalis sulcata</i>	16S rDNA	99.5	<i>Ha. cretica</i> <sup>f</sup> (L34308)	KR870979
<i>Haemaphysalis erinacei</i>	16S rDNA	99.7	<i>Ha. erinacei</i> isolate Tokat (KX901845)	KR870975
<i>Haemaphysalis inermis</i>	16S rDNA	99.3	<i>Ha. inermis</i> (U95872)	KR870976
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	16S rDNA	99.5	<i>Rh. sanguineus</i> isolate Alexandria-2 (KY945493)	KR870984
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	16S rDNA	99.3	<i>Rh. turanicus</i> isolate Tivat (KX793721)	KR870985
<i>Rhipicephalus bursa</i>	16S rDNA	99.5	<i>Rh. bursa</i> (KX553962)	KR870983
<i>Ixodes ricinus</i>	16S rDNA	99.7	<i>I. ricinus</i> (L34292)	KR870982
<i>Ixodes laguri</i>	16S rDNA	94.1 <sup>g</sup>	<i>I. ricinus</i> (L34292)	KR870981

<sup>a</sup>Morfolojik olarak tanımlanmış kene türleri. <sup>b</sup>Elde edilen kene sekans verileri ile GenBank'ta kayıtlı sekansların BLAST analizi sonucu nükleotid benzerlikleri. <sup>c</sup>BLAST analizi sonucu eşleşen en benzer sekansa ait veriler. <sup>d</sup>Bu çalışmada elde edilen nükleotid sekanslarına ait GenBank aksesyon numaraları. <sup>e</sup>BLAST analizi sonucunda GenBank'ta kayıtlı herhangi bir kene türü ile anlamlı bir benzerlik tespit edilememiştir. <sup>f</sup>*Haemaphysalis cretica* ismi *Haemaphysalis sulcata*'nın sinonimidir (Guglielmone ve ark., 2014). <sup>g</sup>Bu kene türüne ait GenBank'ta 16S rDNA kaydı bulunmamaktadır.

pılmış ve Hoogstraal, 1956 (25), Arthur, 1965 (26), Filippova, 1977 (27), Filippova, 1997 (28), Walker ve ark., 2000 (29), Apanaskevich, 2003 (30), Estrada-Pena ve ark., 2004 (31), Apanaskevich ve Horak, 2005 (32) ve Apanaskevich ve Horak, 2008 (33)'de belirtilen teşhis anahtarlarından yararlanılmıştır. Morfolojik olarak tanımlanmış kene türlerinden birer örnek seçilerek moleküler işlemler yapılmaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

#### DNA Ekstraksiyonu ve PZR

Her bir kene örneğinden bireysel olarak DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Bunun için ilk önce örnekler %70'lik etil alkolde yıkanmış, steril su ile kurulanmış ve steril filtre kağıdının üzerinde kurutulmuştur. DNA ekstraksiyonundan önce keneler SpeedMill PLUS (Analytikjena, Jena, Almanya) soğutmalı homojenizatörde homojenize edilmiştir. Sonraki basamakta DNA ekstraksiyonu için her bir tüpteki süpernatant alınmış ve yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Süpernatantlardan blackPREP Tick DNA/RNA (Analytikjena) kiti kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre DNA'lar izole edilmiştir. Elde edilen DNA'lar PZR yapılmaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

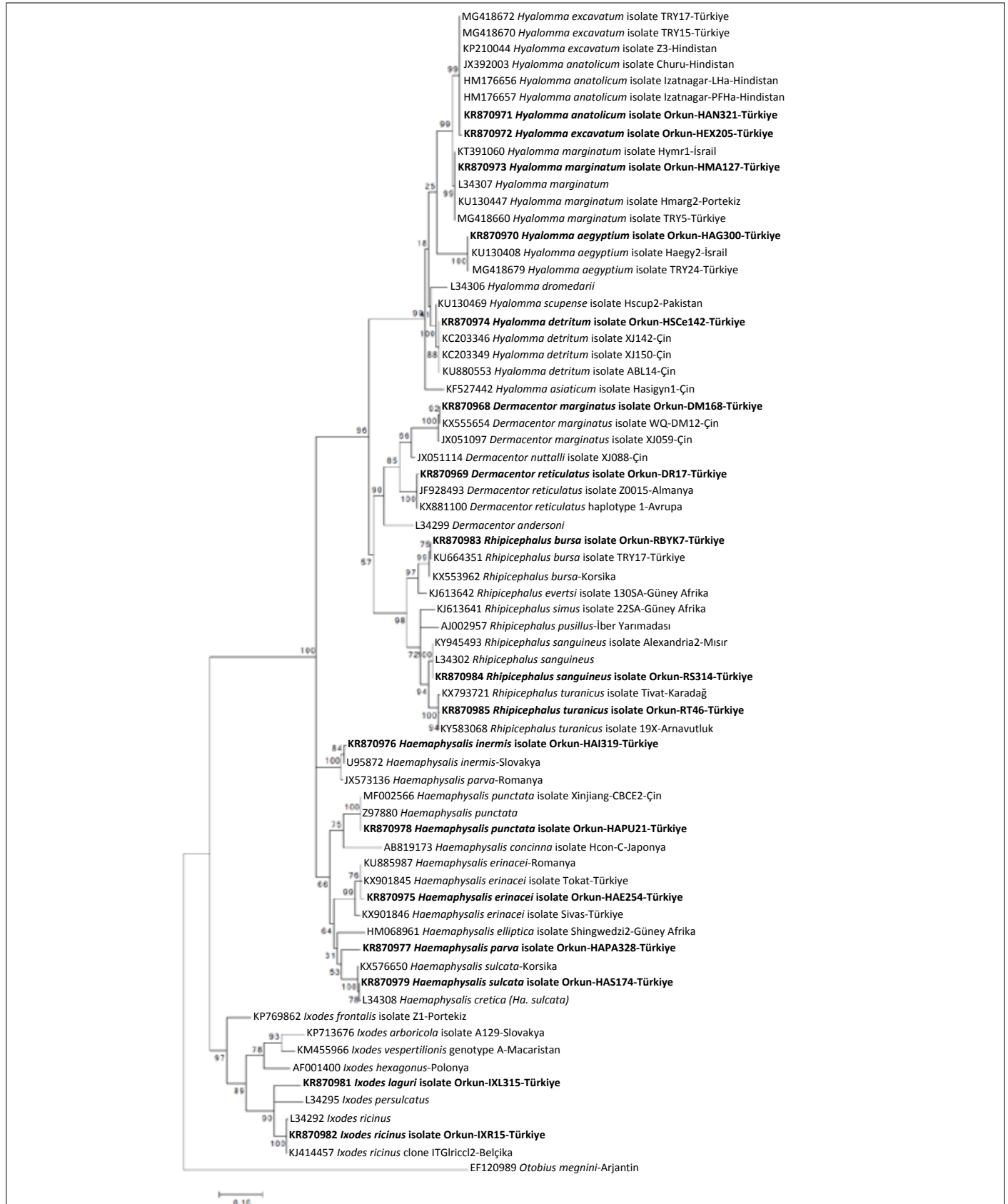
Genetik analiz için 16S+1 (5'-CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG-3') ve 16S-1 (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT-3') primerleri kullanılarak ixodid kenelerin 16S ribozomal DNA (16S rDNA) bölgesinin yaklaşık 460 baz çifti (basepair = bp) uzunluğunda fragmentini amplifiye eden PZR protokolü uygulanmıştır (14). PZR toplam 30 µl'lik hacimde yapılmıştır. Her reaksiyonda 3 µl genomik DNA, 0.2 mM dNTP, her bir primerden 0.2 mM, 3

mM MgCl<sub>2</sub>, son konsantrasyonda 1X olacak şekilde PCR buffer ve 1 ünite Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Sao Paulo, Brezilya) kullanılmıştır. Termal profil; 94°C'de 2 dk. enzim aktivasyon basamağı ve takiben 40 siklus 94°C'de 30 sn., 60°C'de 30 sn., 72°C'de 45 sn. olarak ayarlanmıştır. Son ekstensiyon basamağı ise 72°C'de 10 dk. olarak belirlenmiştir. PZR reaksiyonu TProfessional Termal cyclerde (Biometra, Analytikjena) gerçekleştirilmiştir. Her bir reaksiyonda DNase-RNase içermeyen saf su negatif kontrol olarak kullanılmıştır. PZR ürünlerinden 10 µl alınarak %1,5'lik agoroz jelde yürütülmüş UV altında uygun büyüklükteki spesifik bantların varlığı kontrol edilmiştir.

#### Sekans ve Filogenetik Analiz

PZR ürünleri QIAquick® Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanarak agaroz jelden pürifiye edilmiştir. Sekans analizleri PZR primerleri kullanılarak çift yönlü olarak yapılmıştır. Sekans ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, California) ile üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Sekansı yapılan ürünler ise DyeEx 2.0 Nucleospin nucleotide removal kit (Qiagen) kullanılarak temizlenmiştir. Otomatize floresan sekansı ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) ile yapılmıştır.

Sekans kromatogramları BioEdit yazılımı (34) kullanılarak kontrol edilmiş ve düzenlenmiştir. İzolatlara ait son konsensüs dizimleri GenBank veri tabanında "nucleotide BLAST" (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) analizine tabii tutulmuş ve farklı ülkelerden rapor edilmiş izolat-



**Şekil 1.** Filogenetik ağaç 69 kenenin mitokondrial 16S rDNA parsiyel gen sekansları kullanılarak meydana getirilmiştir. Maximum likelihood temelli filogenetik ağaç GTR+I+G substitution model kullanılarak oluşturulmuştur. Sekansların GenBank aksesyon numaraları kenelerin türü isimlerinden önce ve lokasyonları sonra verilmiştir. Bu çalışmada elde edilen izolatların isimleri kalın fontta belirtilmiştir

larla benzerlik oranları kıyaslanmıştır. 16S rDNA filogenetik analiz veri seti toplam 69 izolata ait nükleotid sekanslarından oluşturulmuştur. *O. megnini* "dış grup" olarak kullanılmıştır. Filogenetik analiz için 384 bp.'lik bir kısımdan yararlanılmıştır. 16S rDNA veri setine en uygun evrimsel analiz modelini belirlemek için jModel-test versiyon 0.0.1 (35) yazılımı kullanılmıştır. Akaike Information Criterion (AIC) kullanılarak en uygun model olan general-time reversible modeli (GTR+I+G) seçilmiştir. Filogenetik analizler ve ağaç oluşturulması MEGA 7.0 (36) yazılımında "maximum likelihood" metodu kullanılarak 1000 tekrarlı bootstrap ile yapılmıştır. Çalışmada elde edilen nükleotid sekansları GenBank'a ilgili aksesyon numaraları (Tablo 2 ve Şekil 1) altında depolanmıştır.

## BULGULAR

Morfolojik identifikasyonla *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *H. aegyptium*, *H. anatolicum*, *H. detritum*, *H. excavatum*, *H. marginatum*, *Ha. erinacei*, *Ha. inermis*, *Ha. parva*, *Ha. punctata*, *Ha. sulcata*, *I. laguri*, *I. ricinus*, *Rh. bursa*, *Rh. sanguineus* ve *Rh. turanicus* olarak tanımlanan toplamda 17 kene türünden birer nesle ait genomik DNA izolatlarının parsiyel 16S rDNA gen bölgesi PCR analizleri başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve tüm PCR ürünleri sekanslanmıştır.

Bu çalışmada morfolojik olarak tanımlanan Türkiye'nin kene türlerine ait 16S rDNA nükleotid sekanslarının GenBank veri tabanında yapılan BLAST analizleri sonucunda; *D. marginatus* türünün Çin'in Xinjiang bölgesindeki bir koyundan elde edilmiş *D. marginatus* isolate WQ-DM12 (aksesyon nu. KX555654) ile %100 identik olduğu; *D. reticulatus* türünün Almanya'daki laboratuvar kolonisinde bulunan *D. reticulatus* isolate Z0015 (aksesyon nu. JF928493) ile %97,7 oranında nükleotid benzerliği gösterdiği; *H. aegyptium* türünün İsrail'deki bir *H. aegyptium* isolate Haegy2 (aksesyon nu. KU130408) ile %100 identik olduğu; *H. anatolicum* türünün Hindistan'daki laboratuvar kolonisinde bulunan *H. anatolicum* isolate IzatnagarLHa (aksesyon nu. HM176656) ile %99,7 oranında benzerlik gösterdiği; *H. detritum* türünün Çin'in Xinjiang bölgesindeki bir *H. detritum* isolate XJ142 (aksesyon nu. KC203346) ile %98,6 oranında benzerlik gösterdiği; *H. excavatum* türünün Türkiye'den elde edilmiş bir *H. excavatum* isolate TRY17 (aksesyon nu. MG418672) ile %99,7 oranında benzerlik gösterdiği; *H. marginatum* türünün İsrail'deki bir *H. marginatum* isolate Hymr1 (aksesyon nu. KT391060) ile %99,7 oranında benzerlik gösterdiği; *Ha. erinacei* türünün Türkiye'de insandan toplanmış bir *Ha. erinacei* isolate Tokat (KX901845) ile %99,7 oranında benzerlik gösterdiği; *Ha. inermis* türünün Slovakya'daki bir *Ha. inermis* (aksesyon nu. U95872) ile %99,3 oranında benzerlik gösterdiği; *Ha. parva* türünün GenBank veri tabanında herhangi bir kene sekansı ile anlamlı (tür bazında) benzerliği bulunmadığı ve en yakın olarak bir *Ha. sulcata* (aksesyon nu. KX576650) ile %92,2 oranında nükleotid benzerliğine sahip olduğu; *Ha. punctata* türünün Çin'deki bir koyundan elde edilmiş *Ha. punctata* isolate Xinjiang-CBCE2 (aksesyon nu. MF002566) ile %100 identik olduğu; *Ha. sulcata* türünün GenBank veri tabanındaki bir *Ha. cretica* (bu isim *Ha. sulcata*'nın sinonimidir) (aksesyon nu. L34308) ile %99,5 oranında benzerlik gösterdiği; *I. laguri* türünün GenBank veri tabanında herhangi bir kene sekansı ile anlamlı (tür bazında) benzerliği bulunmadığı ve en yakın olarak bir *I. ricinus* (aksesyon nu. JN248424) ile %94,1 oranında nükleotid benzerliğine sahip olduğu; *I. ricinus* türünün GenBank'daki bir *I. ricinus*

(aksesyon nu. L34292) ile %99,7 oranında benzerlik gösterdiği; *Rh. bursa* türünün Korsika'daki bir *Rh. bursa* (aksesyon nu. KX553962) ile %99,5 oranında benzerlik gösterdiği; *Rh. sanguineus* türünün Mısır'daki bir koyundan elde edilen bir *Rh. sanguineus* isolate Alexandria-2 (aksesyon nu. KY945493) ile %99,5 oranında benzerlik gösterdiği; *Rh. turanicus* türünün ise Karadağ'daki bir *Rh. turanicus* isolate Tivat (aksesyon nu. KX793721) ile %99,7 oranında nükleotid benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir.

Moleküler analize tabi tutulan kene türlerine ait nükleotid benzerlik yüzdelerini, eşleşen kene türlerini ve GenBank aksesyon numaralarını içeren veriler Tablo 2'de özetlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen 16S rDNA nükleotid sekansları ile GenBank'ta kayıtlı sekansların bir araya getirilerek yapılan maximum likelihood temelli filogenetik analiz sonucunda elde edilen filogenetik ağaç Şekil 1'de sunulmuştur.

## TARTIŞMA

Bugüne kadar Türkiye'deki kene türlerine ait moleküler verilere bakıldığında kısıtlı olduğu görülmektedir. Bunlardan, İstanbul'da aç halde toplanan *I. ricinus* türünün parsiyel cytochrome oxidase I (*coxI*), cytochrome oxidase II (*coxII*), TROSPA ve defensin gen bölgeleri (19), Samsun'daki göçmen kuştan elde edilen *I. arboricola*'nın parsiyel 12S rRNA bölgesi (20), Niğde'deki bir insandan *D. marginatus*'un parsiyel 16S rDNA bölgesi (21) ve Ankara'da bir tilkiden elde edilen *I. kaiserii*'nin parsiyel 16S rDNA bölgesi (18) sekanslanmış ve identifikasyonları yapılmıştır. Bunların yanında Tokat'ta insanlardan ve Sivas'ta kirpilerden toplanan *Ha. erinacei* örneklerinin parsiyel *coxI* ve 16S rDNA bölgeleri sekanslanmış ve diğer ülkelerden elde edilen *Ha. erinacei* örnekleri ile beraber filogenetik analizleri yapılmıştır (22). Ankara, Giresun, Muğla, Rize ve Tekirdağ illerindeki vejetasyondan ve evcil hayvanlardan toplanan *Rh. sanguineus sensu lato*, *Rh. c.f. turanicus* ve *Rh. bursa* türlerinin parsiyel 16S rDNA bölgesi sekanslanmış ve filogenetik ilişkilerine bakılmıştır (23). Son olarak, Türkiye'nin çeşitli yerlerinden toplanan *H. asiaticum*, *H. aegyptium*, *H. excavatum* ve *H. marginatum* türlerinin parsiyel 16S rDNA ve *H. asiaticum*, *H. excavatum*, *H. marginatum* ve *I. ricinus* türlerinin ise parsiyel 12S rDNA bölgeleri sekanslanmış ve filogenetik ilişkileri incelenmiştir (24).

Yapılan bu çalışmada ise Ankara, Bolu ve Kırşehir illerinin çeşitli bölgelerdeki hayvanlardan ve doğadan aç halde (konak arayan) toplanan *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes* ve *Rhipicephalus* soylarındaki toplamda 17 kene türüne ait parsiyel 16S rDNA gen bölgeleri sekanslanmış ve filogenetik ilişkilerine bakılmıştır. Bunlardan *I. laguri*'nin bugüne kadar ilk kez 16S rDNA karakterizasyonu yapılmış ve bu türe ait GenBank veri tabanındaki toplamda ikinci kaydı olmuştur. Ayrıca GenBank'ta hakkında çok az veri bulunan *Ha. inermis*, *Ha. parva* ve *Ha. sulcata* türlerine ait elde edilen genetik veriler ile GenBank veri tabanına katkıda bulunulmuştur. Ek olarak bugüne kadar GenBank'ta Türkiye'den kaydı bulunmayan *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *H. anatolicum*, *H. detritum*, *Ha. inermis*, *Ha. parva*, *Ha. punctata*, *Ha. sulcata* ve *I. laguri* türlerine ait genetik veriler ilk defa kayıt altına alınmıştır.

Yapılan filogenetik analiz sonucunda *I. laguri*'nin *I. ricinus* ile yakın bir genetik ilişkiye sahip olduğu ve *I. ricinus* kompleksinin bir diğer üyesi olan *I. persulcatus* ile beraber aynı koldan geldiği

görülmüştür (Şekil 1). Bilindiği üzere parafiletik bir grup olan *I. ricinus* kompleksi filogenetik olarak birbirine yakın genetiğe sahip yaklaşık 14 türden meydana gelmekte olup, özellikle Lyme hastalığının vektörü olan türler bu kompleks içerisinde yer almaktadır (37). Ancak, 2017 yılına kadar GenBank'ta *I. laguri*'ye ait genetik verinin bulunmamasından dolayı, bu türün filogenetik ilişkisi belli değildi. Bu çalışmadaki *16S rDNA* filogenisi, *I. laguri* türünün *I. ricinus* kompleksindeki türler ile yakın genetik ilişkiye sahip olduğunu ve bu kompleksin bir üyesi olabileceğini göstermiştir. Benzer şekilde, *I. laguri*'nin *cox1* ve *ITS2* filogenisi de, söz konusu kompleksteki türlerle olan bağlantısını göstermiştir (38). Ancak bu ilişkinin kesinleştirilebilmesi adına *I. laguri*'ye ait daha fazla sayıda örnek ile *Ixodes* soyuna ait detaylı filogenetik analizlerin yapılması gerekmektedir.

*Haemaphysalis* soyunda yer alan türlerin filogenetik ağaçtaki yerlerine bakıldığında en çarpıcı sonucun *Ha. parva* türüne ait olduğu görülmektedir. Çünkü, GenBank'ta bu türe ait sadece 8 kayıt vardır. Bunlardan da sadece 2'si *16S rDNA*'yı içeren mitokondriyon sekansıdır. Ancak, ilginç bir şekilde yapılan BLAST analizi sonucunda bu çalışmada elde edilen *Ha. parva* sekansının GenBank'ta kayıtlı olan 2 sekans (aksesyon nu. NC\_020335 ve JX573136) ile uyuşmadığı ve en yakın olarak %92,2 ile *Ha. sulcata* ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Uyuşmayan iki kaydın olduğu makale incelendiğinde, morfotürün nasıl tanımlanıp ve kullanılan tanımlayıcıların ne olduğu ile ilgili ayrıntılı bir bilgiye rastlanmamıştır. Yazarlar sadece bu türün Romanya'dan elde edildiğini belirtmişlerdir (39). Filogenetik analiz, adı geçen çalışmada elde edilen "*Ha. parva*'nın" *Ha. inermis* ile yakın bir genetiğe sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 1). Bu durum ilgili çalışmadaki kenenin morfolojik identifikasyonunun konfirmasyonu gerektirdiğini göstermektedir. GenBank'ta *Ha. parva* türüne ait başka *16S rDNA* içeren sekans verisi olmadığından dolayı şu anda net bir kanaate varmak da zordur ve ancak GenBank veri tabanına bu türe ait yeni verilerin eklenmesi ile bu durum netleşecektir.

Bu çalışmada, Türkiye'deki *Rhipicephalus* soyuna ait türlerin genetik ilişkilerine bakıldığında 3 türün de (*Rh. bursa*, *Rh. sanguineus* ve *Rh. turanicus*) filogenetik ağaçtaki yerleri net bir şekilde gösterilmiştir. Ancak, bunlardan *Rh. sanguineus* ve *Rh. turanicus* türlerine ait GenBank veri tabanında bir hayli sayıda sekans verisi yer alsa da bunların iç içe geçtiği görülmüştür. Bilindiği üzere *Rh. sanguineus* kompleks/grubu (*Rhipicephalus sanguineus sensu lato*) 12 türden oluşmaktadır. Bunlardan ikisi de *Rh. sanguineus sensu stricto* ve *Rh. turanicus* türleridir (40). Fakat bu iki türün ayırımında detaylı morfolojik identifikasyon gerekmektedir ki aksi halde kolaylıkla karıştırılabilmektedir. Bundan dolayı birçok epidemiyolojik araştırmalarda bu karışıklık söz konusu olmuştur. Ayrıca, özellikle bu iki tür için GenBank'taki kayıtlarda, morfolojik identifikasyondaki hatalardan dolayı, yanlışlıklar olabileceği de belirtilmektedir (41). Nitekim bu durum ile GenBank'taki sekansların incelenmesi ve filogenetik analizlerinin yapılması sırasında karşılaşılmış ve ilgili nedenden dolayı bu çalışmadaki filogenetik analize belirli sayıda kayıtlı örnek dahil edilmiştir. Bu çalışmadaki *16S rDNA* temelli filogenetik ağaçta her iki türün aynı koldan geldiği, türlerin kendi aralarında iki farklı clade oluşturdukları ve genetik olarak %3,5 oranında nükleotid farklılığına (15 nükleotid) sahip oldukları görülmüştür (Şekil 1). Esasen, morfolojik olarak bir takım farklılıklara sahip olan bu iki tür (28, 29) ve *Rh. sanguineus*

kompleksteki diğer türler ile ilgili sistematik olarak bugün bile tam aydınlatılmamış noktalar vardır (40). Bu yüzden kompleksteki türlere ait detaylı morfolojik ve çok sayıda gen bölgesine yönelik filogenetik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Türkiye'deki *Hyalomma* soyunda yer alan türlerin genetik ilişkilerine bakıldığında; özellikle morfolojik olarak bariz farklılıklara sahip olan (32) *H. anatolicum* ve *H. excavatum* türleri arasında *16S rDNA* bazında çok yakın bir genetik benzerlik (%0,5 fark-2 nükleotid farklı) olduğu ve iki türün de tek bir cladede yer aldığı görülmüştür (Şekil 1). Önceleri, morfolojik olarak her iki tür de *H. anatolicum*'un alt türleri olarak sınıflandırılmış, ancak morfolojik ve biyolojik olarak önemli farklılıklara sahip olan bu iki türün ayrı türler olduğu gösterilmiş ve bu şekilde sınıflandırılmıştır (32). Buna karşın, adı geçen iki türe yönelik yapılan sekansa dayalı moleküler çalışmalarda bazı gen bölgelerinde oldukça yüksek benzerlik ve filogenetik açıdan da bir hayli yakın genetik ilişki tespit edilmiştir. Örneğin; Hindistan'dan toplanan *H. anatolicum* ve *H. excavatum* türleri arasında parsiyel *16S rDNA* bölgeleri arasında %1,68 nükleotid farklılığı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, *H. anatolicum* ve *H. marginatum* arasında ise %2,83 oranında nükleotid farklılığı rapor etmişlerdir. Oluşturulan *16S rDNA* temelli filogenetik ağaçta ise *H. anatolicum* ve *H. excavatum* türlerinin tek bir cladede toplandığı gösterilmiştir (42). Bir diğer çalışmada, Türkiye'deki *Hyalomma* soyuna ait 4 türde genetik benzerlik araştırılmış ve *H. anatolicum* ile *H. excavatum* türleri arasındaki bu yakın genetik ilişki parsiyel *16S rDNA* ve *12S rDNA* bölgeleri kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlarda gösterilmiştir (24). Ayrıca yazarlar ilgili gen bölgesinde *H. anatolicum* ve *H. excavatum* arasında genetik farklılık bulunmadığını ve *H. marginatum* ile de nükleotid farkının %3 olduğunu, bu durumun ilgili türlerin farklı türler olarak adlandırılması adına yeterli olmadığını belirtmişlerdir (24). Bu çalışmada da, benzer bir şekilde, *H. anatolicum* ve *H. marginatum* arasında %3,1 (13 nükleotid) ve *H. excavatum* ve *H. marginatum* arasında ise %3,5 (15 nükleotid) oranında nükleotid farklılığına sahip olduğu tespit edilmiştir. Ancak, sadece belirli gen bölgeleri benzerliklerine bakarak türler arasında taksonomik olarak "tür statüsü" kazanıp kazanmadığı kanaatine varmak mümkün değildir. Çünkü bir kenenin tür statüsünü belirlemek için detaylı morfolojik, biyolojik ve moleküler verilerin bir araya getirilmesi gerekmektedir. Bundan dolayı adı geçen türlerin moleküler anlamda diğer gen bölgelerine bakılması ve hatta gerekirse "tüm genom" sekanslarının karşılaştırılması gerekmektedir. Çünkü, birçok ixodid kene türünde bazı gen bölgeleri (örneğin *18S rRNA*) hayli korunmuştur (43) ve bariz bir şekilde farklı tür olarak tanımlanan bazı *Hyalomma* türlerinde ayırıcı yetisi bulunmamaktadır (yayınlanmamış veri). Ayrıca, *Hyalomma* soyundaki birçok türü içeren morfolojik ve filogenetik analizlerin yapıldığı bir çalışmada; iki ayrı tür olan *H. marginatum* ve *H. turanicum* arasında %0,44 nükleotid farklılık tespit edilirken, *H. truncatum*'un farklı coğrafyalardaki bireyleri arasında %10,22 oranında nükleotid farkı olduğunu tespit edilmiştir (44). Bu durumun *H. anatolicum* ve *H. excavatum* türleri arasında da olması kuvvetle ihtimaldir. Bu sonuç, tek başına sadece kısıtlı gen bölgesi kıyaslamalarının bu türlerin "tür statülerini" kaybetmesi için yeterli olmadığını göstermektedir. Benzer bir durum *H. detritum* ve *H. scupense* türleri arasında söz konusudur. Uzun yıllar birbirleri ile yakın ilişkide olan *H. detritum* ve *H. scupense* 2 ayrı tür olarak sınıflandırılmıştır;

ancak, son yıllarda bazı taksonomistler tarafından yapılan morfolojik analizler sonucunda *H. detritum*'un *H. scupense*'nin sinomi olduğu (45) ve sadece *H. scupense* isminin kullanılması gerektiği öne sürmüşlerdir (2, 45). Ancak, halen bazı kene çalışmalarında *H. detritum* identifiye edilmekte ve bu isim kullanılmaktadır (46-51). Geçmişten beri bu iki kenenin ayrımında kullanılan en büyük dayanak, biyolojik olarak *H. detritum*'un iki konaklı ve *H. scupense*'nin ise tek konaklı bir gelişim göstermesidir (45). Bu iki kenedeki biyolojik ve ekolojik farklılıklar, Türkiye'deki keneler ile yapılan hem saha hem de laboratuvar çalışmalarında görülmüş ve biyolojik ve ekolojik olarak bariz farklılıkları olan ve coğrafik dağılım bazında da birbirlerine karışmayan bu iki kenenin ilk tanımlamalarda olduğu gibi farklı iki tür olabileceği öne sürülmüştür (52, Sırrı Kar - kişisel bildirim). Ayrıca, bazı genetik veriler bu iki kenenin birbirleri ile yakın ilişkiye sahip olduğunu, ancak yapılan filogenetik analizler iki farklı cladede toplandıklarını göstermiştir (yayınlanmamış veri). İlgili karmaşadan dolayı, olası bir karışıklığın önüne geçmek adına bu çalışmada eski taksonomiye uygun olarak *H. detritum* adı kullanılmıştır. *H. detritum*'a ait parsiyel 16S rDNA'sı sekanslanmış ve GenBank'ta kayıtlı Çin Halk Cumhuriyeti'nden toplanmış *H. detritum* sekansları ile %98,4-99,7 arasında nükleotid benzerliğine sahip olduğu ve bu örnekler ile tek bir clade de yer aldıkları tespit edilmiştir (Şekil 1). Ayrıca, bu çalışmadaki *H. detritum* örneğinin Pakistan'dan toplanan *H. scupense* ile %98,2 oranında nükleotid benzerliğine sahip olduğu, ancak aynı koldan gelen farklı cladelere yer aldıkları görülmüştür (Şekil 1). Öte yandan bu genetik veri ile söz konusu iki türün ayrı veya aynı tür olduğu sonucuna ulaşmak zordur. İlgili nedenlerden dolayı, her iki keneye ait detaylı moleküler, morfolojik ve biyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, yapılan bazı çalışmalardan da anlaşılıyor ki *Hyalomma* soyunda taksonomik olarak bazı revizyonların da yapılması gerekmektedir (44).

## SONUÇ

Bu çalışma ile; Türkiye'de aktif olarak varlığını sürdüren 17 kene türünün 16S rDNA moleküler karakterizasyonları yapılmış ve ilgili gen bölgesi temelli filogenetik ilişkileri ortaya konmuştur. Elde edilen genetik veriler GenBank veri tabanına kaydedilmiştir. Ayrıca bazı kene türleri için ilk ve yeni veriler elde edilmiş ve filogenetik ilişkileri yorumlanmıştır. Bu bağlamda bu araştırma Türkiye'de şimdiye kadar yapılan tür bazında en geniş spektruma sahip moleküler çalışmadır. Böylece yapılan bu çalışma hem bölgesel hem de küresel anlamda adı geçen kene türlerinin genetik verilere önemli katkıda bulunmuştur. Ancak, halen Türkiye'de var olan diğer ixodid ve argasid kene türlerine ait genetik verilere ihtiyaç duyulmaktadır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Çıkar Çatışması:** Yazar çıkar çatışması bildirmemiştir.

**Finansal Destek:** Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü'nce (Proje No:14L0239006) desteklenmiştir.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was declared by the author.

**Financial Disclosure:** This study was funded by Ankara University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project no. 14L0239006).

## KAYNAKLAR

1. Sonenshine DE. Biology of Ticks. Volume 1. Oxford: Oxford University Press; 1991.
2. Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DD, Petney TN, Estrada-Pena A, Horak IG. The hard ticks of the World (Acari: Ixodidae). New York: Springer; 2014.
3. Nicholson WL, Sonenshine DE, Lane RS, Uilenberg G. Ticks (Ixodida). Mullen GR, Durden LA, editors. Medical and Veterinary Entomology. London: Academic Press, Elsevier; 2009. p. 493-542.
4. Estrada-Pena A., Jongejan F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodidea with special reference to pathogen transmission. Exp Appl Acarol 1999; 23: 685-715. [CrossRef]
5. Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. Parasitology 2004; 129: 3-13. [CrossRef]
6. Estrada-Pena A, Ayllon N, de la Fuente J. Impact of climate trends on tick-borne pathogens transmission. Front Physiol 2012; 3: 1-12. [CrossRef]
7. İnci A, Yıldırım A, Düzlü Ö, Doğanay M, Aksoy S. Tick-borne diseases in Turkey: A review based on one health perspective. PLoS Negl Trop Dis 2016; 10: e0005021.
8. Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: a one health perspective. Trends Parasitol 2012; 28: 437-46. [CrossRef]
9. Ergönül Ö. Crimean-Congo hemorrhagic fever. Lancet Infect Dis 2006; 6: 203-14. [CrossRef]
10. Yılmaz GR, Buzgan T, İrmak H, Safran A, Uzun R, Çevik MA, et al. The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey, 2002-2007. Int J Infect Dis 2009; 13: 380-6. [CrossRef]
11. Orkun Ö, Karaer Z, Çakmak A, Nalbantoğlu S. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks in Turkey: A broad range tick surveillance study. Infect Genet Evol 2017; 52: 59-66. [CrossRef]
12. Leblebicioğlu H, Özaras R, İrmak H, Şencan İ. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey: Current status and future challenges. Antivir Res 2016; 126: 21-34. [CrossRef]
13. Durden LA, Beati L. Modern tick systematics. Sonenshine DE, Roe M, editors. Biology of Ticks. Second Edition, Volume 1. Oxford: Oxford University Press; 2014. p. 17-58.
14. Black WC, Piesman J. Phylogeny of hard- and soft tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. Proc Nat Acad Sci USA 1994; 91: 10034-8. [CrossRef]
15. Meyer JM, Hill CA. Tick genetics, genomics, and transformation. Sonenshine DE, Roe M, editors. Biology of Ticks. Second Edition, Volume 2. Oxford: Oxford University Press; 2014. p. 61-87.
16. Murrell A, Baker SC. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). Syst Parasitol 2003; 56: 169-72. [CrossRef]
17. Venzal JM, Gonzales-Acuna D, Munoz-Leal S, Mangold AJ, Nava S. Two new species of *Ornithodoros* (Ixodida; Argasidae) from the Southern Cone of South America. Exp Appl Acarol 2015; 66: 127-39. [CrossRef]
18. Orkun Ö, Karaer K. First record of the tick *Ixodes* (Pholeioxodes) *kaiseri* in Turkey. Exp Appl Acarol 2018; 74: 201-5. [CrossRef]
19. Porretta D, Mastrantonio V, Mona S, Epis S, Montagna M, Sasseria D, et al. The integration of multiple independent data reveals an unusual response to Pleistocene climatic changes in the hard tick *Ixodes ricinus*. Mol Ecol 2013; 22: 1666-82. [CrossRef]
20. Keskin A, Köprülü TK, Bursalı A, Özdemir AC, Yavuz KE, Tekin S. First record of *Ixodes arboricola* (Ixodida: Ixodidae) from Turkey with presence of *Candidatus Rickettsia vini* (Rickettsiales: Rickettsiaceae). J Med Entomol 2014; 51: 864-7. [CrossRef]

21. Çelebi ARC, Orkun Ö. A rare case of tick infestation of the eyelid: case report and literature review. *Rev Bras Oftalmol* 2016; 75: 144-6. [\[CrossRef\]](#)
22. Hornok S, Wang Y, Otranto D, Keskin A, Lia RP, Kontschan J, et al. Phylogenetic analysis of *Haemaphysalis erinacei* Pavesi, 1884 (Acari: Ixodidae) from China, Turkey, Italy and Romania. *Parasit Vectors* 2016; 9: 643. [\[CrossRef\]](#)
23. Hekimoğlu O, Sağlam İK, Özer N, Estrada-Pena A. New molecular data shed light on the global phylogeny and species limits of the *Rhipicephalus sanguineus* complex. *Ticks Tick Borne Dis* 2016; 7: 798-807. [\[CrossRef\]](#)
24. Hekimoğlu O., Özer AN. Distribution and phylogeny of *Hyalomma* ticks (Acari: Ixodidae) in Turkey. *Exp Appl Acarol* 2017; 73: 501-19. [\[CrossRef\]](#)
25. Hoogstraal H. African Ixodidae, ticks of the Sudan. Washington: Burg Med Surg, Dept Navy, US Govt. Print. Of. (USGPO); 1956.
26. Arthur DR. Ticks of the genus *Ixodes* in Africa. London: The Athlone Press; 1965.
27. Filippova NA. Ixodid ticks (Ixodinae), Fauna USSR New Ser 4(4). Nauka, Leningrad, Moscow: 1977.
28. Filippova NA. Fauna of Russia and neighbouring countries, Arachnoidea, Volum IV, issue 5, Ixodid ticks of subfamily Amblyomminae. St. Petersburg: Nauka Publishing House; 1997.
29. Walker BJ, Keirans JE, Horak IG. The genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): a guide to the brown ticks of the world. Cambridge: Cambridge University, 2000. [\[CrossRef\]](#)
30. Apanaskevich DA. The diagnostics of *Hyalomma* (*Hyalomma*) *aegyptium* (Acari: Ixodidae). *Parasitologia* 2003; 37: 47-59.
31. Estrada-Pena A., Bouattour A, Camicas JL, Walker AR. Ticks of domestic animals in the Mediterranean region. A guide of identification of species. Zaragoza: University of Zaragoza Press; 2004.
32. Apanaskevich DA, Horak IG. The genus *Hyalomma* Koch, 1844. II. Taxonomic status of *H. (Euhyalomma) anatolicum* Koch, 1844 and *H. (E.) excavatum* Koch 1844 (Acari, Ixodidae) with redescriptions of all stages. *Acarine* 2005; 13: 181-97.
33. Apanaskevich DA, Horak IG. The genus *Hyalomma* Koch, 1844: V. Re-evaluation of the taxonomic rank of taxa comprising the *H. (Euhyalomma) marginatum* Koch complex of species (Acari: Ixodidae) with redescription of all parasitic stages and notes on biology. *Internat J Acarol* 2008; 34: 13-42. [\[CrossRef\]](#)
34. Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium* 1999; 41: 95-8.
35. Posada D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 2008; 25: 1253-6. [\[CrossRef\]](#)
36. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetic analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016; 33: 1870-4. [\[CrossRef\]](#)
37. Xu G, Fang QQ, Keirans J, Durden LA. Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group. *J Parasitol* 2003; 89: 452-7. [\[CrossRef\]](#)
38. Radulovic Z, Mihaljica D, Cosic N, Penezic A, Cakic S, Sukara R, et al. Hard ticks parasitizing European ground squirrel, *Spermophilus citellus* (L., 1766) (Rodentia: Sciuridae) in Serbia. *Acta Zool Bulg* 2017; 69: 547-54.
39. Burger TB, Shao R, Barker SC. Phylogenetic analysis of the mitochondrial genomes and nuclear rRNA genes of ticks reveals a deep phylogenetic structure within the genus *Haemaphysalis* and further elucidates the polyphyly of the genus *Amblyomma* with respect to *Amblyomma sphegodonti* and *Amblyomma elaphense*. *Ticks Tick Borne Dis* 2013; 4: 265-74. [\[CrossRef\]](#)
40. Nava S, Estrada-Pena A, Petney T, Beati L, Labruna MB, Szabo MPJ, et al. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Vet Parasitol* 2015; 208: 2-8. [\[CrossRef\]](#)
41. Gray J, Dantas-Torres F, Estrada-Pena A, Levin M. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks Tick Borne Dis* 2013; 4: 171-80. [\[CrossRef\]](#)
42. Kaur H, Chhilar JS, Chhilar S. Mitochondrial 16S rDNA based analysis of some hard ticks belonging to genus *Hyalomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *J Adv Parasitol* 2016; 3: 32-48. [\[CrossRef\]](#)
43. Dobson SJ, Baker SC. Phylogeny of the hard ticks (Ixodidae) inferred from 18S rRNA indicates that the genus *Aponomma* is paraphyletic. *Mol Phylogenet Evol* 1999; 11: 288-95. [\[CrossRef\]](#)
44. Sands AF, Apanaskevich DA., Matthee S, Horak IG, Harrison A, Karim S, et al. Effects of tectonic and large scale climatic changes on the evolutionary history of *Hyalomma* ticks. *Mol Phylogenet Evol* 2017; 114: 153-65. [\[CrossRef\]](#)
45. Apanaskevich DA, Filipova NA, Horak IG. The genus *Hyalomma* Koch, 1844. X. Redescription of all parasitic stage of *H. (Euhyalomma) scupense* Schulze, 1919 (= *H. detritum* Schulze) (Acari: Ixodidae) and notes on its biology. *Folia Parasit* 2010; 57: 69-78. [\[CrossRef\]](#)
46. Karaer Z, Güven E, Nalbantoğlu S, Kar S, Orkun Ö, Ekdal K, et al. Tick on humans in Ankara, Turkey. *Exp Appl Acarol* 2011; 54: 85-91. [\[CrossRef\]](#)
47. Aktaş M. A survey of ixodid tick species and molecular identification of tick-borne pathogens. *Vet Parasitol* 2014; 200: 276-83. [\[CrossRef\]](#)
48. Waner T, Keysary A, Eremeeva ME, Din AB, Mumcuoğlu K, King R, et al. *Rickettsia africa* and *Candidatus Rickettsia barbariae* in ticks in Israel. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 90: 920-2. [\[CrossRef\]](#)
49. Moshaverinia A, Moghaddas E. Prevalance of tick infestation in dromedary camels (*Camelus dromedarius*) brought for slaughter in Mashhad abattoir, Iran. *J Parasit Dis* 2015; 39: 452-5. [\[CrossRef\]](#)
50. Düzlü Ö, Yıldırım A, İnci A, Gümüşsoy KS, Çiloglu A, Önder Z. Molecular investigation of *Francisella*-like endosymbiont in ticks and *Francisella tularensis* in ixodid ticks and mosquitoes in Turkey. *Vector-Borne Zoonot* 2016; 16: 26-32. [\[CrossRef\]](#)
51. Khan V, Zala DB, Joshi KM. Occurrence of *Hyalomma* (Acari: Ixodidae) Koch, 1844 on domestic animal in the Union Territory of Dadra & Nagar Haveli, Indian. *J Parasit Dis* 2016; 40: 543-5. [\[CrossRef\]](#)
52. Kar S, Akyıldız G, Vatanserver Z. Trakya'da ineklerde *Hyalomma scupense* enfestasyonu ve enfestasyonun mevsimsel karakteristiği. 19. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Uluslararası Katılımlı Ekinokokkozis Sempozyumu; 5-9 Ekim Erzurum-Türkiye: 2015. p. 79-80.