



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**ŞANLIURFA İLİ VE ÇEVRESİNDE YERLEŞİK DAMIZLIK
ATLARDA BATI NİL VİRUSU ENFEKSİYONUNUN SEROLOJİK
VE VİROLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Rahime Adalet DUYUM

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU

ANKARA

2018

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ŞANLIURFA İLİ VE ÇEVRESİNDE YERLEŞİK DAMIZLIK
ATLARDA BATI NİL VİRUSU ENFEKSİYONUNUN SEROLOJİK
VE VİROLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Rahime Adalet DUYUM

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU

ANKARA

2018

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Şanlıurfa ili ve çevresinde yerleşik damızlık atlarda Batı Nil Virusu enfeksiyonu'nun serolojik ve virolojik olarak araştırılması” başlıklı tez, bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Rahime Adalet DUYUM

Tarih: 04.06.2018

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Viroloji Anabilim Dalı'nda Rahime Adalet DUYUM tarafından hazırlanan “Şanlıurfa ili ve çevresinde yerleşik damızlık atlarda Batı Nil Virusu enfeksiyonu'nun serolojik ve virolojik olarak araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:04.06.2018

Prof.Dr.Yılmaz AKÇA
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof.Dr.V.Soydal ATASEVEN
Mustafa Kemal Üniversitesi
Üye

Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Batı Nil Virüsünün Etiyolojik Özellikleri	4
1.1.1. Virionun Yapısı	4
1.1.2. Virüsün Filogenetik Özellikleri	5
1.1.3. Virusun Replikasyonu	7
1.2. Virüsün Enzoitik Taşınımı ve Patogenezi	8
1.3. Klinik Bulgular	13
1.4. Teşhis	16
1.4.1. Serolojik Teşhis	16
1.4.2. Virolojik Teşhis	17
1.5. Korunma ve Kontrol	17
1.6. Tezin Amacı	18
2. GEREÇ ve YÖNTEM	20
2.1. Gereç	20
2.1.1. Örneklenen İşletmeler	20
2.1.2. Hücre	21
2.1.3. Virüs	21
2.2. Yöntem	21

2.2.1. Kan Serum Örneklerinin Hazırlanması	21
2.2.2. Virüsün Üretilmesi	21
2.2.3. BNV Ab ELISA Testi	22
2.2.4. BNV IgM ELISA Testi	23
2.2.5. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT)	24
2.2.6. Real Time RT-PCR	26
3. BULGULAR	30
3.1. Virüsün Titresi	30
3.2. ELISA Sonuçları	30
3.3. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT) Sonuçları	33
3.4. Real Time RT-PCR Sonuçları	34
4. TARTIŞMA	35
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	42
ÖZET	44
SUMMARY	45
KAYNAKLAR	46
EKLER	
Ek-1. AÜ. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu izni	52
ÖZGEÇMİŞ	54

ÖNSÖZ

Günümüzde artropod kaynaklı enfeksiyonlar artarak yayılmakta ve ciddi halk sağlığı sorunları oluşturmaktadır. Amerika ve Afrika başta olmak üzere Doğu, Güney Avrupa ve ülkemizde baş gösteren enfeksiyonlar konunun önemini bir kez daha ortaya koymaktadır.

Batı Nil Virüsü (BNV) dünya üzerinde oldukça geniş bir alanda yaygınlık gösteren başlıca arboviruslardandır. Virüs ilk kez Uganda'nın Batı Nil bölgesinde izole edilmiştir. Bindokuzyüzdoksandokuz yılında Amerika Birleşik Devletlerinde New York'ta baş gösteren salgın sonrası yapılan araştırmaların artması ile başta ülkemiz olmak üzere diğer pek çok ülkede enfeksiyonun varlığı ve yaygınlığı ortaya konulmuştur. Ülkemizde Arboviruslara bağlı enfeksiyonlar daha çok hayvanlarda tespit edilmiş olmasına rağmen 2010 yılında Manisa'da ortaya çıkan bir olgu ile akut BNV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Bu tez projesi ile sınırlı bir bölgede Batı Nil Virüsü enfeksiyonu'nun serolojik ve virolojik olarak tespit edilmesi, yaygınlığının araştırılması ve güncel verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimimin ve çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen Danışman Hocam Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU'na, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nın imkanlarından faydalanmamı sağlayan Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Yılmaz AKÇA'ya, yardım ve desteklerini esirgemeyen Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Feray ALKAN'a, Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a, Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP'e ve Prof.Dr.T.Çiğdem OĞUZOĞLU'na, çalışmamın proje desteğini sağlayan kurumum Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne, saha çalışmalarında yardımcı olan Şanlıurfa İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü'ne, doktora tez çalışmam boyunca birlikte görev yaptığım Araştırma Görevlisi ve Doktora Öğrencisi arkadaşlarıma ve tez çalışmama katkıda bulunan herkese teşekkür ederim.

Tüm çalışmalarım boyunca gösterdiği sabır, teşvik ve fedakarlıklardan dolayı eşim Dr. Hayrettin Mehmet DUYUM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	:American Type Culture Collection
BNV	:Batı Nil virüsü
BOS	:Beyin Omurilik Sıvısı
C	:Capsid
CMC	:Carboxymethyl Cellulose
CPE	:Cytopathic effect
DENV	:Dengue Virus
DMEM	:Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	:Deoksiribonükleik asit
E	:Envelope
ELISA	:Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	:Endoplazmik retikulum
FDA	:Food and Drug Administration
HI	:Hemagglutination inhibition
IFAT	:İmmunofluorescence antibody test
IgG	:İmmunglobulin G
IgM	:İmmunglobulin M
JEV	:Japanese encephalitis virus
KOUV	:Koutango virus
M	:Membran
µL	:Mikrolitre
MVEV	:Murray Valley encephalitis virus
NCA	:Normal Cell Antigen
ORF	:Open reading frames
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
prM	:Premembran
PRNT	:Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi
RNA	:Ribonükleik asit
SLEV	:St Louis encephalitis virus
Taq	:Thermus aquaticus
TBEV	:Tick-borne encephalitis virus
TMB	:Tetramethylbenzidine
USUV	:Usutu virüs
UTR	:Untranslated region
Vero-E6	:African Green Monkey Cercopithecus aethiops kidney epithelial cells, ATCC-CRL 1586)
WNRA	:West Nile Recombinant Antigen
WNV	:West Nile virus
YAUV	:Yaounde virus
YFV	:Yellow Fever Virus

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Batı Nil virüs enfeksiyonlarının dünya genelindeki yayılımı	3
Şekil 1.2. Batı Nil virüsü genomu ve kodlanan yapısal-yapısal olmayan proteinlerin şematik gösterimi	5
Şekil 1.3. Batı Nil virüsü kökenlerinin tüm genom dizilerinin filogenetik analizi	6
Şekil 1.4. BNV'nin replikasyon siklusu	8
Şekil 1.5. Batı Nil virüsünün bulaş döngüsü	9
Şekil 1.6. Ülkemizden geçen kuş göç yolları haritası	10
Şekil 1.7. BNV'nin Avrupa'daki yayılımı	12
Şekil 1.8. Ensefalit semptomlu bir at	13
Şekil 1.9. BNV enfeksiyonunun neden olduğu toplu kuş ölümleri	14
Şekil 3.1. Real Time RT-PCR test sonuçları	34

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. BNV genomu tespit edilen sivrisinek türleri	11
Çizelge 1.2. BNV ile enfekte atlarda klinik belirtilerin dağılımı	15
Çizelge 2.1. Örneklemeye yapılan işletmeler	20
Çizelge 2.2. Real Time RT-PCR karışım bileşenleri ve miktarları	28
Çizelge 2.3. Real Time RT-PCR ısı döngüsü ve döngü sayısı	28
Çizelge 3.1. İşletmelere göre ELISA sonuçlarının dağılımı	31
Çizelge 3.2. ELISA ve PRNT Sonuçları Karşılaştırma Tablosu	32
Çizelge 3.3. ELISA ve PRNT Sonuçlarının İlçelere Göre Dağılımı	33

1. GİRİŞ

Batı Nil Virüsü (BNV) insanlar, atlar, kuşlar ve çeşitli vahşi hayvanlarda ensefalit vakası ile seyreden salgınlara sebep olan, artopodlarla bulaşan, Flaviviridae ailesine mensup zoonoz bir virüstür (Bernkopf ve ark., 1953 ve Diamond, 2009). Virüs ilk defa Uganda'nın Batı Nil bölgesinde ateşli hastalık geçiren bir kadından izole edilmiştir (Smithburn ve ark., 1940). Daha sonra da Afrika, Orta Doğu ve Güney Avrupa'da insanlar, kuşlar ve sivriseneklerde yaygın Flaviviruslar arasında yerini almıştır (Bernkopf ve ark., 1953 ve Magurano ve ark., 2012).

Ülkemizin kuşların önemli göç yolları arasında yer alması enfeksiyonun yayılması açısından önem arz etmektedir. Bilindiği üzere ülkemiz at yetiştiriciliği açısından oldukça ileri bir noktadadır. BNV enfeksiyonu at yetiştiriciliğinde sebep olabileceği performans düşüklüğü ve kayıplardan dolayı ekonomik yönden önemli bir enfeksiyondur.

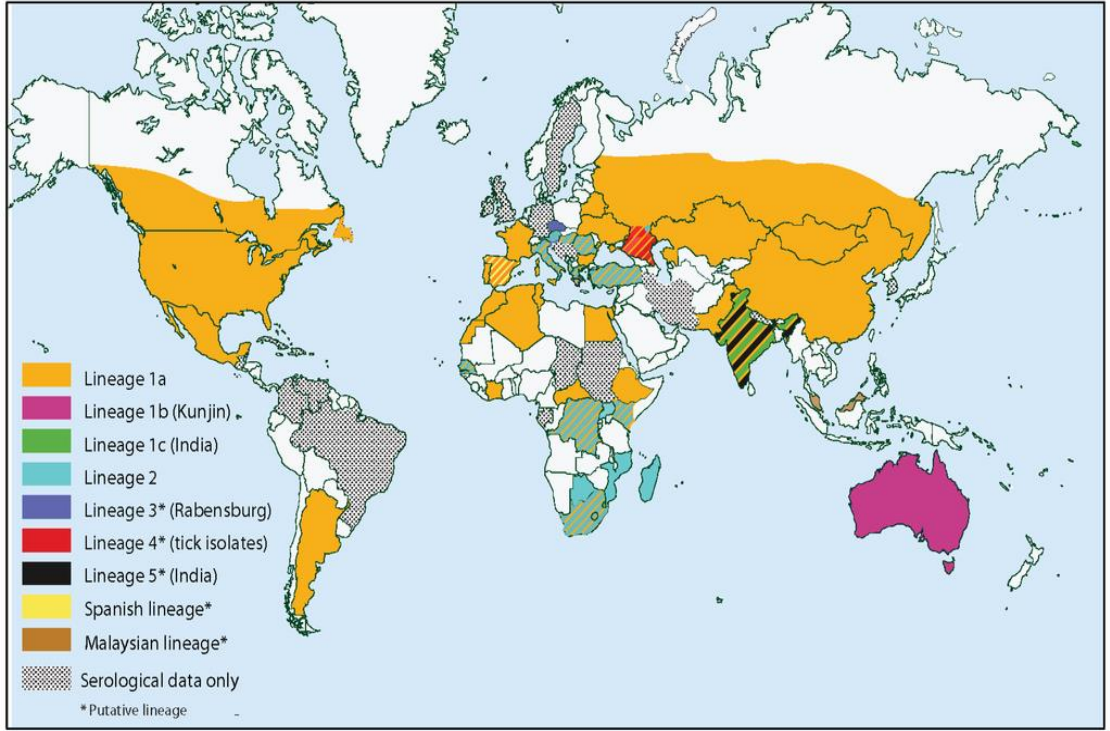
Vektörlerle bulaşan flaviviruslardan enfeksiyon açısından en yaygın ve önemli olanları Batı Nil virüsü (West Nile virus, WNV = BNV), kene kaynaklı ensefalit virüsü (Tick-borne encephalitis virus, TBEV), Deng virusu (Dengue Virus, DENV) ve sarı humma virüsü (Yellow Fever Virus, YFV)'dur (Monarth, 1996 ve Serter, 1980). Bu virüsler arasında BNV, DENV ve YFV için esas bulaşma sebebi sivrisinekler, TBEV için ise kenelerdir (Shaffner ve ark., 2014 ve Sips ve ark., 2012).

Virüsün doğal taşıyıcısı *Culex* ve *Aedes* cinsi sivrisineklerdir. Seyrek olarak kenelerle de bulaştığı bildirilmiştir. Yabani kuşlarla bu artropodlar arasında önemli bir geçiş zincirine sahip olan virüs insan, at, köpek, koyun gibi memeli hayvanlar ile tavuk gibi evcil kanatlı hayvanları da enfekte edebilmektedir (Taylor, 1953 ve Zaayman ve ark., 2009). Virüsün bulaş döngüsünde, kuşlar ve sivrisinekler arasında geçiş sırasında virus tesadüfi olarak atları ve insanları da enfekte edebilmektedir. Ancak bu son konakçılar virüsün epidemiyolojik döngüsünde yer almamaktadır (Rosa ve ark., 2014).

Enfeksiyon atlarda genellikle asemptomatiktir ancak %20 kadarında klinik belirtiler ortaya çıkabilir. Bunlar ataksi, güçsüzlük sırtüstü yere yatma şeklindedir. Bu vakaların büyük bir kısmı ölümlerle sonuçlanmaktadır (Murray ve ark., 2010). Enfekte insanlarda ateş, döküntü, artralji ve miyalji görülebilir. Olguların yaklaşık %1'inde ise ensefalit, meningoensefalit ve paraliz gibi klinik bulguların şekillendiği nöroinvasif enfeksiyon gelişebilmektedir. Bu durum genellikle ileri yaşta insanlarda ve immun sistemi çeşitli sebeplerle baskılanmış bireylerde görülmektedir (Ergünay ve ark., 2010a ve Serter, 1980).

Fransa'da 1962 ve 1963 yıllarında görülen salgın Avrupa'da bilinen ilk BNV salgını olarak kayıtlara geçmiştir (Zeller ve Chuffenecker, 2004). Devam eden yıllarda ise Avrupa'nın pek çok farklı bölgesinde enfeksiyon çeşitli salgınlarla kendini göstermiştir. Virüs Güney Avrupa, Doğu Avrupa ve Akdeniz Havzası boyunca yayılımını sürdürmüş ve önemli bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir. Bu salgınlar sebebiyle bir çok ülkede çeşitli sürveyans programları uygulanmaya başlamıştır. Böylece salgınlar izlenebilir ve kayıt altına alınabilir hale gelmiştir (Zeller ve Chuffenecker, 2004). İki bin on bir yılında İtalya'da görülen büyük salgında bu sürveyans programı ile genotip 1 ve genotip 2'nin bölgedeki yaygınlığı gösterilmiştir (Magurano ve ark., 2012). Avrupa'da 2010 ve 2013 yılları arasında Avusturya, Bosna Hersek, Hırvatistan, Yunanistan, Macaristan, İtalya, Kosova, Makedonya, Sırbistan, Rusya Federasyonu, Ukrayna ve İspanya'da BNV salgınları kayda geçmiştir. Özellikle Yunanistan ve Rusya'da her yıl yüksek oranda virüsün varlığı bildirilmiştir (ECDC, 2011).

Amerika'nın birçok farklı bölgesinde ise 1999 yılından itibaren başgösteren salgınlarla birlikte enfeksiyonun bu kıtadaki yayılımı devam etmiş ve Amerika'da 2012 yılında en büyük BNV salgını başgöstermiştir. Bindokuzyüzdoksandokuz ile 2013 yılları arasında 39.557 olgu, 17.381 nöroinvasif bulgu ve 1.667 ölüm raporlanmıştır (EDCD, 2011).



Şekil. 1.1. Batı Nil virüs enfeksiyonlarının dünya genelindeki yayılımı (MDPI, 2013).

Ülkemizde ilk akut BNV enfeksiyonu 2010 yılında kayıtlara geçmiştir. Kalaycıoğlu ve ark. tarafından yürütülen süreyans verilerine göre 2010 ve 2011 yıllarında 47 vakada BNV enfeksiyonu tespit edilmiş ve uluslararası bildirim yapılmıştır (Kalaycıoğlu ve ark., 2012).

Ülkemizde enfeksiyonla ilgili çalışma sayısı son yıllarda artmakla birlikte, Türkiye'nin pek çok farklı noktasında virüsün sirkülasyonda olduğu gözlenmiş, özellikle Güneydoğu Anadolu bölgesinde yaşayan insanlarda diğer illere oranla daha yüksek oranda antikör tespit edilmiştir (Ergünay ve ark., 2007; Radda, 1971; Serter, 1980).

Yerküre üzerindeki sıcak iklime sahip bölgelerde enfeksiyon özellikle yaz mevsimi ve sonbaharın başlarında artış göstermektedir. Bu bölgelerde enfeksiyonun görülme sıklığı sivrisinek yoğunluğunun fazla olduğu yerlerde maksimum seviyelere ulaşmaktadır (Campbell ve ark., 2002).

Özellikle Ülkemizde Akdeniz ve güneydoğu Anadolu bölgeleri sıcak iklim koşullarına sahiptir ve birçok sivrisinek türüne ev sahipliği yapmaktadır. Bu çalışma ile Şanlıurfa ve çevresinde Batı Nil Virüsü enfeksiyonu'nun son konakçısı olan atlarda hastalığın serolojik ve virolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma ile elde edilecek veriler özellikle kuşların göç yolunda bulunan ve yerleşik at yetiştiriciliklerinin bulunduğu bölgede enfeksiyonun varlığı ve yaygınlığı hakkında bilgi verirken, yapılacak moleküler çalışmalar ile virüsün genetik karakterizasyonuna yönelik yeni verilerin elde edilmesi hedeflenmiştir.

1.1. Batı Nil Virüsünün Etiyolojik Özellikleri

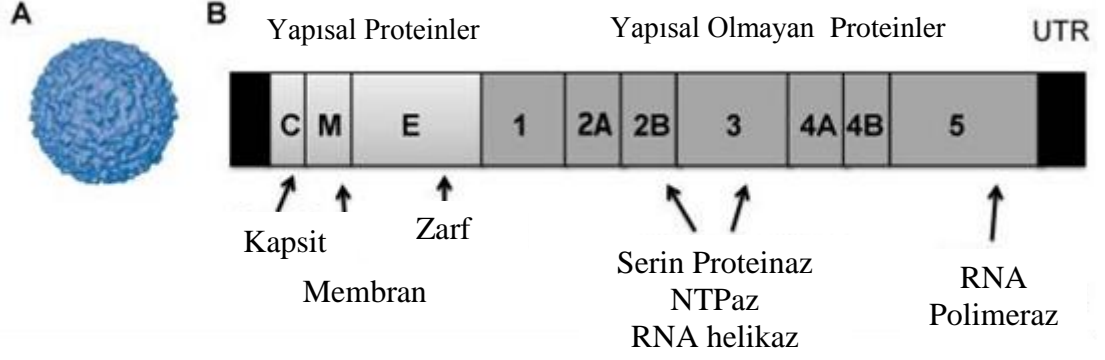
Batı Nil Virüsü'nün klasifikasyondaki yerine bakıldığında; Flaviviridae içinde 4 farklı cins yer almaktadır. Bunlar; Flaviviruslar, Hepaciviruslar, Pegiviruslar ve Pestiviruslardır. Flavivirüs cinsi içinde ise 53 tür bulunmaktadır ve Batı Nil virüsü da bu türlerden biridir. Flavivirüs cinsi içinde Batı Nil Virüsü dışında, sokucu sineklerle bulaşan Dengue, Japon ensefalitis virüs, Saint Louis virüs, Yellow fever virüs ve Zika virüs gibi önemli patojenler de yer almaktadır (NCBI, 2017).

1.1.1. Virionun Yapısı

Virüs yaklaşık 50 nm çapındadır ve kübik simetrik zarflı bir yapıya sahiptir. Tek zincirli pozitif polariteli RNA genomu içerir. RNA yaklaşık 11-12 kb uzunluğunda olup, 5' ve 3' uçlarında UTR (untranslated region)'leri bulunmaktadır ve tek bir ORF (open reading frame-açık okuma çerçevesi) içermektedir (Monarth, 1996; Petersan ve Roehrig, 2001). Bu genom 10 farklı protein kodlamaktadır. Bunlardan kapsit (C), premembran (prM), membran (M) ve zarf proteinleri virion oluşumu için yapısal proteinlerdir. NS1, NS2a, NS2B, NS3, NS4a, NS4b ve NS5 ise replikasyonda rol oynayan yapısal olmayan proteinlerdir (Rossi ve ark., 2010).

Virüse ait zarf iki önemli integral proteine sahiptir. Bu moleküllerden E-glikoproteini yaklaşık 20 kDa büyüklüğündedir ve virulans özelliğe sahip

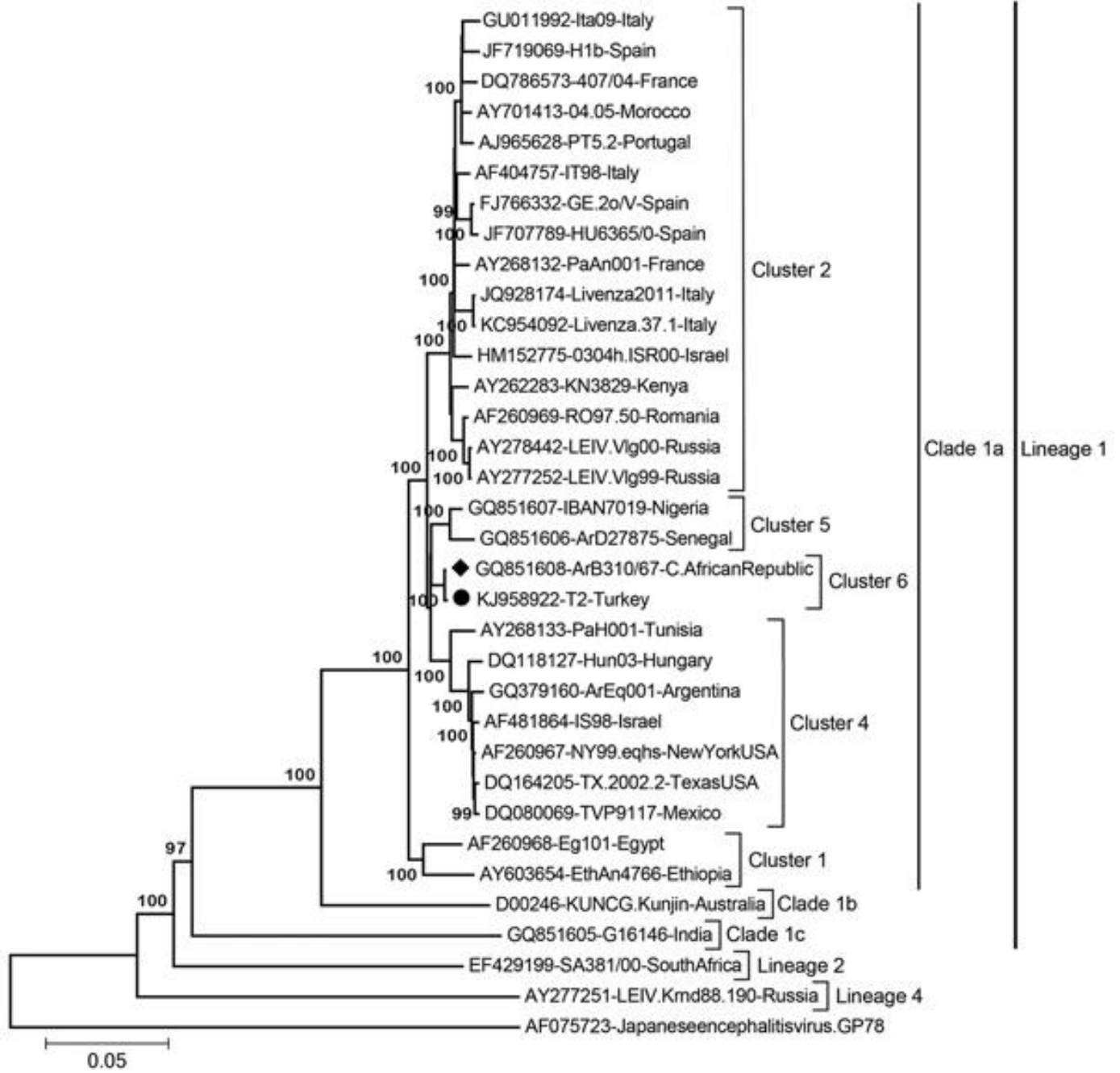
hemaglutininidir. Diğer önemli protein ise PrM olup, bu iki protein virüs replikasyonu, doku tropizmi ve T ve B lenfositlerin uyarılması görevini üstlenirler (Patricia ve Devine, 2003).



Şekil 1.2. Batı Nil virüsü genomu ve kodlanan yapısal-yapısal olmayan proteinlerin şematik gösterimi (ICTV).

1.1.2. Virüsün Filogenetik Özellikleri

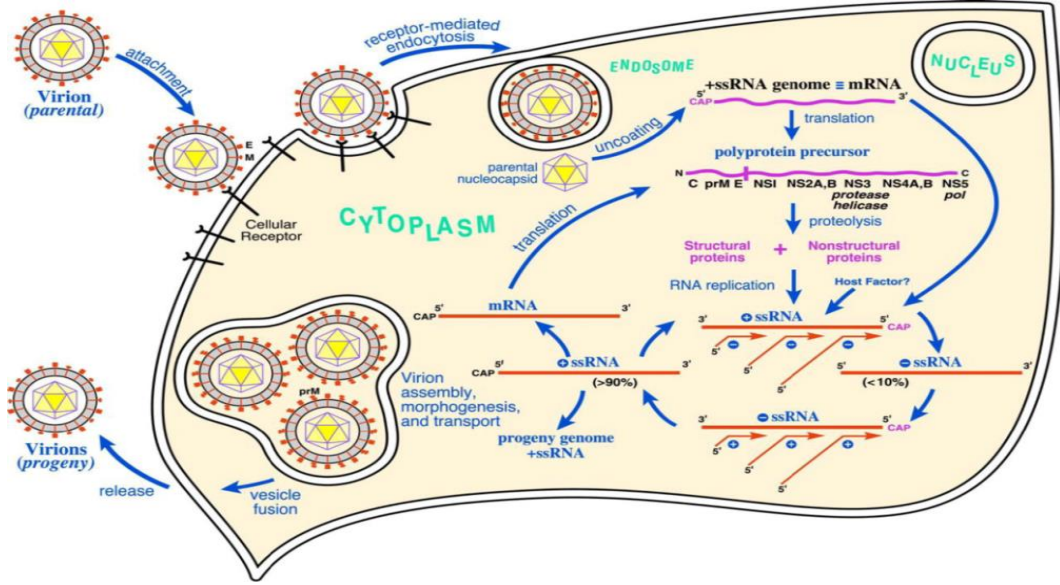
Dünya üzerindeki farklı bölgelerden izole edilen BNV suşlarının filogenetik analizleri 2 esas genotip (lineage-köken) olduğunu göstermektedir. Avrupa, Asya, Kuzey Afrika, Amerika kıtası ve Avustralya'dan izole edilen suşlar köken 1; Afrika ve Madagaskar'dan elde edilenler ise köken 2 kabul edilmektedir. Hastalık ve ölümlerin köken 1'de köken 2'ye göre daha sık görülmesi bu kökenin virülansının daha yüksek olduğunu düşündürmektedir. Köken 2 bulunduğu bölgede etkinlik gösteren daha az virülense sahip kabul edilmektedir. BNV'nin tanımlanan 2 ana genotipi dışında Avrupa, Asya ve Amerika'da yeni genotiplerin dolaşımında olduğu da gösterilmiştir (Bacony ve ark., 2006 ve Bondre ve ark., 2007).



Şekil 1.3. Batı Nil virüsü tüm genom dizilerinin filogenetik Analizi (Ergünay, 2015).

1.1.3. Virüsün Replikasyonu

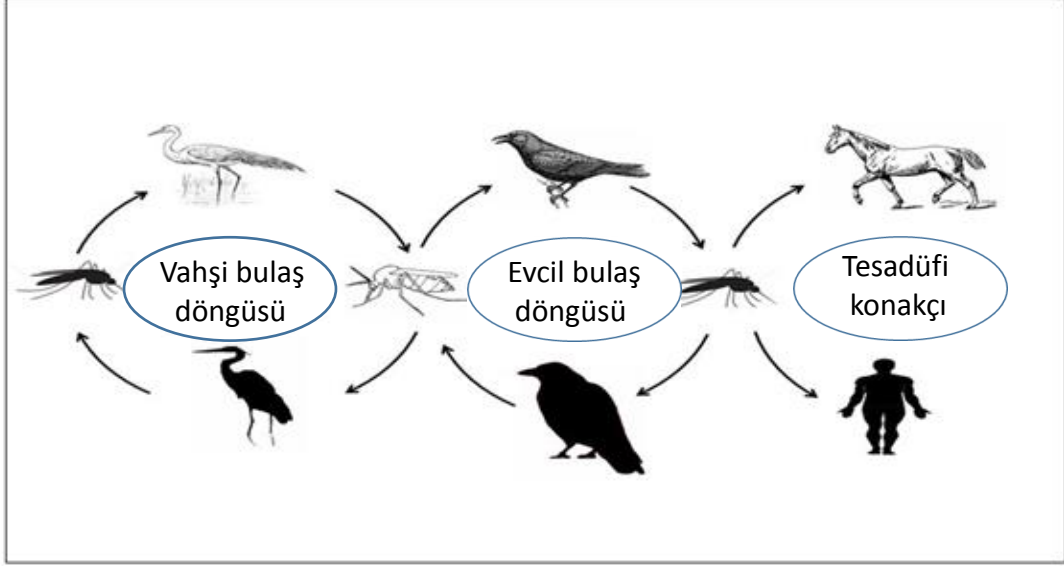
Batı Nil virüsü, doğal rezervuarı olan kuşlarda, konakçıları olan kanatlı, memeli ve vektör sineklerde replike olmaktadır. İn vitro olarak ise virüs insekt türleri gibi, oldukça çeşitli tipte primer ve devamlı hücre kültürlerinde replike olmaktadır (Monarth ve ark., 1996 ve Yazıcı, 2005). Rezervuar ve konakçılarda hücre yüzeyine tutunurken kullandığı reseptörler tam olarak bilinmemekle birlikte virüs tutunduktan sonra endositoz yoluyla hücreye girer (Şekil 1.4). Sitopatoloji, replikasyon yeterli olsa da bazı hücre kültürlerinde gözlenmemektedir. İn vitro koşullarda heparin gibi glikozaminoglikanları dentritik hücre yüzeyine spesifik DC-SIGN, DC-SIGNR gibi lektinler ve Alfa Beta 3 gibi integrinler virüsün bağlandığı reseptörlerdir. Virüsün reseptörlere bağlanması ile gerçekleşen prM ve E proteinlerinin glikolizasyonundan sonra virüse ait nükleokapsid sitoplazma içerisine girer. Bu aşamada RNA mRNA görevini üstlenir ve endoplazmik retikulum ile bağlantılı alana giriş yapar ve komplementer RNA sentezini sağlar. Böylece bu molekülü baz alarak yeni RNA'ların oluşumunu, oluşan yeni RNA'lar ise sentez işleminin devamını sağlar. Bir kısmı ise kapsit içine depolanır. Virus endoplazmik retikulum içerisinde olgunlaşarak tomurcuklanmak suretiyle salınırken olgun M proteinine sahip enfektif virionlar gelişmekte ve eksositoz yolu ile diğer hücrelere geçiş yapmaktadır (Burke ve Monath, 2001; Diamond, 2009).



Şekil 1.4. BNV'nin replikasyon siklusu (National Academy of Sciences, 2002).

1.2. Virüsün Enzoitik Taşınımı ve Patogenezi

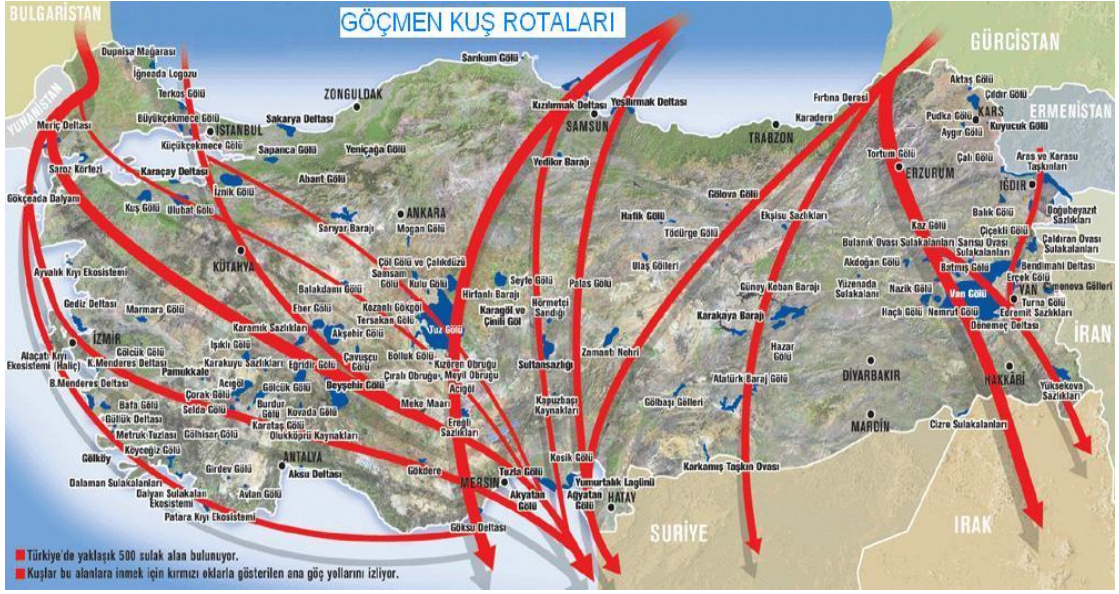
Batı Nil virüsünün ana konakçısı kuşlardır. Kuşlardan kan emmek suretiyle enfeksiyon etkenini alan vektör sivrisinekler virüsü insanlara, atlara ve diğer memelilere bulaştırırlar (Şekil 1.5). Virüs, son konak olan memelilerde biyolojik döngüsünü devam ettirememektedir (Ergünay ve ark., 2010a; Murray ve ark., 2010 ve Zeller ve Schuffenecker, 2004).



Şekil 1.5. Batı Nil virüsünün bulaş döngüsü (Animal and Veterinary Sciences, 2014).

Primer konak kuşlarda vireminin yüksek ve uzun süreli olmasına karşın enfeksiyon genellikle asemptomatiktir. Vireminin süresi 100 günden fazla olabilmekte, bu süre içerisinde tekrarlayan enfeksiyonlar gelişebilmektedir. Kuş türleri arasında letal enfeksiyona karşı duyarlılıklarda da değişkenlik görülmektedir (Gyure, 2009).

Göçmen kuşlar, rezervuar olarak virüsün kıtalar arasında yayılımından sorumludur (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Ülkemizden geçen kuş göç yolları haritası (KGM, 2012).

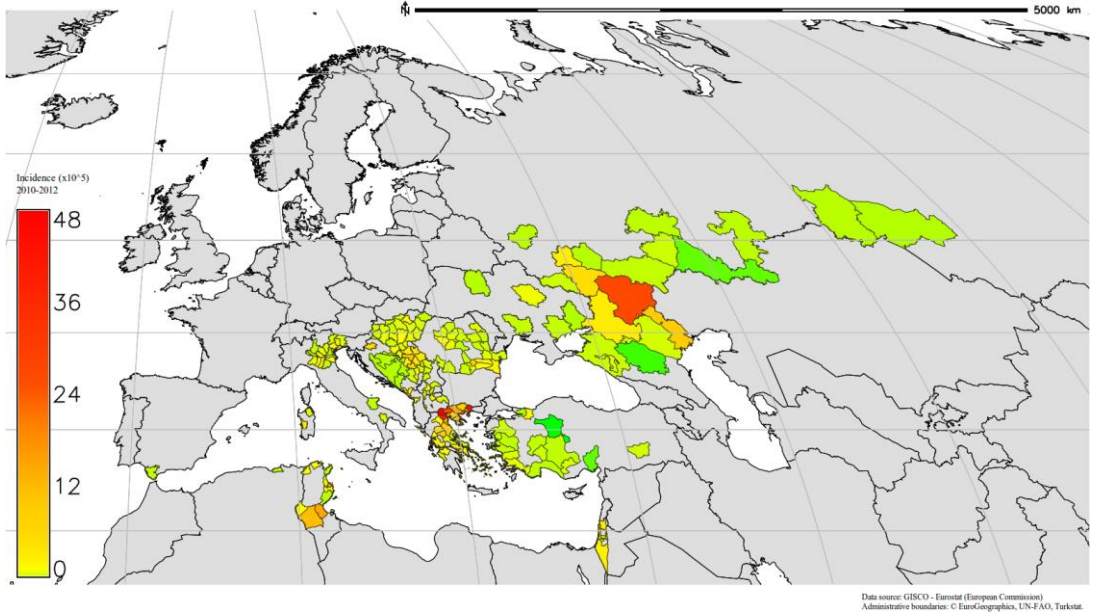
Yaz mevsimi boyunca dolaşımda olan virüs kış mevsiminde dişi vektörlerden vertikal yolla yeni nesillere geçerek enfeksiyonun bir sonraki ilkbahar ve yaz aylarında muhtemel yayılımına neden olmaktadır (Reisen ve Brault, 2007).

Culex cinsi sinekler taşınma siklusunda en önemli vektörler olup, *C. pipiens*, *C. restuans*, *C. quinquefasciatus* ve *C. tarsalis* BNV'nin taşınmasında rol alan önemli türlerdir (Çizelge 1.1). Ancak *Aedes* ve *Anopheles* türleri ile Avrupa, Afrika ve Kuzey Amerika'daki birçok sinek türünden de virüs izole edilmiştir (Hollidge ve ark., 2010).

Çizelge 1.1. BNV genomu tespit edilen sivrisinek türleri (CDC, 2008).

BNV pozitif bulunan sivrisinek türleri		
1	Aedes	<i>Aedes albopictus</i>
2		<i>Aedes cinereus</i>
3		<i>Aedes dorsalis</i>
4		<i>Aedes infirmatus</i>
5		<i>Aedes japonicus</i>
6		<i>Aedes melanimon</i>
7		<i>Aedes nigromaculis</i>
8		<i>Aedes sollicitans</i>
9		<i>Aedes stimulans</i>
10		<i>Aedes taeniorhynchus</i>
11		<i>Aedes triseriatus</i>
12		<i>Aedes trivittatus</i>
13		<i>Aedes vexans</i>
14	Anopheles	<i>Anopheles crucians</i>
15		<i>Anopheles punctipennis</i>
16		<i>Anopheles quadrimaculatus</i>
17	Coquillettidia	<i>Coquillettidia perturbans</i>
18	Culex	<i>Culex coronator</i>
19		<i>Culex erraticus</i>
20		<i>Culex erythrothorax</i>
21		<i>Culex nigripalpus</i>
22		<i>Culex pipiens</i>
23		<i>Culex quinquefasciatus</i>
24		<i>Culex restuans</i>
25		<i>Culex salinarius</i>
26		<i>Culex stigmatosoma</i>
27		<i>Culex tarsalis</i>
28		<i>Culex territans</i>
29	Culiseta	<i>Culiseta incidens</i>
30		<i>Culiseta inornata</i>
31		<i>Culiseta melanura</i>
32		<i>Culiseta morsitans</i>
33	Psorophora	<i>Psorophora columbiae</i>

Sivrisinekler ılıman bölgelerde göl kenarlarına, balçık ve durgun sulara, sazlıklara, su kanallarına yumurtlamakta ve bir kaç hafta içerisinde olgunlaşarak 5-6 ay bu bölgelerde yaşamaktadır. Sivrisinekler yine bu sulak alanlarda kuşların kanını emerek beslenirler. Virus enfekte kan ile vektörün vücuduna alınmakta, mide çeperlerine tutunma sağlandıktan sonra dokularda replike olmakta ve insektin yaşamı boyunca persiste olmasına neden olmaktadır. Vektör hücrelerinde sitopatik etki yapmayan virus, sineklerin yakın bölgelerdeki memelilerden kan emmesi esnasında son konakçılara bulaşarak enfeksiyon sonunda memelilerde ciddi hasara ve enfeksiyona neden olur (Kılıç ve Doğancı, 2003 ve Yazıcı, 2005).



Şekil 1.7. BNV'nin Avrupa'daki yayılımı (2010-2012).

Bazı kaynaklarda virusun anneden yavruya geçtiği ayrıca kan nakli ve organ transplantasyonu ile de diğer bireylere nakledildiği bildirilmiştir (Hayes ve ark., 2005 ve Pealer, 2003).

Memelilerde enfeksiyon enfekte sivrisineğin virüsü deriye inoküle etmesiyle keratinosit, Langerhans ve dendritik hücrelerinde başlamaktadır. Daha sonra lokal dokular ve bölgesel lenf nodüllerinde ilk replikasyon meydana gelmektedir. Virüs lenfatik kanallar ile kan dolaşımına taşınmakta, bu olgu primer viremi olarak

adlandırılmaktadır. Virüsün retiküloendotelyal sisteme yayılması vireminin daha da artmasına sebep olmaktadır. BNV daha sonra sistematik olarak böbrek ve dalak gibi iç organlara, epitel hücrelere ve makrofajlara yayılarak ikinci viremi gerçekleşmektedir. Viremi seviyesine bağlı olarak BNV kan beyin bariyerini geçerek beyine ulaşabilmekte ve meningoensefalite sebep olabilmektedir (Sampathkumar, 2003 ve Tosun, 2010).

1.3. Klinik Bulgular

Virüs sivrisineğin sokması ile vücuda alınır ve 3-15 gün arasında değişen inkubasyon süresi sonunda viremi oluşturur. BNV enfeksiyonu özellikle kuşlarda ölümlere, son konakçı veya tesadüfi konakçı olan insanlarda, atlarda ve diğer memelilerde yaşa bağlı olarak ensefalitle seyreden nörolojik semptomlara ve ölümlere neden olabilmektedir (şekil 1.8).



Şekil 1.8. Ensefalit semptomlu bir at.



Şekil 1.9. Batı Nil Virüs enfeksiyonunun neden olduğu toplu kuş ölümleri.

Virüs ile enfekte atlarda genellikle hastalık bulgusu görülmemektedir. Atlarda hafif ya da şiddetli ataksiler, kaşeksi, kas seyirmeleri ve kafa sinirlerinde fonksiyon bozukluğu görülebilir (Ergünay ve ark., 2010b; Murray ve ark., 2010 ve Rossi ve ark., 2010). Her vakada ateş görülmeyebilir. Bu bulgular geçebilir ya da atın ayakta duramaması bulgusuyla hastalık ağır bir şekilde dönüşebilir. Atlarda görülen en önemli klinik bulgu ensefalittir, ancak bu bulguya nadir olarak rastlanır (Ergünay ve ark., 2010b). Enfekte olan ve klinik bulgulara sahip atlarda %35-40 oranında ölüm şekillenebilmekte veya enfeksiyonun olası komplikasyonları neticesinde ötenazi uygulanabilmektedir. Hasta atlara destekleyici tedavi uygulanabilmekte, iyileşme görülen atlarda kalıcı nörolojik bulgular oluşabilmektedir.

Kan-beyin bariyerini geçen nörotropik bir etken olan virüs doğal olarak enfekte olan atlarda tipik olarak davranış değişikliklerine (uyku hali, halsizlik, endişe-korku hali, depresyon veya aşırı duyarlılık gibi), kas seyirmeleri ve bacak parezisi veya paralizi gibi nörolojik bulgulara sebep olmaktadır (Gyure, 2009). Ateş

dışında BNV'nin klinik bulguları hemen hemen tamamen nörolojiktir (Murray ve ark., 2010).

Çizelge 1.2 BNV ile enfekte atlarda klinik belirtilerin dağılımı (Diamond, 2009).

Bulgular	%
Ataksi	85
Bacaklarda Zayıflık	48
Uzanma-Yatma	45
Kas seyirmeleri	40
Ateş	23
Felçli veya sarkmış dudaklar	18
Yüzde seyirmeler veya ağız açıklığı	13
Diş gıcırdatma	7
Körlük	5

Enfeksiyondan sonra geçici ateşli bir periyot olabilmekte, ancak bu durum her zaman gözlenmemektedir. En yaygın semptomlar omurilik hasarı ile ilişkili olup, bunlar; ataksi, bacaklardaki parezi veya paralizisi (bir, iki veya dört bacağı da etkileyebilmektedir) ve daha sonrasında da sırt üstü yatmaya kadar ilerleyen durum değişiklikleridir. Sıklıkla bu bulgulara deride ince seyirmeler (faskülasyon), kas tremorları ve kas sertliği eşlik etmektedir. ABD'de 1999 yılındaki salgında atların büyük bir kısmının, medulla oblongata, pons, talamus, serebellum ve beyin korteksinde hasar görüldüğü bildirilmiş, bu salgın sırasında bazı atlarda da VII, XII ve IX. kraniyal fasiyal sinir paralizisi, dil parezisi ve disfajinin görüldüğü bildirilmiştir (Gyure, 2009).

BNV ile klinik enfekte atların büyük bir kısmında iyileşme gözlenememekte, enfeksiyon spontan ölüm ya da ötenazi ile sonlanmaktadır. Klinik olarak etkilenen atlarda mortalite oranı 2000 yılında Amerika'daki salgınlarda %38, 2000 yılında Fransa'daki salgınlarda %57,1 ve 1998 yılında İtalya'daki salgınlarda %42 olarak belirtilmiştir (Gyure, 2009; Murray ve ark., 2010 ve Rosa ve ark. 2014).

1.4. Teşhis

Enfeksiyon serolojik, virolojik ve moleküler yöntemlerle teşhis edilebileceği gibi uygun hücre kültürlerinde izolasyonu da yapılabilmektedir. ELISA, Plak Redüksiyon Nötralizasyon testi (PRNT), İndirekt İmmunofloresans testi (IFAT), Hemaglütinasyon inhibisyon (HI) testi ve PCR hastalığın tanısında sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. Çeşitli ülkelerde hayvanlarda hızlı teşhis kitleri ile taramalar yapılmaktadır. Ancak bu tanının doğrulanması için; BNV spesifik antikorların, nükleik asit veya enfeksiyöz virusun kan veya BOS'da gösterilmesi gibi bazı spesifik laboratuvar testlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Petersen ve Maffin, 2002 ve Rossi ve ark., 2010).

1.4.1. Serolojik Teşhis

BNV enfeksiyonu'nun tanısında en uygun yaklaşım serolojidir (Reisen ve Brault, 2007). Bu nedenle tanının, akut olarak enfekte bireylerde virusa spesifik IgM antikorlarının IgM-capture ELISA testi ile serolojik olarak tespit edilmesi gerekmektedir. BNV antijen spesifik ELISA'da enfeksiyonu doğrulamaktadır. Ayrıca akut veya konvelesan serum veya BOS örneklerinde ELISA ile BNV'ye spesifik antikor tespiti ile enfeksiyonun varlığı saptanabilmektedir (CDCD, 2003 ve Rossi ve ark., 2010).

Akut dönem olgularda serolojik hedefli en uygun tanısal yaklaşım, klinik semptomlar görülmeye başladıktan 8-21 gün içinde alınan serum örneklerinde IgM spesifik ELISA uygulamasıdır (Rossi ve ark., 2010). Serumda IgM antikorları 1 yıldan daha uzun süre bulunabilmektedir. Bu nedenle örneklerde saptanabilen IgM antikorların süreci ile ilgili değerlendirmelerde, klinisyenlerin olguya ilişkin klinik değerlendirmeleri önem arz etmektedir. ELISA'nın flaviviruslar arasında çapraz reaksiyon göstermesi sebebiyle, sadece tarama testi olarak kullanılması gerekmektedir. Başlangıçta serolojik olarak pozitif bulunan örneklerin nötralizasyon testi ile doğrulanması gerekmektedir. Bu örneklerin özellikle bölgede aktif olan veya

daha önce varlığı bilinen diğer arbovirüsler yönünden de taranması gerekmektedir (Rossi ve ark., 2010).

Hastalığın serolojik tanısında, plak redüksiyon nötralizasyon testi (PRNT) ve klasik virüs nötralizasyon testleri, antikor spesifitesinin belirlenmesinde altın standart testler olarak kabul edilmektedir. Özellikle akut ve konvelesan dönemde elde edilen serum örneklerinde 4 kat veya daha fazla titre artışı anlamlıdır. HI ve indirekt floresan antikor testi (IFAT) de flavivirüs antikorları yönünden örneklerin taranmasında kullanılabilir (Rossi ve ark., 2010).

1.4.2. Virolojik Teşhis

BNV, Vero veya sivrisinek hücre kültürlerinde izole edilebilmekte, virusa spesifik antiserum kullanılarak, immunfloresan, immunohistokimyasal boyama ve RT-PCR ile identifiye edilebilmektedir. Sivrisinek orijinli hücre kültürlerinde sitopatik etki görülmebilmekte, virüsle enfekte hücrelerin immunfloresan boyama yöntemleri ile doğrulanması gerekmektedir (Rossi ve ark., 2010).

1.5. Korunma ve Kontrol

BNV'nin dünya üzerindeki sürekli yayılımı ve enfeksiyonun insidansı ile ilgili değerlendirmeler, virüsün gelecekte büyük bir halk sağlığı problemi olabileceği ihtimalini göstermektedir. Bu nedenle uygun bir aşı geliştirilmesi konusunda elde edilen çok sayıda deneysel aşının prelinik ve klinik denemeleri umut verici bulunmuştur. Ancak aşı etkinliği ve güvenliğinin, birçok risk altındaki popülasyonda ciddi ve ölümcül BNV enfeksiyonu ile komplike olduğu bildirilmiştir. Bu sebeple aşılamanın yaşlı ve immunsuprese bireylere uygulandığı bildirilmiştir (Samuel ve Diamond, 2006).

İnsanlar için "Food and Drug Administration" (FDA) onayı almış aşı bulunmamasına rağmen (Faz I ve Faz II aşamasında aşı adayları bulunmaktadır),

atların profilaksisi için lisans almış viral vektör ile rekombine edilmiş (Recombitec™), inaktive (Innovator™) ve attenüe aşı alternatifleri bulunmaktadır. BNV aşı geliştirilmesinde değişik stratejiler bulunmakta olup, bunların bazısında klinik denemeler devam etmektedir. Chimerivax-WNO2 aşısı ise canlı, attenüe, rekombinant virüs olup, günümüzde klinik denemelerde oldukça ilerleme kaydetmiştir (Samuel ve Diamond, 2006).

Virüs kimyasal solüsyonlara karşı dayanıklı değildir ve bu nedenle bu solüsyonlarla yapılacak temizlik ve dezenfeksiyon önemlidir. Ülkemizde hastalığın yayılışı vektör ve taşıyıcı konakların izlenmesi ve vektör mücadelesi ile önlenmeye çalışılmaktadır (Hayes ve ark., 2005).

Vektör sinekler uygun şartlar altında fazla miktarda üreme özelliği göstererek mücadelede zorluklara sebep olmaktadır. Bir çok bölgede mücadelede kimyasal solüsyonlar, biyolojik ajanlar ve fiziksel bazı önlemler alınarak enfeksiyonun yayılışı önlenmeye çalışılmaktadır. Ancak özellikle kimyasalların bilinçsiz kullanımı uygulanan bölgenin doğal ekolojik ortamını bozmakta ve diğer canlıların yaşama ve üreme alanları tahrip olmaktadır. Sivrisineklerle mücadelede larvalar üzerinde etkili *Bacillus* bakterileri kullanılabilir. Özellikle enfeksiyonun görüldüğü bölgelerinde vücudu saran kıyafetler, sinek savar spreylere kullanılmalıdır. Kapı ve pencerelerden sinek geçişine engel olacak tenteler takılmalıdır. Ayrıca özellikle göçmen kuşların rotaları üzerinde meydana gelen fazla sayıda kuş ve at ölümleri dikkate alınmalı ve bu hayvanlara ait materyallere direk temas edilmemeli ve bölgedeki yetkili birimler haberdar edilmelidir (Ertürk ve ark., 2009; NCBI, 2017; Özkul ve ark., 2012; Rossi ve ark., 2010 ve Smithburn ve ark., 1940).

1.6. Tezin Amacı

Türkiye’de atlarda Flavivirus enfeksiyonlarının varlığı daha önceden yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Arı, 1972; Heperkan, 1977; Özkul, 2006; Serter, 1980). Söz konusu çalışmalarda atlarda antikor varlığı ELISA yöntemiyle araştırılmış elde edilen sonuçlar ayrıca Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi ile doğrulanmıştır

(Özkul, 2006; Serter, 1980). Ancak bazı Flavivirüslerin antijenik yakınlığından dolayı mevcut test sistemleri ile çapraz reaksiyon verebildikleri düşünüldüğünde, söz konusu çalışmalarda belirtilen seropozitiflik oranları ile etkenin varlığı/yaygınlığı arasındaki ilişki net olarak ortaya konulamamaktadır. Bu nedenle enfeksiyonun atlarda varlığı/yaygınlığının araştırılması ve oluşturduğu klinik bulgulara bağlı olarak ekonomik anlamda etkilerinin belirlenmesine ihtiyaç vardır.

Bu çalışma ile Şanlıurfa ve çevresinde Batı Nil Virüsü enfeksiyonu'nun son konakçısı olan atlarda hastalığın serolojik ve virolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilecek veriler ile özellikle kuşların göç yolunda bulunan ve yerleşik at yetiştiriciliklerinin bulunduğu Şanlıurfa ili ve çevresinde BNV enfeksiyonunun varlığı ve yaygınlığı hakkında bilgi edinilirken, yapılacak moleküler çalışmalar ile virusun genetik karakterizasyonuna yönelik yeni verilerin elde edilmesi hedeflenmiştir.

Bu amaçla atlardan alınan kan serum örnekleri öncelikle BNV'na karşı IgG ve IgM varlığı yönünden ELISA ile test edilmiş, pozitif olarak belirlenen örnekler ile şüpheli örnekler daha sonra PRNT'ye tabi tutularak, bölgedeki gerçek Batı Nil virüs seropozitifliği ortaya konulmuştur. Bu örnekler aynı zamanda RT-PCR testine tabi tutularak viral genomik RNA varlığı da araştırılmıştır.

Araştırma bulguları, çalışmanın yapıldığı coğrafi konumun göçmen kuşların göç yolları üzerinde yer alması, bölgenin ılıman iklim kuşağında bulunması ve sulak arazi oranının yüksek olması enfeksiyonun yayılması açısından önemli ipuçları verirken, çalışmada örneklenen yerleşik at popülasyonu yanında yılın belirli zamanlarında yarış programı kapsamında olan Şanlıurfa'ya ülkenin değişik şehirlerinden gelen yarış atları için de Batı Nil Virüs enfeksiyonu riskinin algılanması ve bu yolla yurdun değişik bölgelerine virüs iletimi olasılıklarının değerlendirilmesi adına önemli bulgular arz etmektedir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Örneklenen İşletmeler

Bu çalışmada, Şanlıurfa il merkezi ve çevresindeki ilçelerde damızlık at yetiştiriciliği yapan 10 ayrı işletmede bulunan toplam 277 attan alınan kan serumu örnekleri kullanıldı (Çizelge 2.1). Mevcut işletmelerde bulunan atların yaşamları boyunca buldukları il/ilçe'den farklı bir yere götürülmedikleri ve Batı Nil virusu enfeksiyonuna karşı aşılama yapılmadığı bildirilmiştir.

Çizelge 2.1. Örnekleme yapılan işletmeler.

İşletme No	İşletmenin Bulunduğu İlçe	Örneklenen Hayvan Sayısı	Örnekleme Zamanı
I	Merkez/Eyyübiye	21	Ocak 2016
II	Merkez/Karaköprü	51	Ocak 2016
III	Siverek	47	Ocak 2016
IV	Siverek/Haliliye	44	Ocak 2016
V	Suruç	53	Ocak 2016
VI	Hilvan	47	Ocak 2016
VII	Akçakale	5	Ocak 2016
VIII	Halfeti	2	Ocak 2016
IX	Viranşehir	1	Ocak 2016
X	Bozova	6	Ocak 2016
Toplam		277	

2.1.2. Hücre

Araştırmada, BNV'nin üretilmesi, virusun titresinin hesaplanması ve PRNT testinde Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı stoklarında mevcut olan Vero E6 (Afrika Yeşil Maymun Böbrek) (ATCC CCL81) devamlı hücre kültüründen yararlanıldı.

2.1.3. Virüs

Araştırmada, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı stoklarında mevcut BNV suşu (West Nile virus NY-99 strain) kullanıldı. Virüs Vero E6 hücre kültüründe üretildi ve aynı hücre kültüründe titrasyonu yapıldı. PRN testinde kullanılacak virüs 3×10^6 /mL plak oluşturan ünite titresinde hazırlanarak test edilinceye kadar -80°C 'lik derin dondurucularda stoklandı.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Kan Serum Örneklerinin Hazırlanması

Silikonlu tüplere alınan kan örnekleri pıhtılaştıktan sonra 2000 devirde 10 dakika santrifüj edilip serumları ayrıldı. Serumlar test edilinceye kadar -20°C 'de muhafaza edildi. PRNT öncesi serum örnekleri 56°C 'de 30 dakika süreyle inaktive edildi.

2.2.2. Virüsün Üretilmesi

Araştırmada kullanılan BNV NY-99 suşu, 24 saat öncesinde uygun ölçüdeki hücre kültürü şişelerinde (75 cm^2) tek tabaka olacak şekilde üretilmiş Vero E6 hücrelerine 0.01 MOI dozda (3×10^4 POU) adsorbsiyonlu teknik ile inokule edildi ve

inkubasyon sonunda, virüs inokulumu dökülmeksizin hücreler Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM- Sigma, ABD) ile inkubasyona alındı. Virüsün inokulasyonu sonrasında hücreler günlük olarak sitopatik etki (CPE) varlığı yönünden izlendi ve hücrelerin % 80-90'ında hücre yuvarlaklaşması ve lizis ile karakterize CPE'nin görüldüğü 4. gün sonunda, hücre kültürü şişesi -80°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı. Ertesi gün uygulanan çözme işlemi sonucu, hücreler şişe yüzeyinden kaldırıldı, hücre süspansiyonu iyice homojenize edilerek, 4°C'de, 3000 devirde 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra virusun bulunduğu üst sıvı alındı ve birer ml'lik hacimlerde porsiyonlanarak -80°C'de saklandı.

2.2.3. BNV Ab ELISA Testi

BNV proteinlerine karşı oluşan antikorların tespiti amacıyla INGEZIM West Nile COMPAC antikor ELISA ticari kiti kullanıldı. Testler üretici firmanın belirlediği prosedüre göre yapıldı. BNV antikor tespiti amacıyla yapılan test basamakları aşağıda bildirildiği şekilde uygulandı:

1. Tüm reaksiyon bileşenleri oda ısısına alındı ve vorteksenerek homojen hale getirildi.
2. 8x12 gözlü ELISA tabletinin her gözüne 40'ar µL sulandırma solüsyonu konuldu. Düşey iki göze (A1, B1) 10'ar µL pozitif kontrol, sonraki 2 göze (C1, D1) 10'ar µL negatif kontrol, kalan diğer gözlere de 10'ar µL test edilecek serumlar sıra dahilinde konuldu, 5 dakika oda sıcaklığında (20-24°C) çalkalayıcıda homojenizasyon sağlandı.
3. Tabletler oda sıcaklığında (20-24°C) ışık görmeyecek şekilde 16-24 saat inkubasyona bırakıldı.
4. Bir gecelik inkubasyondan sonra tüm gözler 300'er µL yıkama solüsyonu ile 3'er kez yıkandı.
5. Bütün gözlere 50 µL konjugat ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 saat inkubasyona bırakıldı.
6. İnkubasyondan sonra tüm gözler 300'er µL yıkama solüsyonu ile 3'er kez yıkandı.
7. Bütün gözlere 50 µL TMB substrat konuldu.

8. Tabletler ışık almayan bir ortamda 15 dakika inkubasyona bırakıldı.
9. Bütün gözlerle 50 µL reaksiyon durdurma solüsyonu eklendi.
10. Sırasıyla tüm tabletler ELISA okuma cihazında 450 nm filtreler ile okundu ve sonuçlar değerlendirildi.

Testin değerlendirilmesi:

$$IP= 100-[(test serum örneğinin OD'si/NC OD)x100]$$

Tüm serum örnekleri için alınan optik dansite (OD) değerleri bu formüle uygulandı ve elde edilen değer % 40'dan büyük ise sonuç **pozitif**, %30'dan küçük ise **negatif** olarak değerlendirildi. Yüzde 30-40 arasında çıkan sonuçlar ise **şüpheli** kabul edilip tekrar test edildi.

2.2.4. BNV IgM ELISA Testi:

Mevcut seropozitif örnekler içerisinde akut BNV'ye spesifik akut dönem antikorların tespiti amacıyla IDEXX West Nile Virus IgM Antikor ELISA ticari kiti kullanıldı. Test üretici firmanın belirlediği prosedüre göre yapıldı. BNV IgM antikorlarının tespiti amacıyla uygulanan test basamakları aşağıda bildirildiği şekilde uygulandı:

1. Bütün reaksiyon bileşenleri oda sıcaklığına alındı ve vortekslenerek homojen hale getirildi.
2. ELISA ön sulandırma tabletleri 2 kısma ayrılarak test basamaklarının ilerleyen prosedürlerine göre dizayn edildi.
3. Ön sulandırma tabletinin her gözüne 90 µL sulandırma solüsyonu konuldu. Ayrılmış olan her iki kısmı için ayrı ayrı ilk iki göze 10 µL pozitif kontrol, sonraki iki göze 10 µL negatif kontrol, kalan diğer gözlerle de 10 µL test edilecek serumlar sıra dahilinde konuldu, 5 dakika oda sıcaklığında (20-24°C) çalkalayıcıda homojenizasyonu sağlandı.

4. İkinci ön sulandırma tableti de belirtilen şekilde dizayn edildi ve her göze 180 µL sulandırma solüsyonu konuldu. Üzerine ilk dilüsyon tabletinden 20'şer µL alındı, 5 dakika oda sıcaklığında (20-24°C) çalkalayıcıda homojenizasyon sağlandı ve ikinci sulandırma basamağı tamamlandı.
5. Sulandırması yapılmış pozitif kontrol, negatif kontrol ve serum örneklerinin her birinden tabletin ayrılmış olan iki kısmına da ayrı ayrı 50'şer µL aktarıldı.
6. Tabletler 37°C'de ışık görmeyecek şekilde 1 saat inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübasyondan sonra tüm gözler 300'er µL yıkama solüsyonu ile 3'er kez yıkandı.
8. İki kısma ayrılmış olan test tabletinin ilk kısmına 50 µL Normal cell antigen (NCA), diğer kısma ise West Nile recombinant antigen (WNRA) ilave edildi ve oda sıcaklığında (20-24°C) 16-24 saat inkübasyona bırakıldı.
9. İnkübasyondan sonra tüm gözler 300'er µL yıkama solüsyonu ile 3'er kez yıkandı.
10. Bütün gözlere 50 µL konjugat ilave edildi ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
11. İnkübasyondan sonra tüm gözler 300'er µL yıkama solüsyonu ile 3'er kez yıkandı.
12. Bütün gözlere 75 µL TMB substrat konuldu.
13. Tabletler ışık almayan bir ortamda 10 dakika inkübe edildi.
14. Bütün gözlere 50 µL reaksiyon durdurma solüsyonu eklendi.
15. Sırasıyla tüm tabletler ELISA okuma cihazında 450 nm filtreler ile okundu ve sonuçlar değerlendirildi.

Testin Değerlendirilmesi:

$$ISR = OD \text{ WNRA} / OD \text{ NCA}$$

Pozitif kontrol, Negatif kontrol ve tüm serum örnekleri bu formüle göre hesaplandı. Çıkan sonuç 3.00'ten büyük ise **pozitif**, 2.00'den küçük ise **negatif**, 2.00 ile 3.00 arasında ise **şüpheli** olarak değerlendirildi.

2.2.5. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT)

ELISA testlerinde pozitif olarak değerlendirilen 42 örnek ile şüpheli aralıkta kalan 16 örnek olmak üzere toplam 58 örnek PRN testine tabi tutuldular. Test aşağıdaki protokole göre uygulandı:

1. Yirmidört gözlü mikrolatelerde Vero E6 hücreleri monolayer olarak üretildi.
2. Serum örnekleri 56°C'de 30 dakika bekletilmek suretiyle inaktive edildi.
3. Her bir örneğin DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) vasatı ile 1/5 oranında sulandırmaları hazırlandı.
4. Stok virüs suşu çözülerek DMEM içinde 3×10^2 POU olacak şekilde ($1/10^4$ oranında) sulandırıldı ve her bir serum dilusyonu ile eşit hacimde (her biri 250µL olacak şekilde) steril eppendorf tüpler içerisinde karıştırıldı.
5. İnkubatörde (37°C'de) 1 saat inkubasyondan sonra virüs ile karıştırılmış örnek sulandırmaları 24 gözlü tablette üretilmiş ve vasatları boşaltılmış hücre kültürü üzerine 200'er µL inokule edildi.
6. Her örnek sulandırması için ikişer göz kullanıldı.
7. Mikroplate'in son sırasındaki birer göz ise hücre kontrol ve virüs kontrol için ayrıldı.
8. Mikrolateler %5 CO₂'li etüvde 37°C'de 1 saat inkübe edilerek virüsün hücelere adsorbsiyonu sağlandı.
9. İnkübasyon sonunda her göze 2 ml hacimde DMEM içinde hazırlanan %1.6'lık karboksi-metil-selüloz (CMC-Sigma-Aldrich) ilave edildi.
10. Günlük olarak plak varlığının izlenmesi amacıyla 37°C'lik CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı.
11. İnkübasyonun 4. gününde hücre üzerindeki CMC uzaklaştırılmadan tüm gözlere % 10'luk formaldehit solüsyonu eklendi ve hücreler 20 dakika süreyle oda ısısında fikze edildi.
12. Fikzasyon sonrası hücreler % 0,35'lik kristal viyole ile boyandı ve kurutuldu.
13. Her örnek sulandırmasına ait gözlerde oluşan plaklar sayıldı.

Testin Değerlendirilmesi:

Hücre kontrol gözlerinde hiç plak oluşmaması ve virüs kontrol gözlerinde % 80'den fazla plak oluşumunun (en az 200 plak) tespit edilmesi testin geçerli sayıldığını göstermektedir.

Virüs kontrol gözlerinden elde edilen ortalama plak ile serum sulandırmalarının bulunduğu gözlerdeki ortalama plak sayısı karşılaştırıldı. Virus kontrol gözlerindeki

plak sayısının % 80 ve daha yüksek oranda azalmasına yol açan serum sulandırması o örneğin BNV'ye karşı spesifik nötralizan antikor taşıdığı yönünde değerlendirildi.

CMC Hazırlanması:

- 1- 7,5 gr CMC, 10 mL % 100 Etil Alkol içinde çözüldükten sonra 20 mL distile su karışımı ilave edildi ve mikrodalga fırında dikkatlice eritildi.
- 2- Manyetik karıştırıcıda 15 dakika homojenize edildi ve otoklavlandı.
- 3- DMEM'den 5,095 gram tartıldı ve 250 mL distile su ile sulandırıldı.
- 4- 14 mL Na-karbonat karışımından (3gr NAHCO_3 + 40 mL distile su) ilave edildi ve manyetik karıştırıcıda homojenize edildi.
- 5- Otoklavdan çıkan CMC soğuduktan sonra 2×DMEM karışımı enjektör filtre ile süzülerek buraya eklendi.
- 6- Antibiyotik (100 IU Penisilin ve 0,1 mg Streptomisin) eklenerek kullanıma hazır halde tutuldu.

% 10 Formaldehit:

10 ml %37'lik formaldehit ile 90 mL distile su homojenize edildi ve kullanıma hazır halde tutuldu.

Kristal Viyole:

- 1- 1,7 gram kristal viyole, 10 mL % 95'lik etanolde çözüldü.
- 2- Distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.
- 3- Homojenize edilerek kullanıma hazır hale getirildi.

2.2.6. Real Time Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (rtRT-PCR)

Seropozitif 42 ve şüpheli 16 olmak üzere toplam 58 örnek teste tabi tutuldu.

Seropozitif ve RNA ekstraksiyonu: Viral genomik RNA izolasyonu ticari QIAamp Viral RNA Mini Kit kullanarak, aşağıda bildirilen şekilde yapıldı.

1. Test edilecek serum örneğinden 200 µL eppendorf tüpüne alındı.
2. Yirmi µL proteinaz K ilave edildi ve 10 saniye vorteksenerek homojenizasyon sağlandı.
3. Karışıma 100 µL VXL buffer eklendi ve 10 saniye vorteksenerek homojenizasyonu sağlandı. Elde edilen karışım 15 dakika oda sıcaklığında (20-24°C) bekletildi.
4. Süre sonunda elde edilen karışıma 350 µL ABC buffer ilave edildi ve vorteksenerek homojenize edildi.
5. Elde edilen ürünün tamamı Qiamp kolonuna aktarıldı ve 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası kolon temiz bir tüpe aktarıldı.
7. Üzerine 600 µL AW1 eklendi ve 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildi.
8. Santrifüj sonrası kolon temiz bir tüpe aktarıldı.
9. Üzerine 600 µL AW2 eklendi ve 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildi
10. Santrifüj sonrası kolon temiz bir tüpe aktarıldı, tüp ve boş kolon 14000 devirde 2 dakika santrifüj edildi.
11. Santrifüj sonrası kolon temiz bir tüpe aktarıldı ve kolonun altındaki beyaz membranın tam merkezine gelecek şekilde 50 µL AVE buffer ilave edildi ve oda sıcaklığında (20-24°C) 1 dakika bekletildi.
12. 14000 devirde 1 dakika santrifüj edildi.
13. Tüp içerisindeki 50 µL'lik süpernatant viral RNA kaynağı olarak kullanıldı.

rtRT-PCR testi: BNV IgM pozitif bulunan test serumları viral genomik RNA varlığı açısından gerçek zamanlı ters transkripsiyonlu polimeraz zincir reaksiyonuna tabi tutuldu. Bu amaçla Thermo Fisher tarafından geliştirilmiş Lineage-1 ve Lineage-2'yi tespit etme özelliğine sahip primer ve prob kullanıldı.

Primer ve prob dizaynları aşağıda sunulmuştur.

NS2A-Fwd 5'-GGG CCT TCT GGT CGT GTT C-3'

NS2A-Prob 5'-FAM-CCA CCC AGG AGG TCC TTC GCA A-TAMRA-3'

NS2A-Rev 5'-GAT CTT GGC YGT CCA CCT C-3'

Kullanılacak internal pozitif kontrol için primer ve prob dizaynları aşağıda sunulmuştur.

NS5-2-Fwd	5'-GAA GAG ACC TCG GGC TCA TG-3'
NS5-2-Prob	5'-VIC-CCA ACG CCA TTT GCT CCG CTG-TAMRA-3'
NS5-2-Rev	5'-CGG TAG GGA CCC AAT TCA CA-3'

Testte kullanılacak Realtime RT-PCR reaksiyon karışımını hazırlamak için gerekli bileşenler tabloda belirtildiği miktarlarda kullanıldı.

Çizelge 2.2. Real Time RT-PCR karışım bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Miktar(μ L)
2×Reaksiyon Karışımı	12,5 μ L
Primer Forward (50 pmol/ μ L)	1 μ L
Primer Reverse (50 pmol/ μ L)	1 μ L
DNase, RNase ari H ₂ O	5,00 μ L
Superscript mix	0,5 μ L
Toplam	20 μ L

Elde edilen Realtime RT-PCR reaksiyon karışımını 5 μ L RNA ekstraktı ile +4°C'deki soğutucu bloklarda karıştırıldı. Elde edilen 25 μ L üründeki saptama CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System cihazı ile çizelgede verilen süre ve döngülerden oluşan programla gerçekleştirildi.

Çizelge 2.3. Real Time RT-PCR ısı döngüsü ve döngü sayısı.

Safhalar	Sıcaklık	Süre	Siklus sayısı
cDNA Sentezi	50° C	15 dk	1
Ön Denatürasyon	95° C	120 sn	1
Denatürasyon	95° C	10 sn	35
Bağlanma/Uzama	60° C	30 sn	

Değerlendirme:

Test örneklerine ait elde edilen sonuçlar pozitif ve negatif kontrollerle karşılaştırılarak değerlendirildi. Pozitif örneklerde Ct değeri 35'den küçük ve yükselen bir sigmoid logaritmik eğri gözlemlendi. Negatif kontrol ve negatif örneklerde ise Ct değeri 35'ten büyük ve düz bir floresan çizgisi izlendi. Ct değeri 30-35 arasında olan örnekler ise zayıf pozitif olarak değerlendirildi ve tekrar test edildi.

3. BULGULAR

3.1. Virüsün Titresi

BNV suşunun Vero E6 hücre kültürüne yapılan inokulasyonu takiben 4. günde Batı Nil virüsü için tipik sitopatik değişiklikler izlendi. Araştırmada kullanılan WNV suşunun Vero E6 hücre kültüründe yapılan plak testinde enfeksiyözite gücü 3.0×10^6 PFU/ml olarak belirlendi.

3.2. ELISA Sonuçları

Örnekleme yapılan toplam 10 adet işletmenin 6 tanesinde Batı Nil virüsüne ait antikor varlığı tespit edildi. Toplam 277 at'a ait kan serum örneğinin Ab ELISA ile kontrolü sonucunda örneklerin 42 adeti seropozitif olarak tespit edildi. On altı adet serum örneği ise testin değerlendirme kriterine göre şüpheli olarak değerlendirildi. Söz konusu şüpheli örnekler 2. kez aynı teste tabi tutuldu ve yine şüpheli aralıkta değerlendirildiler. Seropozitif olarak tespit edilen örnekler (42 adet) ile şüpheli aralıkta kalan örnekler (16 adet) IgM ELISA testi ile ikinci bir teste tabi tutularak söz konusu seropozitif hayvanların kaçının akut enfekte olduğunun tespiti yapıldı. Söz konusu 42 seropozitif örnekten 1 adeti IgM pozitif olarak bulunurken geri kalan 41 örnek IgG olarak değerlendirildi. Şüpheli aralıkta yer alan 16 adet örnekten hiçbirinde IgM varlığı tespit edilmedi. ELISA sonuçları işletmeler bazında değerlendirildiğinde; IgG pozitif bireyler I, II, III, IV, V ve VI numaralı işletmelerde tespit edilirken, IgM pozitif örnek IV numaralı işletmede saptandı (Çizelge 3.1). İşletmelere göre pozitiflik oranı IgG spesifik antikor varlığı değerlendirilmek suretiyle; I numaralı işletme için % 14,28, II numaralı işletme için %9,80, III numaralı işletme için %14,89, IV numaralı işletme için %4,54, V numaralı işletme için %20,75, VI numaralı işletme için %27,65 olarak bulundu. IgM spesifik antikor varlığı değerlendirilmek suretiyle IV numaralı işletme için bu oran %2,27 olarak bulundu.

Çizelge 3.1. İşletmelere göre ELISA sonuçlarının dağılımı.

İşletme No	İşletmenin Bulunduğu İlçe	Örneklenen Hayvan Sayısı	Negatif	Pozitif (%)	
				BNVAb (+)	IgM (+)**
I	Merkez/Eyyübiye	21	18	3 (14,2)	-
II	Merkez/Karaköprü	51	46	5 (9,8)	-
III	Siverek	47	40	7 (14,8)	-
IV	Siverek/Haliliye	44	41	2 (4,5)	1 (2,3)
V	Suruç	53	42	11 (20,7)	-
VI	Hilvan	47	34	13 (27,6)	-
VII	Akçakale	5	5	0	-
VIII	Halfeti	2	2	0	-
IX	Viranşehir	1	1	0	-
X	Bozova	6	6	0	-
Toplam		277	235	42(15,1)	1(0,3)

Çizelge 3.2. ELISA testleri ile PRNT Sonuçları Karşılaştırma Tablosu.

Sıra No.	Örnek No.	WNV Ingezim Compac Ab ELISA Sonucu	WNV Idexx IgM Ab ELISA	PRNT
1	78	Pozitif	Negatif	POZİTİF
2	82	Pozitif	Negatif	Negatif
3	83	Pozitif	Negatif	POZİTİF
4	84	Pozitif	Negatif	Negatif
5	85	Pozitif	Negatif	Negatif
6	92	Pozitif	Negatif	POZİTİF
7	163	Pozitif	Negatif	POZİTİF
8	171	Pozitif	Negatif	POZİTİF
9	174	Pozitif	Negatif	POZİTİF
10	177	Pozitif	Negatif	Negatif
11	178	Pozitif	Negatif	POZİTİF
12	179	Pozitif	Negatif	Negatif
13	186	Pozitif	Negatif	Negatif
14	188	Pozitif	Negatif	Negatif
15	192	Pozitif	Negatif	POZİTİF
16	193	Pozitif	Negatif	Negatif
17	195	Pozitif	POZİTİF	Negatif
18	196	Pozitif	Negatif	Negatif
19	204	Pozitif	Negatif	Negatif
20	218	Pozitif	Negatif	Negatif
21	219	Pozitif	Negatif	Negatif
22	220	Pozitif	Negatif	Negatif
23	223	Pozitif	Negatif	Negatif
24	224	Pozitif	Negatif	Negatif
25	225	Pozitif	Negatif	Negatif
26	228	Pozitif	Negatif	Negatif
27	231	Pozitif	Negatif	Negatif
28	233	Pozitif	Negatif	Negatif
29	234	Pozitif	Negatif	POZİTİF
30	235	Pozitif	Negatif	POZİTİF
31	236	Pozitif	Negatif	Negatif
32	237	Pozitif	Negatif	Negatif
33	238	Pozitif	Negatif	POZİTİF
34	240	Pozitif	Negatif	Negatif
35	241	Pozitif	Negatif	Negatif
36	242	Pozitif	Negatif	Negatif
37	248	Pozitif	Negatif	Negatif
38	251	Pozitif	Negatif	Negatif
39	254	Pozitif	Negatif	Negatif
40	257	Pozitif	Negatif	Negatif
41	259	Pozitif	Negatif	Negatif
42	269	Pozitif	Negatif	Negatif

3.3. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT) Sonuçları

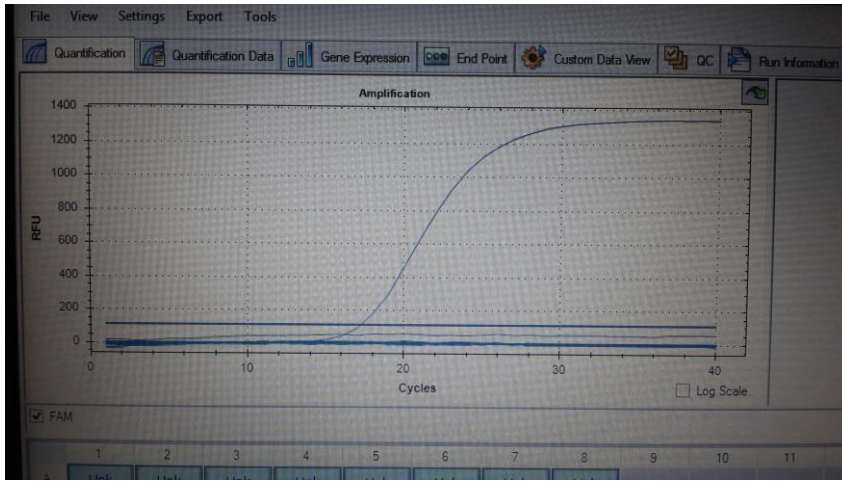
Batı Nil Virüse ilişkin serokonversiyonların tespiti için üretilen ELISA temelli test sistemleri, Flavivirus cinsi içindeki diğer virüslere karşı oluşan antikorlar ile çapraz reaksiyon verebilmekte, yapılan çeşitli araştırmalarda BNV ELISA Antikor test sistemlerinin St Louis ensefalitis virüs, Japon ensefalitis virüs, Usutu virüs veya tick-borne encephalitis (TBE) gibi diğer bazı flaviviruslara karşı oluşan antikorlar ile çapraz reaksiyon verebildiği belirtilmektedir. PRNT testi BNV için uygulanan serolojik testler arasında en spesifik olanıdır ve OIE tarafından da önerilmektedir (OIE, 2008). Bu nedenle ELISA testi ile tespit edilen seropozitifliklerin Batı Nil virüs'e karşı spesifik olup olmadığının saptanmasına yönelik olarak BNV ELISA pozitif tespit edilen 42 örnek ile şüpheli 16 örnek Plak Redüksiyon Nötralizasyon testine alındı. BNV ELISA IgG pozitif 42 örnek içinden 11 adedi (% 26,1) PRN Testinde pozitif olarak tespit edildi ve bu bireyler BN virüse karşı spesifik antikor oluşturan bireyler olarak kabul edildi. ELISA ile IgM pozitif olarak değerlendirilen 1 örnekte ve 2 kez tekrarlanan IgG ELISA testi sonucunda şüpheli aralıkta yer alan 16 örneğin hiçbirinde PRN testinde pozitiflik saptanmadı. ELISA ve PRN testlerinin sonuçları karşılaştırmalı olarak Çizelge 3.2'de sunuldu.

Çizelge 3.3. ELISA ve PRNT sonuçlarının ilçelere göre dağılımı.

İşletmenin Bulunduğu İlçe	Örneklenen hayvan sayısı	ELISA Pozitif hayvan sayısı (%)	PRNT Pozitif hayvan sayısı (%)
Merkez/Eyyübiye	21	3 (14,2)	1 (4,7)
Merkez/Karaköprü	51	5 (9,8)	4 (7,8)
Siverek	47	7 (14,8)	3 (6,3)
Siverek/Haliliye	44	3 (6,8)	0
Suruç	53	11 (20,7)	1 (1,8)
Hilvan	47	13 (27,6)	2 (4,2)
Akçakale	5	0	0
Halfeti	2	0	0
Viranşehir	1	0	0
Bozova	6	0	0
Toplam	277	42 (15,1)	11 (3,9)

3.4. Real Time Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

Ab ELISA pozitif (42 adet) ve şüpheli (16 adet) bulunan toplam 58 serum örneğinin ekstraksiyonu yapıldı. Elde edilen ürün Real Time RT-PCR ile test edildi. Ellisekiz örneğin hiçbirinde Lineage 1 ve Lineage 2'ye dahil BNV genomik RNA'sı tespit edilemedi.



Şekil 3.1. Real Time RT-PCR test sonucu görüntüsü.

4. TARTIŞMA

Virüs ilk kez Uganda'da Batı Nil adı verilen bölgede yüksek ateşi olan bir kadın hastadan izole edilmiştir (Smithburn ve ark., 1940). Virüs farklı zamanlarda özellikle Afrika ve Asya'nın orta kısımlarında yine yüksek ateşe sahip çocuklardan izole edilmiş ve Batı Nil Ateşinin etkeni olduğu kabul edilmiştir. İsrail'de 1957 yılında yaşlı bireylerde meydana gelen BNV ensefalit olguları, virüsün ciddi merkezi sinir sistemi enfeksiyonuna sebep olabileceğini gösteren ilk bulgular olarak gösterilmiştir (Chambers ve Monath, 2003 ve Hayes ve ark., 2005). BNV'nin sebep olduğu at ensefaliti olguları ise ilk kez 1960'lı yılların başlarında Mısır ve Fransa'da bildirilmiştir (Chambers ve Monath, 2003).

Güney Afrika'da 1974 yılında BNV'nin sebep olduğu yaklaşık 10.000 ateşli insan olgusu, en büyük BNV salgını olarak bilinmektedir (Chambers ve Monath, 2003). Romanya'da 1996 yılında BNV, arboviral ensefalitin büyük bir sebebi olarak ortaya çıkmış olup, altısı ölüm ile sonuçlanan 393 ensefalitli insan olgusu bildirilmiştir. Bindokuzyüzdoksanaltı yılından sonra insanlarda ve atlarda BNV ensefalit olgularının Akdeniz havzasında, Rusya ve Avusturya'da hızlı bir şekilde arttığı bildirilmiştir (Chambers ve Monath, 2003).

Batı Nil virüs enfeksiyonu çeşitli zamanlarda Asya, Afrika, Orta doğu, Balkanlar, Avrupa'nın doğusu ve güneyinde atlar ve diğer memelilerde salgınlara neden olmuştur. Günümüzde Avrupa, Orta Asya, Afrika, Asya, Avustralya ve Kuzey Amerika'da endemik olarak görülen Batı Nil Virüs enfeksiyonu ülkemizdeki varlığının belirlenmesinden sonra da dikkat çekici bir noktaya gelmiştir (Hayes ve ark., 2005; Monarth ve Heinz, 1996 ve Tosun, 2011).

Ülkemizde Batı Nil virüs enfeksiyonu ile ilgili insanlarda da yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu konuda yapılmış ilk serolojik araştırma, 1964'de Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü'nden Heperkan ve Arı ile John Hopkins üniversitesinin beraber yaptığı çalışma olup İzmir, Erzurum, Adana ve Diyarbakır illerinde beş yaş altı, 6-15 yaş ve 16 yaş üstü olmak üzere üç gruptan toplam 559 serum örneğinde

hemaglutinasyon inhibisyon yöntemiyle Batı Nil veya buna benzer bir ajanla meydana gelen bir enfeksiyonun ülkemizde varlığı gösterilmiştir (Heperkan ve Arı, 1964).

Serter (1966) tarafından yapılan bir araştırmada İzmir ve civarından sinirsel belirtilerle hastaneye gelen bireylerin üçte birinin Batı Nil virüs ile enfekte olduğu ve vakaların çoğunun Arboviruslar tarafından meydana gelen geçirilmiş enfeksiyonlar olduğu ileri sürülmüştür. Araştırmacı benzer şekilde İzmir ve çevresinde tick-borne virüs meningoensefalitlerini araştırmış ve Tick-borne, West Nile, Dengue Fever, Tahyna ve Sindois virüslerine karşı antikor varlığını tespit etmiştir (Serter, 1968).

Radda (1971) tarafından Ankara ve Hatay illerini kapsayan ve Batı Nil virüs sirkülasyonunun araştırıldığı bir çalışmada 214 adet evcil hayvan serumunda yapılan antikor taraması neticesinde %0,9-20 arasında değişen oranlarda pozitiflik elde edilmiştir.

Heperkan ve Arı (1964) yaptıkları bir çalışmada; İzmir, İstanbul, Ankara ve Konya'da koyun ve insan serumlarında BNV seropozitifliğini tespit etmiş, sonuçta Batı Nil virüsü kaynaklı enfeksiyonların ülkemizde varlığını bildirmişlerdir.

Meço (1977), Güneydoğu Anadolu bölgesinde 1970'lerde yaptığı bir çalışmada 937 bireye ait kan serumu örneklerinde hemaglutinasyon inhibisyon yöntemiyle BNV seropozitifliğini araştırmış ve bu bölgedeki farklı illerde %38 - 47,8 arasında değişen oranlarda seropozitiflik bulmuş ve seropozitifliğin yaşla birlikte arttığını vurgulamıştır.

Serter'in 1980'de yürüttüğü bir başka çalışmada ise Ege illerinde yaptığı örneklemelerde hemaglutinasyon inhibisyon ile 1074 bireyin %29,1'inde virusa spesifik antikorlar saptanmış, bunun %74'ü de nötralizasyon testi ile doğrulanmıştır (Serter, 1980). Fakat elde edilen verilerin yüksek oranda Flavivirüsler arasında meydana gelen antijenik çapraz reaksiyonlardan kaynaklandığı belirtilmiştir.

Batı Nil virüs enfeksiyonu ülkemizde son 15 yıl içerisinde özellikle at yetiştiriciliği yapılan işletmelerde önemli bir enfeksiyon olarak karşımıza çıkabilmektedir. Ülkemizde yapılan bildirimler incelendiğinde enfeksiyonun özellikle ilkbahar yaz mevsimlerinde havanın ısınması ile artış gösterdiği, göçmen kuş popülasyonlarının durak yerlerinde ve sulak arazi oranının fazla olduğu bölgelerde yayılıma sahip olduğu görülmektedir (Ergünay ve ark., 2010; Özer ve ark., 2007)

Bu tez çalışması kapsamında Şanlıurfa ve çevresinde yerleşik bulunan ve sağlıklı görünen Batı Nil Virüsü enfeksiyonunun son konakçısı olan damızlık atlarda hastalığın serolojik ve virolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla Şanlıurfa il merkezi ve çevresindeki ilçeleri kapsayan toplam 10 farklı merkezde yer alan ve mevcut yerlerinden örnekleme anına kadar farklı bir yere götürülmeyen ve yer değişikliği yapılmayan toplam 277 sağlıklı görünümlü damızlık ata ait kan serumu örnekleri kullanılmıştır. Söz konusu örnekler öncelikle Batı Nil virüsüne karşı antikor ELISA testine tabi tutulmuş, test edilen toplam 277 ata ait kan serumu örneğinin 42 adedinde (%15,1) antikor varlığı saptanmıştır. On altı adet serum örneği ise testin değerlendirme kriterine göre şüpheli aralıkta bulunduğundan dolayı 2. kez aynı teste tabi tutulmuş ve yine şüpheli aralıkta kalmışlardır. Çalışmada örneklenen hayvanların kan serumlarına yapılan ELISA testleri ile öncelikli olarak hayvanların enfeksiyona maruz kalıp kalmadığı tespit edildi. Antikor pozitif olarak tespit edilen hayvanlar bu defa Batı Nil virüsü IgM ELISA testine tabi tutularak hangilerinin akut enfekte, hangilerinin ise konvelesan dönemde olduğunun tespitine yönelik bir çıkarıma tabi tutuldular.

Seropozitif olarak tespit edilen 42 adet örnek ile 16 adet şüpheli örnek IgM ELISA testi ile ikinci kez test edildi ve 42 örneğin 1 adeti IgM pozitif olarak saptanırken geri kalan 41 örnek IgG pozitif olarak değerlendirildi. Söz konusu IgM seropozitif hayvanın IV no'lu merkezden örneklendiği ve mevcut 3 adet seropozitifliğin iki adedinin IgG ve bir adedinin IgM şeklinde olduğu sonucuna varıldı. Şüpheli 16 örnekten de herhangi birisinde IgM seropozitifliği saptanmadı. Her ne kadar IgM varlığı klasik enfeksiyonlar için akut enfeksiyon tablosunun bir göstergesi olarak kabul edilse de Batı Nil ve diğer bazı arbovirüs enfeksiyonları

sırasında primer enfeksiyonu izleyen 3. aya kadar spesifik IgM tespitleri bildirilmiştir. Bu bilgidен hareketle araştırma kapsamında tespit edilen IgM pozitif hayvan için muhtemel bir yeni enfeksiyondan bahsedilebilmektedir. Diğer taraftan bu hayvana ait serum örneği ile yapılan PRN testinde nötralizan antikor tespiti gerçekleştirilememiştir.

Örneklemenin yapıldığı on adet merkezden 6 adedinde (I, II, III, IV, V, VI) antikor varlığı tespit edilirken, 4 adet merkezden örneklenen hayvanların kan serum örneğinde (VII, VIII, IX, X) antikor varlığına rastlanmamıştır.

Antikor varlığı tespit edilen merkezler tek tek değerlendirildiğinde; en yüksek seropozitiflik oranı VI no'lu merkezde %27,6 (13/47) olarak tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla; V nolu merkezde %20,7 (11/53), III no'lu merkezde %14,8 (7/47), I no'lu merkezde %14,2 (3/21), II no'lu merkezde %9,8 (5/51) ve IV no'lu merkezde %6,81 (3/44)'lik seropozitiflik değerleri takip etmiştir.

Araştırmaya katılan VII, VIII, IX ve X no'lu merkezlerde ise herhangi bir antikor türü yönünden seropozitifliğe rastlanamamıştır. Söz konusu merkezlerden yapılan örnekleme sayısına bakıldığında VII no'lu merkezden 5, VIII no'lu merkezden 2, IX no'lu merkezden 1 ve X no'lu merkezden 6 örneğin kullanıldığı görülmektedir. Bu merkezlerden yapılan örneklemlerden elde edilen sonuçlar enfeksiyonun o işletmelerdeki varlığı veya yokluğu hakkında söz söyleyebilmek için yetersiz olarak değerlendirilmiştir. Ancak örneklem büyüklüğünün biraz daha fazla olduğu komşu ilçelerin sonuçlarına bakıldığında, söz konusu hastalığa yönelik seroprevalansın %9,8 (II no'lu merkez) ile %27,6 (VI no'lu merkez) arasında değiştiği görülmektedir.

Araştırmada örneklenen 277 at serumuna yapılan ELISA testleri sonunda toplam 42 adet örnekte antikor varlığı tespit edilmiştir. Ancak bazı serolojik metotların Flavivirüslerle ilişkili bazı antikorlar ile (örn; St. Louis encephalitis virüs, Usutu virüs, Japanese encephalitis virüs, tick born encephalitis virüs gibi) çapraz reaksiyonlar verebileceği ve spesifik olmayan pozitifliklerin şekillenmesine neden olabileceği unutulmamalıdır. Nitekim Dünya Hayvan Sağlığı Organizasyonu'nun

(OIE, 2008) ilgili web sayfalarında da konu ile ilgili dikkat çekilerek, Batı Nil virüs'e karşı serolojik testler içinde en spesifik olan testin PRNT olduğu ifade edilmekte ve önerilmektedir. Bu nedenden dolayı araştırmada elde edilen toplam 42 adet ELISA seropozitif ve 16 adet şüpheli örneğe PRNT uygulanmıştır. Test sonucunda toplam 42 adet pozitif serum örneğinin 11 adedinde (%26,1) Batı Nil virüsü antikor tespit edilmiştir. PRNT sonuçları göz önüne alındığında örneklemelerin yapıldığı toplam 10 adet merkezin 5'inde Batı Nil virüse karşı spesifik antikor taşıyan bireyler tespit edilmiştir. Örneklemelerin yapıldığı merkezler tek tek değerlendirildiğinde ise Batı Nil virüse karşı oluşmuş spesifik antikor varlığının en yüksek II no'lu merkezde %7,8 (4/51) olduğu tespit edilmiştir. Diğer seropozitif merkezlerde bu oran sırasıyla; III no'lu merkezde %6,3 (3/47), I no'lu merkezde %4,7 (1/21), VI no'lu merkezde %4,2 (2/47) ve V no'lu merkezde %1,8 (1/53) olarak bulunmuştur (Çizelge 3.3). Araştırmada IV, VII, VIII, IX ve X no'lu merkezlerden yapılan örneklemelerde ise Batı Nil virusa spesifik antikor varlığı taşıyan bireylere rastlanmamıştır. ELISA testi ile seropozitif olarak tespit edilen ancak PRNT'de negatif olarak değerlendirilen örneklerdeki, ELISA antikor pozitifliğinin, aynı grup virüslerle olası çapraz reaksiyonlara bağlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Sırbistan'da yapılan benzer bir çalışmada da 2007-2011 yılları arasında 252 attan toplanan serum örnekleri ELISA (Ingezim West Nile Compac ELISA, İspanya) ile teste tabi tutulmuş ve 72 adet örnek (%28,5) seropozitif olarak tespit edilmiştir. Mevcut 72 seropozitif örneğe yapılan PRNT sonucunda örneklerden 48 adedinin (%19) spesifik Batı Nil virüse karşı oluşmuş antikor taşıdığı sonucuna varılmıştır (Medić S. ve ark., 2014).

Bölgesel virüs sirkülasyonunun doğrulanmasına yönelik olarak bölgedeki insanlarda yapılan farklı serolojik taramalar da çalışmamızın sonuçlarını destekler mahiyettedir. Şanlıurfa'da ve Siverek ilçesinde 2007 yılında yürütülen bir araştırmada, 181 adet sağlıklı bireyden alınan kan serum örneklerinde indirekt immüfloresan yöntemi kullanılarak virusa spesifik IgG antikorlarının tespiti amaçlanmıştır. Araştırma kapsamında çalışılan örneklerde %16 oranında seropozitiflik elde edilmiş ve bu seropozitifliklerin %9,5'i PRNT ile teyit edilmiştir. Araştırma sonunda bölgedeki sivrisinek hareketliliği ile doğru orantılı olarak

bireylerde olası Batı Nil virüs enfeksiyonlarının varlığı da kanıtlanmıştır (Ergünay ve ark., 2007 ve Özer ve ark., 2007). Orta Anadolu'da 2516 bireyde yapılan başka bir araştırmada ise virüse karşı oluşan IgG antikorlarının ELISA testiyle taraması yapılmıştır. Araştırma sonucunda %0,99 (25/2516) oranında IgG pozitifliği belirlenmiş ve örneklerin %0,56 (14/2516)'sı PRNT ile doğrulanmıştır. Bu araştırma Orta Anadolu'da virusun bölgedeki aktivitesini kanıtlamıştır (Ergünay ve ark., 2007).

Gerek bu araştırmada elde edilen sonuçlar ve gerekse yukarıda açıklanan araştırma sonuçları bazı serolojik metotların Flavivirüslerle ilişkili bazı antikorlar ile (örn; St. Louis encephalitis virüs, Usutu virüs, Japanese encephalitis virüs, tick born encephalitis virüs gibi) çapraz reaksiyonlar verebileceği ve spesifik olmayan pozitifliklerin şekillenmesine neden olabileceği bilgisini doğrulamaktadır. Nitekim Dünya Hayvan Sağlığı Organizasyonu'nun (OIE) ilgili web sayfalarında (OIE, 2008) da konu ile ilgili dikkat çekilmiş ve Batı Nil virüs'e karşı serolojik testler içinde en spesifik olan testin PRN Testi olduğu referansı ile yukarıdaki araştırmalarda Batı Nil virüse spesifik antikor varlığının tespiti PRNT ile gerçekleştirilmiştir.

Sunulan bu araştırmada, Şanlıurfa ve çevresinde yerleşik damızlık atlarda enfeksiyonun varlığı ve yaygınlığı araştırılmış, seropozitif olarak değerlendirilen örneklerle yapılan PRNT ile Şanlıurfa ve ilçelerinde örneklemelerin yapıldığı merkezlerde %3,9 (11/277) oranında spesifik Batı Nil virüs antikoruna rastlandığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca zoonoz olan Batı Nil Virüsünün muhtemel insan vakalarına da sebep olabileceği göz önüne alındığında özellikle hastalığın bulaştırılmasında rol oynayan sokucu sinek popülasyonlarının yaşamını daha uzun süre sürdürebildiği, mevsimsel olarak daha ılıman bölgelerde enfeksiyonun her zaman akılda tutulmasında fayda bulunmaktadır. Ergünay ve arkadaşlarının 2006'da yapmış olduğu bir çalışmada Türkiye'de 10 farklı bölgedeki insan ve hayvanlarda alınan örneklerde antikor varlığı araştırılmış ve hayvanlarda seropozitiflik %1-37,7, insanlarda ise %20,4 olarak tespit edilmiştir (Ergünay ve ark., 2007).

Bu çalışmada, Şanlıurfa ili ve çevresinde yerleşik damızlık atlarda Batı Nil virüsü enfeksiyonunun serolojik ve virolojik olarak araştırılması hedeflenmiş ve yapılan örneklemeler neticesinde bölgede %3,9 (11/277) oranında Batı Nil virüs spesifik antikor varlığına ulaşılmıştır.

Çalışma kapsamında birinci aşamada ELISA ile seropozitif olarak değerlendirilen 42 örnek ile şüpheli olarak değerlendirilen diğer 16 örneğe (toplam 58 örnek) uygulanan Real Time RT-PCR testinde pozitiflik saptanamadığından moleküler epidemiyolojik değerlendirmeye tabi tutulacak bir veriye ulaşılamamıştır. Enfeksiyona maruz kalan tek tırnaklılarda viremi döneminin oldukça kısa sürdüğü bilinen bir gerçektir (Ergünay ve ark., 2010a). Dolayısıyla çalışma kapsamında örneklenen hayvanlarda örnekleme anında herhangi bir akut hastalık tablosu da bildirilmemiş olması ve virüsün doğasında tanımlanmış bir uzun süreli viremi bulunmaması sebebiyle bu sonuç normal karşılanmıştır. Bu anlamda virusun ülkemizdeki sirkülasyonun belirlenmesi için daha geniş saha çalışmalarına gereksinim duyulmaktadır.

Araştırma bulguları, çalışmanın yapıldığı coğrafi konumun göçmen kuşların göç yolları üzerinde yer alması, bölgenin ılıman iklim kuşağında bulunması ve sulak arazi oranının yüksek olması enfeksiyonun yayılması açısından önemli ipuçları verirken, araştırmada örneklenen yerleşik at popülasyonu yanında yılın belirli zamanlarında yarış programı kapsamında olan Şanlıurfa'ya ülkenin değişik şehirlerinden gelen yarış atları için de Batı Nil Virüs enfeksiyonu riskinin algılanması ve bu yolla yurdun değişik bölgelerine virüs iletimi olasılıklarının değerlendirilmesi adına önemli bulgular arz etmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Arboviral enfeksiyonlar arasında halk sağlığı açısından ciddi tehdit oluşturan en önemli etkenlerden biri Batı Nil virüsüdür. Ülkemizin sahip olduğu coğrafi konum ve ılıman iklim, ayrıca sulak arazi alanlarının yaygınlığı ve önemli küresel göç yollarının kavşak noktalarını barındırması sebebiyle enfeksiyonun yayılımı her geçen gün artmaktadır. Son yıllarda BNV'nin önemi anlaşılmış ve hastalığa yönelik önlem politikaları alınmış olmasına rağmen hala yeterli düzeyde değildir.

Yapılan bu çalışma ile şanlıurfa İli ve çevresinde yerleşik olarak yetiştirilen damızlık atlarda BNV enfeksiyonunun varlığı/yaygınlığı serolojik ve virolojik olarak araştırılmıştır.

- Tamamlanan Yüksek Lisans tezinde, örneklenen 277 damızlık ata ait kan serumu örneği ticari ELISA sistemi ile Batı Nil virüsüne karşı antikor varlığı yönünden teste tabi tutulmuş, örneklenen hayvanların 42'si (%15,1) seropozitif olarak bulunmuştur.
- Bu örnekler saptanan antikor yanıtının özgülüğünün doğrulanması amacıyla Dünya Hayvan Sağlığı Organizasyonu (OIE) tarafından önerilen PRNT'ye tabi tutulmuş, sonuçta IgG pozitif örneklerin 11'inde (%26,1) spesifik nötralizan antikor varlığı tespit edilmiştir.
- Bu bağlamda bölgedeki atlarda BNV-spesifik seropozitifliği %3,97 (11/277) olarak kaydedilmiştir.
- Elde edilen veriler ışığında bölgedeki BVN ile ilişkili diğer viral enfeksiyonların araştırılmasına öncülük eden şüpheli serokonversiyonlar ortaya konulmuştur.
- Çalışma kapsamında örneklenen atlarda viremik hayvan bulunamamış, ancak virüs sirkülasyonunun gerek hayvan ve gerekse diğer çalışmalarda insan örnekleri ile gösterilmiş olması, bölgenin

iklim ve doğal yapısı nedeniyle virüsün diğer bölgelere ulaştırılması açısından ciddi potansiyeli olduğunu göstermiştir.

- ELISA'nın insan sağlığında daha önce gösterildiği gibi hayvan sağlığı açısından da önemli bir tarama testi olduğu, verdiği sonuçların PRNT ile doğrulandıktan sonra yorumlanması gerekliliği ortaya konulmuştur.
- Tamamlanan bu çalışma, bölgede sirkülasyonu gösterilen BNV'nün izole edilerek karakterizasyonunun yapılması ve daha önce ülkemizde tanımlanan virüslerle olan ilişkisinin ortaya konulması gerekliliğini doğrulamıştır.
- Bu noktada elde edilecek bölgeye özel entomolojik verilerin ve tespit edilecek potansiyel vektör türlerin enfeksiyona ilişkin dinamiklerinin incelenmesi de önem arz etmektedir.
- Böylelikle bölgedeki virüsün orijini ve ülke geneli için taşıdığı veteriner ve halk sağlığı risklerinin değerlendirilmesi daha sağlıklı yapılabilecektir.

ÖZET

Şanlıurfa İli ve Çevresinde Yerleşik Damızlık Atlarda Batı Nil Virüsü Enfeksiyonunun Serolojik ve Virolojik Olarak Araştırılması

Batı Nil Virüsü (BNV) insanlar, atlar, kuşlar ve çeşitli vahşi hayvanlarda ensefalit vakası ile seyreden, salgınlara sebep olabilen, artopodlarla bulaşan ve Flaviviridae ailesine mensup zoonoz bir virüstür. BNV'nin doğal vektörü *Culex* ve *Aedes* cinsi sivrisinekler olup, bu artopodlar ile yabani kuşlar arasında önemli bir bulaşma zincirine sahip olan BNV'nin enfeksiyon spektrumunda at, insan, köpek, koyun gibi memeli hayvanlar ile tavuk gibi evcil kanatlı hayvanlar da bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında Şanlıurfa ili ve çevresinde yerleşik damızlık atlarda Batı Nil virüsü enfeksiyonunun serolojik (ELISA ve PRNT) ve virolojik (Real Time RT-PCR) olarak araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla Şanlıurfa ili ve çevre ilçelerindeki 10 merkezden ve daha önce bulunduğu yerden ayrılmamış toplam 277 damızlık attan alınan kan serum örnekleri kullanıldı. Örnekler öncelikle ELISA testine tabi tutularak antikör yanıt varlığı açısından değerlendirildi. Örneklerden 42 adedi (% 15.1) seropozitif, 16 adedi (%5,7) şüpheli olarak değerlendirildi. Mevcut seropozitif ve şüpheli örnekler PRNT'ye tabi tutuldular. Söz konusu 42 örnekten 11 adedi (26.1)'nin spesifik Batı Nil virüs antikörü taşıdığı tespit edildi. Şüpheli örneklerin hiçbirinde PRNT seropozitifliğine rastlanmadı. Örneklenen 277 damızlık atın 11 adedinde (% 3,9) spesifik Batı Nil virüs antikörü saptandı. ELISA testi ile seropozitif olarak tespit edilen 42 örnek ile 16 adet şüpheli örneğin hiçbirisinde Real Time Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (rtRT-PCR) ile viral RNA saptanamamıştır.

Anahtar Sözcükler: Batı Nil Virüs, ELISA, PCR, PRNT.

SUMMARY

Serological and Virological Investigation of West Nile virus infection in resident breeder horses at Şanlıurfa Province and surrounding.

The West Nile Virus (WNV) is a zoonotic virus that is transmitted to humans, horses, birds and various wild animals through encephalitis, caused by outbreaks, transmitted by arthropods, and belonging to the Flaviviridae family. The natural vectors of WNV are *Culex* and *Aedes* mosquitoes, which have an important chain of infection between these arthropods and wild birds. In the spectrum of infection, mammals such as horse, human, dog, sheep and domestic poultry such as chickens are also present.

In this thesis study, it was aimed to investigate serologic (ELISA and PRNT) and virological (Real Time RT-PCR) of West Nile virus infection in breeding horses built in and around Şanlıurfa province. For this purpose, serum samples were taken from 10 centers in Şanlıurfa province and neighboring provinces and 277 breeder attitudes which were not separated from their previous sites. The samples were first assessed for antibody response by ELISA test. Of the samples, 42 (15.1%) were seropositive and 16 (5.7%) were suspected. Existing seropositive and suspected samples were subjected to PRNT. Of the 42 samples, 11 (26.1) were found to carry the specific West Nile virus antibody. No seropositivity of PRNT was found in any of the suspicious specimens. Specified West Nile virus antibodies were detected in 11 (27%) of the 277 breeding stocks (3.9%). With 42 samples seropositive by ELISA test, no viral RNA was detected by Real Time Revers Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (rtRT-PCR) in any of the 16 suspected samples.

Keywords: ELISA, PCR, PRNT, West Nile Virus.

KAYNAKLAR

- ALLWINN R, DOERR HW, EMMERICH P, SCHMITZ H, PREISER W (2002). Cross-reactivity in avivirus serology: New implications of an oldnding? *Med Microbiol Immunol*, **190**: 199-202.
- ARI A (1972). Türkiye’de Arbovirüslerin faaliyeti ve ekolojisi üzerine incelemeler. *Türk Hij Tec Biyol Derg.*, **32**:134-143.
- ARPACI F, ÇETİN T, KUBAR A ÖZTÜRK M, KUZHAN O, KÖMÜRCÜ S, ÖZTÜRK B, ATAERGIN S, ÖZET A (2009). West Nile Virüs infection in a patient with acute graft-versus-host disease. *Haematologica*; **94** (2):687.
- BAKONYI T, IVANICS E, ERDÉLYI K, URSU K, FERENCZI E, WEISSENBOCK H, NOWOTNY N (2006). Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus Central Europe. *Emerging Infectious Diseases Journal* **12**: 618-623.
- BERNKOPF H, LEVINE S, NERSON R (1953). Isolation of West Nile virus in Israel. *The Journal of Infectious Diseases*, **7**: 128–132.
- BONDRE VP, JADI RS, MISHRA AC, YERGOLKAR PN, ARANKALLE VA (2007). West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *J Gen Virol*, **88** (3): 875-84.
- BURKE D, MONATH T (2001). Flaviviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. Philedelphia. Lippincott William & Wilkins; 1043-126.
- CAMPBELL GL, MARFIN AA, LANCIOTTI RS, GUBLER DJ (2002). West Nile virus. *Lancet Infect Dis.*, **2**(9): 519-29.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2003). Epidemic/ Epizootic West Nile Virus In The United States. Erişim Adresi: [http://www.westnile.state.pa.us/action/wnv_guidelines_aug_2003.pdf] Erişim Tarihi: 1/1/2018.
- CHAMBERS T, MONATH T (2003). The Flaviviruses: Detection, Diagnosis, and Vaccine Development. In: *Advances in Virus Research* (**61**): 577.
- DIAMOND MS (2009). West Nile Encephalitis Virus Infection: *Viral Patogenesis and the Host Immune Response* 1-3.

- DURUKAN P (2010). New infectious threats for Emergency Departments. *Turk J Emerg Med*, **10(3)**: 148-59.
- ECDC (2011). European Centre for Disease Prevention and Control. Expert consultation on West Nile virus infection. Erişim Adresi: [http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC_DisForm.aspx?ID=691.26] Erişim Tarihi: 1.11.2017.
- ERGÜNAY K, AYDOĞAN S, MENEMENLİOĞLU D, ŞENER B, LEDERER S, STEINHAGEN K, HASÇELİK G, PINAR A, ÖZKUL A, US D (2010a). Investigation of West Nile Virus in central nervous system infections of unknown etiology in Ankara, Turkey. *Mikrobiyol Bul*, **44(2)**: 255-262.
- ERGÜNAY K, OZER N, US D, OZKUL A, SİMSEK F, KAYNAS S, USTAÇELEBİ S (2007). Seroprevalence of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in southeastern Turkey: First evidence for tick - borne encephalitis virus infections. *Vector-Borne Zoonot*, **7**: 157-161.
- ERGÜNAY K, SAYGAN MB, AYDOĞAN S, MENEMENLİOĞLU D, TURAN HM, OZKUL A, US D (2010b). West Nile Virus Seroprevalence in Blood Donors from Central Anatolia, Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **10(8)**: 771-5.
- ERTÜRK A, BARUT MF, ÇİZMECİ GÇ (2009). Batı Nil Virus enfeksiyonu. *Etilik Vet Mikrobiyol Derg*, **20**: 43-50.
- FIELDS BN, KNIPE DM (1990). Flaviviruses. *FIELDS VIROLOGY*. 2nd Edp.: 955-1004.
- GYURE KA (2009). West Nile virus infections. *J. Neuropathol Exp Neurol*, **68(10)**: 1053-60.
- HAYES EB, SEJVAR JJ, ZAKI SR, LANCIOTTI RS, BODE AV, CAMPBELLGL (2005). Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis*, **11(8)**: 1174-9.
- HEPERKAN Y, ARI A (1964). Türkiye’de ARBO virusları üzerinde bir çalışma. *Türk Hij Tec Biyol Derg*, **24**: 113-117.
- HINDIYEH M, SHULMAN LM, MENDELSON E, WEISS L, GROSSMAN Z, BIN H (2001). Isolation and Characterization of West Nile Virus from the Blood of Viremic Patients During the 2000 Outbreak in Israel. *Emerging Infectious Diseases* **7(4)**: 1-3.

- HIZEL K, YENİCESU I, ERDAL B, YEŞİLYURT E, FİDAN I, KALKANCI A, ET AL (2010). Investigation of West Nile virus seroprevalence in healthy blood donors. *Mikrobiyol Bul*, **44(3)**: 425-30.
- HOLLIDGE BS, GONZFFLEZ-SCARANO F, SOLDAN SS (2010). Arboviral encephalitides: transmission, emergence, and pathogenesis. *J Neuroimmune Pharmacol*, **5(3)**: 428-42.
- KALAYCIOĞLU H, KÖRÜKLÜOĞLU G, ÖZKUL A, ÖNCÜL O, TOSUN S, KARABAY O, GÖZALAN A, UYAR Y, ÇAĞLAYIK DY, ATASOYLU G, ALTAŞ AB, YOLBAKAN S, ÖZDEN TN, BAYRAKDAR F, SEZAK N, PELİTLİ TS, KURTCEBE ZO, AYDIN E, ERTEK M (2012). Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011. *Euro Surveill*, **17**: 21-33.
- KILIÇ A, DOĞANCI L (2003). Batı Nil Virus. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **33**: 284-90.
- MAC LACHLAN NJ, DUBOVI EJ (2001). Fenner's Veterinary Virology- 4th ed. Elsevier Academic Press: USA.
- MAGURANO F, REMOLI ME, BAGGIERI M, FORTUNA C, MARCHI A, FIORENTINI C, BUCCI P, BENEDETTI E, CIUFOLINI MG, RIZZO C, PIGA S, SALCUNI P, REZZA G, NICOLETTI L (2012). Circulation of West Nile virus lineage 1 and 2 during an outbreak in Italy. *Clin Microbiol Infect*, **18 (12)**: 545-7.
- MAY FJ, DAVIS CT, TESH RB, BARRETT AD (2011). Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J Virol*, **85(6)**: 2964-74.
- MEÇO O (1977). West Nile arbovirus antibodies with hemagglutination inhibition (HI) in residents of Southeast Anatolia. *Mikrobiyol Bul*, **11**: 3-17.
- MONARTH PT, HEINZ XF (1996). Flaviviruses. In: Fields NB, Editors. *Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven: 961-1034.
- MURRAY KO, MERTENS E, DESPRES P (2010). West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Vet Res*, **41(6)**: 67.
- NCBI- Virus taxonomy: 2017, Erişim adresi: [https://talk.ictvonline.org/ictvreports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae]. Erişim Tarihi: 1.11.2017.
- NOSAL B, PELLIZZARI R (2003). West Nile Virus. *CMAJ*, **168**: 1443-4.

OIE (2008). World Organisation for Animal Health. Erişim Adresi: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_wnf.pdf]. Erişim Tarihi: 1.11.2017.

ÖZER N, ERGÜNAY K, şİMşEK F, KAYNAS S, ALTEN B, CAĞLAR SS, USTAÇELEBİ S (2007). West Nile virus studies in the Sanliurfa Province of Turkey. *J Vector Ecol*, **32(2)**: 202-6.

ÖZKUL A, ERGÜNAY K, KARAOĞLU T, TEZCAN S, ERİşÖZ KÖ (2012). West Nile virus circulation in Cukurova Region, Turkey. 15th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 2012-09-04, 2012-09-07, Madrid, İspanya.

PATRICIA A, DEVINE PA (2003). West Nile virus infection. *Infect Dis Upd*, **10**: 191-5.

PEALER LN (2003). West Nile fever. *N Engl J Med*, **349**: 1236-45.

PETERSEN LR, MAFFIN AA (2002). West Nile Virus: a primer for the clinician. *Ann Intern Med*, **137(3)**: 179-9.

PETERSEN LR, ROEHRIG JT (2001). West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerg Infect Dis*, **7**: 611.

RADDA A (1971). Antibodies against group A and group B arboviruses in domestic animals from Turkey. *Ege Üniv Tıp Fak Mec*, **10**: 227.

REISEN W, BRAULT AC (2007). West Nile virus in North America: perspectives on epidemiology and intervention. *Pest Manag Sci*, **63(7)**: 641-64.

ROSÀ R, MARINI G, BOLZONI L, NETELER M, METZ M, DELUCCHI L, CHADWICK EA, BALBO L, MOSCA A, GIACOBINI M, BERTOLOTTI L, RIZZOLI A (2014). Early warning of West Nile virus mosquito vector: climate and land use models successfully explain phenology and abundance of, *Culex pipiens* mosquitoes in north-western Italy. *Parasit Vectors*, **7(1)**: 269.

ROSSI SL, ROSS TM, EVANS JD (2010). West Nile virus. *Clin Lab Med*, **30(1)**: 47-65.

SAMPATHKUMAR P (2003). West Nile Virus: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis and prevention. *Mayo Clin Proc*, **78**: 1137-44.

- SAMUEL MA, DIAMOND MS (2006). Patogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *J Virol*, **80** (19): 9349-60.
- SCHAFFNER F, MATHIS A (2014). Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. *Lancet Infect Dis*, (14) 834-5.
- SERTER F (1966). Artropodlarla bulaşan virus hastalıklarının (Arbovirus enfeksiyonları) memleketimizdeki durumu. *XII. Türk Mikrobiyoloji Kongre raporu*, **104**.
- SERTER F (1968). Tick-borne meningo-encephalitis cases in Izmir area. *EU Tıp Fak Mec*, **7**(1): 1-13.
- SERTER F (1980). Ege Bölgesinde Arbovirus seroepidemiolojisinin mevcut durumu. *Zbl Bakt*, (9): 155-61.
- SIPS GJ, WILSCHUT J, SMITH JM (2012). Neuroinvasive flavivirus infections. *Rev Med Virol*, **22**(2): 69-87.
- SMITHBURN KC, HUGHES TP, BURKE AW, PAUL JH (1940). A neurotropic virus isolated from blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg*, **20**(4): 471-492.
- TAYLOR RM, HURLBUT HS, DRESSLER HR, SPANGLER EW, THRASHER D (1953). Isolation of West Nile virus from *Culex* mosquitoes. *J Egypt Med Assoc*, **6** (3): 199-208.
- TOSUN S (2010). Batı Nil virüsü enfeksiyonunda klinik ve tedavi. III. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu, Ankara, Türkiye, 1-2 Kasım 2010, 161-165.
- TOSUN S (2011). Sorun enfeksiyonlarda yaklaşım ve tedavi. Batı Nil Virüsü. 3. Türkiye EKMUD Bilimsel Platformu. 1-5 Mart 2011, İstanbul, 203-212.
- YAZICI Z (2005). Batı nil virusu enfeksiyonu. *Infek Derg*, **19** (1): 139-43.
- ZAAYMAN D, HUMAN S, VENTER M (2009). A highly sensitive method for the detection and genotyping of West Nile virus by real time PCR. *J Virol Methods*, **157**(2): 155-60.

ZELLER HG, SCHUFFENECKER I (2004). West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur J Clin Microbiol*, **23**: 147-156.





T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 30/03/2016
TOPLANTI NO : 2016-8
DOSYA NO : 2016-83
KARAR NO : 2016-8-91

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Taner Karaoğlu'nun yaptığı, araştırmacı olarak Vet.Hek.Adalet Duyum'un katıldığı "Şanlıurfa İli Çevresinde Yerleşik Damızlık Atlarda Batı Nil Virusu Enfeksiyonu'nun Serolojik ve Virolojik Olarak Aaştırılması" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"nin 7. maddesinin (h) fıkrası kapsamında ele alınmış olup, çalışmanın Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu iznine tabi olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	Oylanmaya katılmadı
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatın CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünler Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K	
Prof.Dr.Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Rahime Adalet
Soyası : DUYUM
Doğum Yeri ve Tarihi : Gölhisar/ 1985
Uyruğu : T.C.
Medeni Hali : Evli
İletişim : Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü
Müdürlüğü Virolojik Araştırmalar ve Teşhis
Laboratuvarı Etlik/ANKARA
0 (312) 326 00 90/304
e-mail : raduyum@gmail.com

II- Eğitim

Lisans : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi –2009
Lise : Antalya Anadolu Lisesi-2003
İlkokul-Ortaokul : Faruk Tugayoğlu İlköğretim Okulu-1999
Yabancı Dili : İngilizce

III- Ünvanları

Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

Şemdinli İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü-2009 Kasım-2011 Mart
Ankara İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü-2011 Mart-2014 Ekim
Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü-2014 Ekim -

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI- Bilimsel İlgi Alanları

VII- Bilimsel Etkinlikleri

VIII- Projeleri

- 1- Bluetongue Outbreaks and Studies of Etlik Veterinary Control Central Research Institute in Turkey between 1977-2016.
- 2- Studies on West Nile Virus Activity in Bodrum Mumcular Village, Fethiye and Bursa Karacabey In Turkey.
- 3- Türkiye’de Vektör Kaynaklı Önemli Viral Hayvan Hastalıklarının Teşhisi, Vektörlerin Tespiti ve Erken Uyarı Sisteminin Oluşturulması.

IX- Sertifikalar

- 1- Laboratuvar Hayvanları Bilimi 3. Ulusal Kongresi
- 2- Course on Laboratory Animal Science Based on FELASA Category C
- 3- TS EN ISO/IEC 17025 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliğinin Genel Şartları
- 4- OIE Twinning Project on West Nile Disease