



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**ORTA KARADENİZ BÖLGESİNDE TICK-BORNE
ENCEPHALİTİS VİRÜS (TBEV) ENFEKSİYONUN
EPİDEMİYOLOJİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gökhan ASAL

**Samsun
Haziran-2019**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**ORTA KARADENİZ BÖLGESİNDE TICK-BORNE
ENCEPHALİTİS VİRÜS (TBEV) ENFEKSİYONUN
EPİDEMİYOLOJİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gökhan ASAL

**Danışman
Prof.Dr. Harun ALBAYRAK**

**Samsun
Haziran-2019**

TC.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Gökhan ASAL tarafından Prof. Dr. Harun ALBAYRAK Danışmanlığında hazırlanan “**Orta Karadeniz Bölgesinde Tick Borne Encephalitis Virüs (TBEV) Enfeksiyonunun Epidemiyolojisi**” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 21/06/2019 tarihinde yapılan sınav ile Veterinerlik Viroloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Harun ALBAYRAK, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Kezban Can ŞAHNA, Fırat Üniversitesi

ONAY:

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

.... / 06 /2019

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŐEKKÖR

Tez çalıőmamın belirlenmesi ve çalıőmalarımın yönlendirilmesi aőamasında her zaman yardımcı olan, kendisini tanımaktan ve birlikte çalıőmaktan gurur duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Harun ALBAYRAK'a, güler yüz ve ilgilerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Semra GÖMÜŐOVA ve Prof. Dr. Zafer YAZICI'ya, tezimi yazma aőamasında sabırla ve ilgiyle tüm bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Araő. Gör. Cüneyt TAMER'e sonsuz teőekkür ederim. Ayrıca bu zorlu ve yoğun süreçde anlayıő ve destekleri için aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Bu alıőma, PYO.VET.1904.17.008 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiőtir.



ÖZET

ORTA KARADENİZ BÖLGESİNDE TICK-BORNE ENCEPHALİTİS VİRÜS (TBEV) ENFEKSİYONUN EPİDEMİYOLOJİSİ

Amaç: Tick Borne Ensefalit Virüs (TBEV) enfeksiyonu, vektörlerle bulaşan önemli bir zoonotik hastalıktır. Bu çalışmada, geçtiğimiz yıllarda Kene-Kaynaklı insan vakalarının gözlendiği Türkiye'nin Orta Karadeniz bölgesindeki ruminantlardan (sığır, koyun ve keçi) toplanan sert keneler, kan ve serum örnekleri TBEV'e spesifik RNA ve IgG antikorlarının varlığı açısından incelendi.

Materyal ve Metot: Orta Karadeniz bölgesinde serbest otlayan 509 koyun (556 havuz), 93 sığır (99 havuz) ve 106 keçiden (124 havuz) 2016 Mart ve Temmuz ayları arasında toplam 2625 kene ve 708 kan örneği toplandı. Ayrıca, aynı bölgede sığır, keçi ve koyundan 460 serum örneği toplandı ve serumlar ELISA kullanılarak TBEV antikorlarının varlığı açısından analiz edildi. Toplanan kene ve tam kan örnekleri ise rRT-PCR metodu ile viral nükleik asit varlığı araştırıldı.

Bulgular: Dokuz kene türü tespit edildi ve en fazla bulunan kene türleri % 32,4 (850/2625) *Rhipicephalus turanicus* ve % 27,2 (715/2625) *Haemaphysalis sulcata*'dır. Kan ve kene örneklerinde TBEV genomik RNA'sı saptanamazken, ELISA ile test edilen 460 sığır, keçi ve koyun kan serum örneklerinin 83'ü (% 18,4), TBEV için antikor-pozitif bulundu. TBEV enfeksiyonu için türlere göre serolojik değerlendirmede, TBEV IgG antikorları 198 sığır serumunun 61'inde (% 30,8), 115 keçi serumunun 7'sinde (% 6,1) ve 147 koyun serumunun 15'inde (% 10,2) pozitif bulundu. Şehirler için pozitiflik oranları ise Samsun'da % 12,7, Sivas'da % 35,2 ve Tokat'ta % 13,2 olarak belirlendi.

Sonuç: Kan ve kene örneklerinden TBEV RNA'sını tespit edilememesine rağmen, bu çalışmada TBEV antikorlarının varlığı ELISA ile doğrulandı. TBEV'in varlığı ve/veya yaygınlığı ile ilgili farklı kene türlerinin rolü hakkında daha fazla çalışma yapılmasının gerekli olduğu sonucuna varıldı. Bu ülkemizde evcil hayvanlarda TBEV varlığı hakkında yapılan ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Keçi; Koyun; rRT PCR; Sığırlar; TBEV; Türkiye

**Gökhan ASAL, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Haziran-2019**

ABSTRACT

THE EPIDEMIOLOGY OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS (TBEV) INFECTION IN MIDDLE BLACKSEA REGION

Aim: Tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection is an important zoonotic disease transported by vectors. In this study, the hard ticks, blood and serum samples collected from ruminants (cattle, sheep and goat) in the middle Black Sea region of Turkey where Tick-Borne human cases were observed in the past years were surveyed for the presence of RNA and specific IgG antibodies from TBE virus (TBEV).

Material and Method: A total of 2625 ticks and 708 whole blood samples were collected between March and July of 2016 and 2017 from 509 sheep (556 pools), 93 cattle (99 pools) and 106 goat (124 pools) grazing in the middle Black Sea region. In addition, a total of 460 serum samples were collected from cattle, goat and sheep in the same region and the sera were analysed for the presence of antibodies to TBEV using ELISA. The presence of viral nucleic acid was investigated from collected tick and whole blood samples by rRT PCR

Results: Nine tick species were identified and the most abundant were *Haemaphysalis sulcata* 32.4% (850/2625) and *Rhipicephalus turanicus* 27.2% (715/2625). No TBEV genomic RNA was found in blood and tick samples. However, 83 of 460 cattle, goat and sheep blood serum samples tested were antibody-positive for TBEV by ELISA. Serological examination of serum samples for anti-TBEV infection revealed that TBEV IgG antibody was present in 61 of 198 (30.8%), 7 of 115 (6.1%) and 15 of 147 (10.2%) cattle, goat and sheep, respectively. Positivity rates for the provinces varied and were as follows: Samsun 12.7%, Sivas 35.2% and Tokat 13.2%.

Conclusion: While we did not detect TBEV RNA in blood and tick species, the presence of TBEV antibodies was confirmed by ELISA surveyed in this study, continued efforts may reveal more information about the role of different tick species in TBEV maintenance and/or dissemination in the region. This is the first study on TBEV in domestic animals in Turkey

Keywords: Cattle; Goat; rRT PCR; Sheep; TBEV; Turkey

Gökhan ASAL, Master Thesis
Ondokuz Mayıs University - Samsun, June-2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

BOS	: Beyin omurilik sıvısı
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
FE-TBE	: Far eastern tick borne encephalitis
FSME	: Fruhsommer-meningoenzephalitis
HGE	: Human granülositik ehrlichiosis
HI	: Hemaglutinasyon inhibisyon
IFA	: İndirekt floresan antikor
IgG	: İmmünglobülin G
IgM	: İmmünglobülin M
kb	: Kilobaz
KKE	: Kene kaynaklı ensefalit
KKEV	: Kene kaynaklı ensefalit virüsü
KKKA	: Kırım kongo kanamalı ateşi
KKKAV	: Kırım kongo kanamalı ateşi virüsü
LB	: Lyme borreliozis
PCR	: Polimeraz chain reaction
RFFIT	: Rapid fluorescent focus inhibition test
RSSE	: Russian spring and summer encephalitis
RT-PCR	: Revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
rRT-PCR	: Real-time revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
SSS	: Santral sinir sistemi
S-TBE	: Siberian Tick-borne encephalitis virüsü
TBE	: Tick borne encephalitis
TBEV	: Tick borne encephalitis virüsü
W-TBE	: Western subtype

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tick Borne Encephalitis	3
2.1.1. Tanım	3
2.1.2. Tarihçe	4
2.1.3. Etiyoloji	4
2.1.4. Epidemiyoloji.....	6
2.1.5. Patagonez	11
2.1.6. Klinik Belirtiler	13
2.1.7. Teşhis.....	13
2.1.8. Tedavi.....	14
2.1.9. Koruma ve Kontrol	14
2.2. Amaç.....	15
3. MATERYAL VE METOT	16
3.1. Materyal	16
3.1.1. ELISA kiti ve Konjugatlar	16
3.1.2. RNA Ekstraksiyonu, rRT PCR Kitleri, Primerler ve Prob	16
3.1.3. Örneklenen İşlemler	17
3.1.4. Tam Kan, Serum ve Kene Örnekleri.....	17
3.2. Metot.....	19
3.2.1. Tam Kan ve Serum Örneklerinin Hazırlanması.....	19
3.2.2. Kene Örneklerinin Hazırlanması.....	19
3.2.3. ELISA Testi.....	20
3.2.4. RNA Ekstraksiyonu.....	20
3.2.5. rRT-PCR.....	21
4. BULGULAR	22
4.1. Moleküler Çalışma Sonuçları	22

4.2. Serolojik Çalışma Sonuçları	22
5. TARTIŞMA	24
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	27
KAYNAKLAR	28
EKLER	35
ÖZGEÇMİŞ	36



1.GİRİŞ

Tick Borne Encephalitis (TBE) merkezi sinir sisteminin viral zoonoz bir enfeksiyonudur. Özellikle Asya ve Kuzey Avrupa ülkelerinde görülen ciddi nörolojik enfeksiyonlar arasında yer alan bir hastalıktır (Labuda ve Nuttall, 2004). Enfeksiyon, farklı zamanlarda; Frühsommer meningoencephalitis, Western subtype (FSME), Kumlinge's disease, Western subtype (Central European encephalitis), Russian Spring and Summer Encephalitis ve Eastern subtype (RSSE) olarak adlandırılmış olup son zamanlarda ise TBE olarak isimlendirilmektedir (Gritsun ve ark., 2003). Doğal döngüsünde *Ixodes* cinsi keneler ve çeşitli omurgalılar yer alır. Tick borne encephalitis virüs (TBEV) enfeksiyonunda ağır bir santral sinir sistemi (SSS) tutulumu mevcuttur. Enfeksiyondan etkilenen kişilerde uzun dönemde nörolojik ya da psikiyatrik sekeller görülmektedir. Avrupa'da TBEV nedeniyle ortaya çıkan SSS olgularında artış olduğu görülmektedir. TBEV enfeksiyonlarından korunmada inaktive aşılar mevcuttur (Charrel ve ark., 2004).

Tüm dünyada kene kaynaklı salgınların meydana gelmesi ve çok miktarda yeni patojenin tanımlanmasından dolayı kene kaynaklı hastalıkların önemi her geçen gün artmaktadır. Günümüzde halen yeni kene kaynaklı epidemiler ortaya çıkmaktadır. Orta ve Doğu Avrupa'da görülen TBE, Hindistan'daki Kyasanur orman hastalığı, Türkiye'nin kuzeyinde ve Rusya'nın kuzey batısındaki Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), ABD'de ve Meksika'daki Kayalık Dağlar benekli humması bu epidemilerden sadece bir kaçıdır (Estrada Pena ve ark., 2012). Avrupa'da özellikle kene kökenli hastalıklar içerisinde yer alan Lyme borreliozis (LB) ve TBE 1980'li yıllardan itibaren artış göstermeye başlamıştır (Lundkvist ve ark., 2011; Rizzoli ve ark., 2011). TBE hem halk sağlığı konusunda ciddi tehlikelere yol açması hem de özellikle çiftlik hayvanları üzerinde önemli oranda morbidite ve mortaliteye sahip olmasından dolayı tüm dünyada ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır ve bu nedenle Avrupa Birliği'ndeki ihbari mecburi hastalıklar listesine dâhil edilmiştir (Sonenshine, 1991; Amato Gauci ve Zeller, 2012).

TBE ülkemizde bildiri zorunlu hastalıklar arasında yer almaktadır (Resmi Gazete, 2011). Ülkemizde TBE ile ilgili yapılan çalışmalarda, virüs varlığı daha çok prevalans çalışmalarında serolojik olarak incelenmiş olup pozitif sonuçlar alınmıştır. Ancak çoğu seropozitifler viral nötralizasyon testi ile tam olarak doğrulanmamıştır

(Nuhoglu ve ark., 2008). Yapılan çalışmalarda, ülkemizde çok sayıda kene türünün varlığı tespit edilmiştir. Tespit edilen çoğu kene türünün Türkiye'nin coğrafik yapısı ve mevsimsel şartlarına uyum sağlayabildikleri gözlemlenmiştir. Ülkemizde yapılan son çalışmalarda sert ve yumuşak kene ailelerine ait 46 kene türünün bulunduğu bildirilmiştir (Bursalı ve ark., 2012).

Bu alışmada, TBEV konaklarının endemik olarak görüldüğü bölgelerden biri olan Tokat, Sivas ve Samsun illerinde bulunan sığır, koyun ve keçilerden alınan kan, serum ve kene örnekleri kullanılarak TBEV'nin varlığının/yaygınlığının virolojik ve serolojik olarak tespit edilmesi amaçlanmıştır.

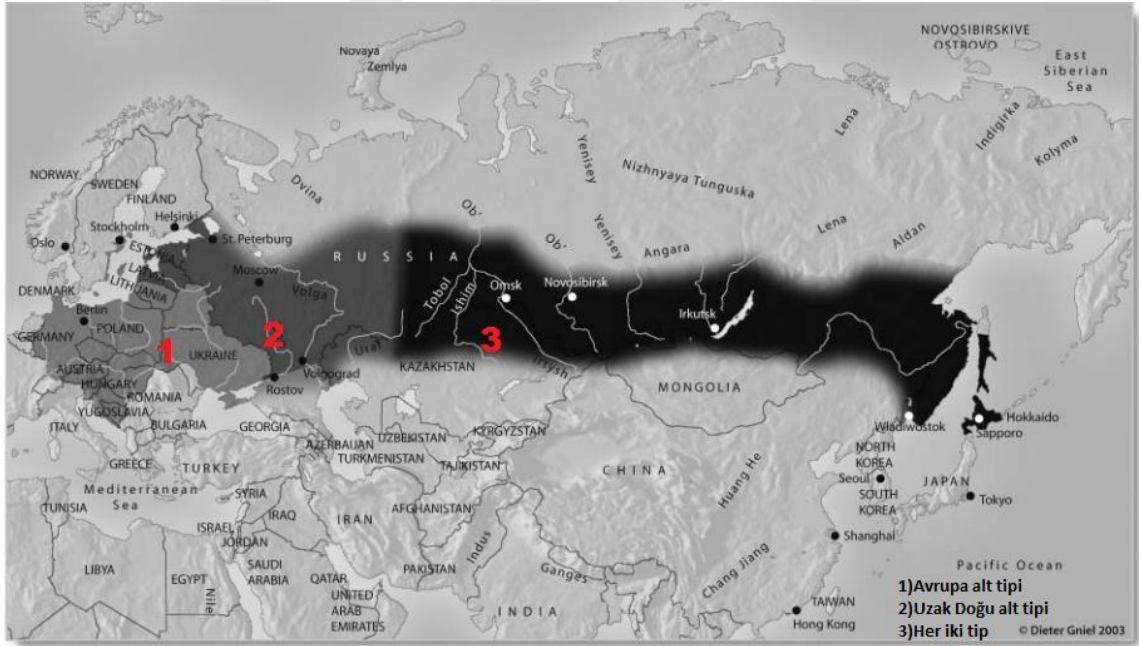


2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tick Borne Encephalitis

2.1.1. Tanım

TBE, santral sinir sisteminin viral bir infeksiyonudur. Enfeksiyon çoğunlukla kırsal ya da ormanlık alanlarda yaşayan veya çalışanlar ile endemik bölgelere seyahat eden insanların kene tarafından ısırılması sonucunda ortaya çıkar. Virüs antijenik olarak birbirinden farklı yaklaşık yetmiş virüs içeren *Flaviviridae* ailesi içerisinde (Porterfield, 1980). TBE Orta ve Doğu Avrupa, Rusya ve Uzak Doğuda endemiktir (Dumpis ve ark., 1999). Avrupa, Sibiryaya ve Uzak Doğu olmak üzere 3 alt tipi vardır. Uzak Doğu alt tipi; Uzak Doğu Rusya, Çin ve Japonya'da, Sibiryaya alt tipi; Urallar, Sibiryaya ve Uzak Doğu'da, Avrupa alt tipi ise birçok Avrupa ülkesi ve Rusya'nın Avrupa bölümünde görülmektedir (Güneş ve ark., 2010; Hasöksüz, 2008) (Şekil 1). Üç TBEV alt türü de genetik düzeyde yakından ilişkilidir ve Baltık ülkelerinde olduğu gibi birlikte görülebilir (Lundkvist ve ark., 2001; Sumilo ve ark., 2006).



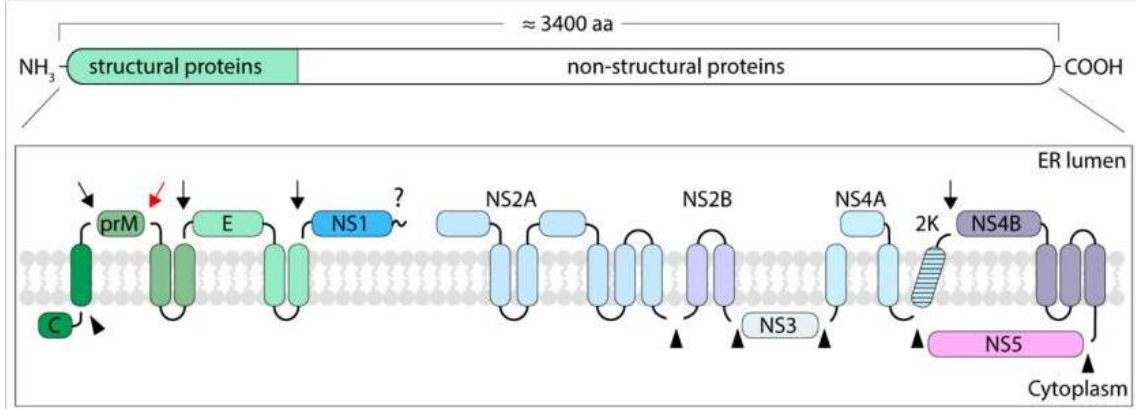
Şekil 1. TBEV'nin alt tiplerinin dünyadaki dağılımı (Wagner'den uyarlama, 2004)

2.1.2. Tarihçe

TBE ilk kez 1931 yılında Avusturyalı Schneider tarafından Rusya'nın Uzak Doğu bölgesinde görülen şiddetli ensefalit olgularında hastalık olarak tanımlanmıştır. Bu hastalığa TBE virüsünün yol açtığı ise 1937 yılında Rus Lev Zilber tarafından bulunmuştur (Schneider, 1931; Charrel ve ark., 2004). TBEV'nin ilk izolasyonu 1939 yılında bir hastanın beyin dokusundan gerçekleştirilmiştir (Chumakov ve Zeitlenok, 1940). TBEV'nin izolasyonu sonrası 1940 yılında aşı denemeleri yapılmıştır (Mantke ve ark., 2011). Asya'da, TBE hastaları ilk kez 1943'te Çin'de bildirilmiştir (Yoshii ve ark., 2017). 1947 yılında Rus Pavlovsky kene ve insanlar arasındaki zoonotik bulaşmayı bildirmiştir. 1942-1943 yıllarında Rusya'nın batı kısmında başlayan araştırmalar sonucunda izole edilen Sibiry alt tipinin (S-TBE) taşınmasında *Ixodes ricinus* türü kenelerin rol aldığı belirlenmiştir (Petrishcheva ve Levkovich, 1945). 1948 yılında Orta Avrupa'da insanlarda ilk TBEV izolasyonu Çekya'da bildirilmiştir (Gallia ve ark., 1949). 1959 yılında Alman Moritsch ve Krausler, hastalığı FSME olarak adlandırmışlardır (Ergunay ve ark., 2011; Kaiser, 2012). TBEV, Türkiye'de ilk olarak 1968 yılında İzmir'de, TBEV antikör titresinde belirgin artış gösterilerek rapor edilmiştir. Raporda Ege kıyılarında TBEV antikörleri % 7,4 oranında pozitif olarak bildirilmiştir (Serter, 1968). 1980 yılında Ege Bölgesi'nde TBEV seropozitifliği hemagglütinasyon inhibisyon (HI) testi ile % 1,4, nötralizasyon testi ile % 1,2 olarak bulunmuştur (Serter, 1980).

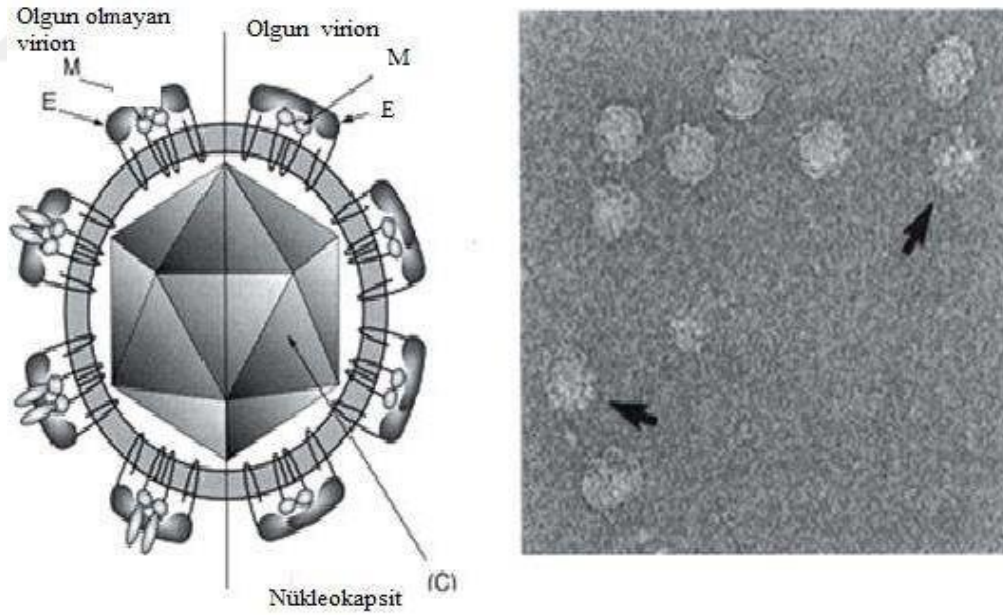
2.1.3. Etiyoloji

TBEV, üç yapısal (E, M ve C) ve yedi yapısal olmayan (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B ve NS5) proteine transkripsiyonel olarak işlenen yaklaşık 3400 aminoasit büyüklüğünde tek bir poliproteini kodlayan, yaklaşık 11 kilobaz (kb) uzunluğunda, pozitif polariteli, tek iplikli segmentsiz bir RNA genomuna sahip, zarflı bir virüstür (Gritsun ve ark., 1997; Proutski ve ark., 1997) (Şekil 2).



Şekil 2. TBE virüsünün genomik yapısı (Pulkkinen ve ark.'dan, 2018)

Olgun TBEV parçacıkları pürüzsüzdür ve diğer flavivirüsler gibi 50 nm çapa sahiptir (Pulkkinen, 2018). Virion, içinde E (viral zarfın) ve M (zarfın) proteinlerinin gömülü olduğu konakçı türevli lipidlerden oluşan zarla çevrili bir nükleokapsitten oluşur (Füzik ve ark., 2018). Nükleokapsit kapsid proteininin (C) çoklu kopyalarından ve genomun tek bir kopyasından oluşur (Gritsun ve ark., 1997; Proutski ve ark., 1997) (Şekil 3).



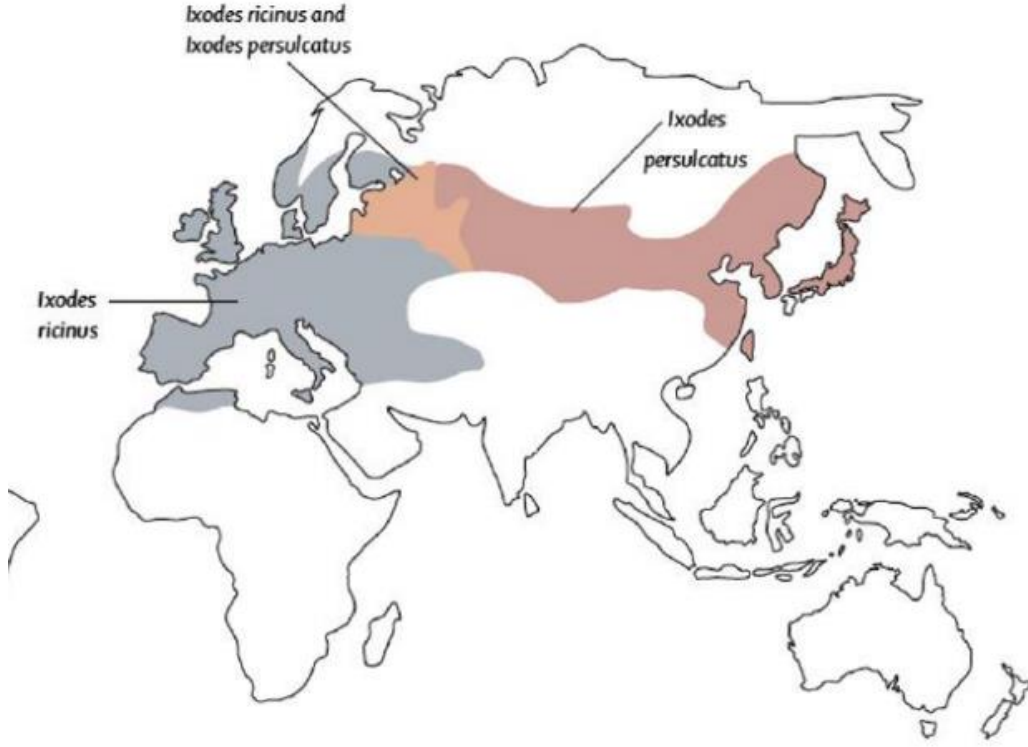
Şekil 3. TBE virüsünün yapısı ve elektron mikroskoptaki görünümü (Chambers'den, 1990)

TBEV sahip olduğu lipid zarf nedeniyle organik solventler ve deterjanlarla inaktif olur. Genel olarak flavivirus'ların viral hemaglutininleri ve enfektivitesi pH 8,4-8,8 arasında stabildir. TBEV ise daha geniş bir pH aralığında (pH 1,42 - 9,19) canlı kalarak

süt ve mide sıvısında enfektivitesini korur. TBEV 50°C’de 10 dakikada enfektivitesinin yarısını kaybeder. Enfektivitesinin tamamını kaybetmesi için ise 56°C’de 30 dakika gerekmektedir. TBEV’nin stabil kalması için % 23-80 nem oranına sahip süspansiyon içinde oda sıcaklığında altı saat dondurularak kurutulması gerekmektedir. Pastörizasyon, ultraviyole ve gama ışınları, formaldehid (% 3-8), gluteraldehid (% 2), hidrojen peroksit (% 2-3), klorin (500-5000 ppm), alkol, % 1’lik iyot ve fenol çözeltileri ile inaktive olur (Shapoval, 1977; Hasöksüz, 2008).

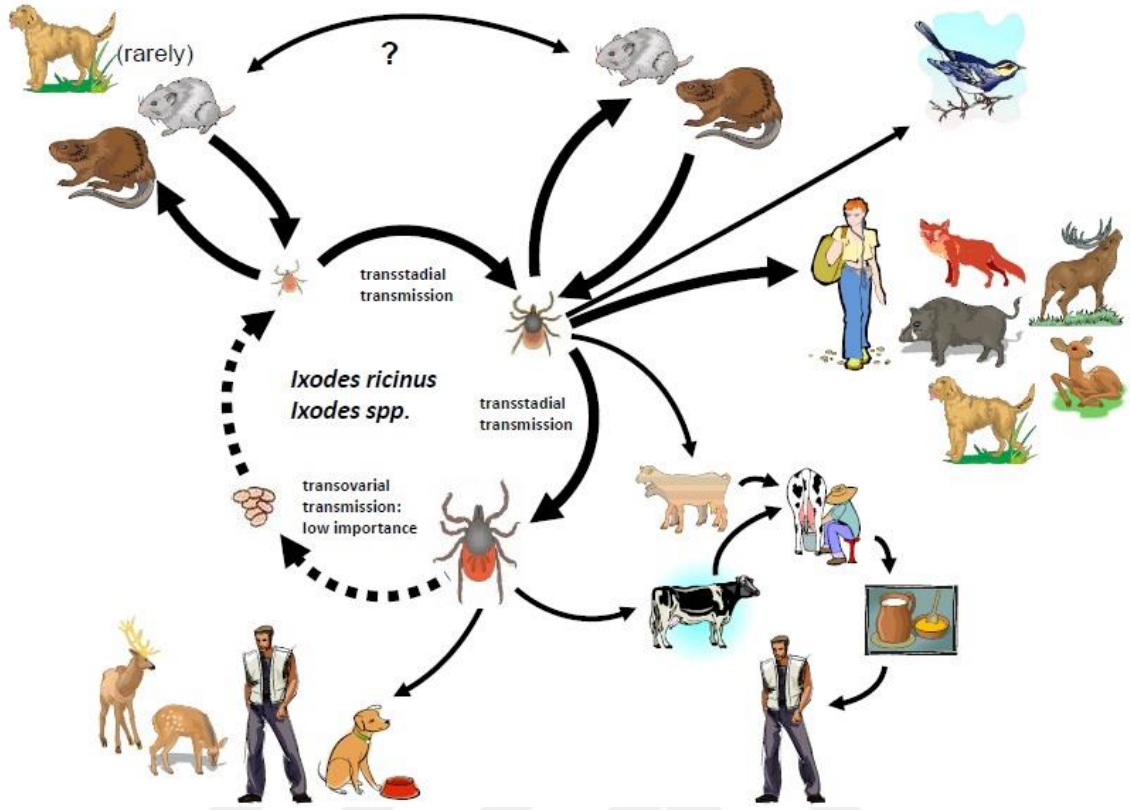
2.1.4. Epidemiyoloji

TBE virüsünün doğadaki yaşam döngüsü keneler ile omurgalılar arasında gerçekleşmektedir. Kan emici keneler omurgalı konaklardan beslenme sırasında aldıkları virüsle enfekte olurlar ve yaşamları boyunca enfekte kalarak virüsü taşırlar (Süss ve ark., 1992). Enfeksiyonun doğadaki rezervuarı küçük kemirgenlerdir. Hastalık ilkbahardan sonbahar sonuna kadar görülebilmektedir. Enfeksiyon, pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleriyle de (özellikle keçi sütü) bulaşabilmektedir. Enfekte koyun ve keçi sütü tüketimi sonrası salgınlar bildirilmiştir (Günel, 2014). TBEV, keçide enfeksiyonu takiben 5-25 gün sütte bulunabilmektedir (Shapoval, 1977). Çekya’daki TBE vakalarının yaklaşık % 0,9’unun beslenme yoluyla bağlantılı olduğu rapor edilmiştir (Süss, 2011). Slovakya’da enfekte keçi sütü kaynaklı, Rusya, Avusturya ve Macaristan’da ise pastörize edilmemiş inek sütü kaynaklı TBE vakaları bildirilmiştir (Blaskovic, 1954; Drozdov, 1959; Caini ve ark., 2012). Laboratuvar kaynaklı, kesici-delici yaralanma veya aerosol inhalasyonu ile de virüsün bulaşma riski bulunmaktadır. Teorik olarak mümkün olmakla birlikte, kişiden kişiye bulaşma bildirilmemiştir (Niedrig ve ark., 2007). TBEV 11 kene türünde tespit edilmesine karşın, bulaşmada sadece 2 tür önemlidir. TBEV’nin Avrupa alt tipine *Ixodes ricinus*, Uzak Doğu ve Sibiryaya alt tipine ise *Ixodes persulcatus* temel vektör görevi yapmaktadır (Labuda ve Nuttall 2004). Japonya’da *Ixodes ovatus*’tan da virüsün bulaştığı gösterilmiştir. *I. ricinus*’un coğrafi yayılımı Avrupa’nın yanısıra Türkiye, Kuzey İran ve Güneydoğu Kafkasya’ya kadar uzanmaktadır. *I. persulcatus*’un yayılımı Doğu Avrupa, Sibiryaya, Japonya ve Çin’e kadar yayılmaktadır (Süss, 2011; Kollaritsch ve ark., 2013). Baltık Devletlerinden Urallara kadar uzanan bir alanda *I. persulcatus* ile *I. ricinus* beraber görülmektedir (Süss, 2011) (Şekil 4). Sonuç olarak, Baltık Ülkeleri ve Finlandiya’da üç TBEV alt tipi ortaklaşa bulunmaktadır ve virüsün genetik çeşitliliği çok karmaşıktır (Lundkvist ve ark., 2001).



Şekil 4. *I. ricinus* ve *I. persulcatus*'un dünyadaki dağılımı (Stanek ve ark.'dan uyarlama, 2011)

İnsana bulaşmada çoğunlukla *I. persulcatus*'un erişkin formları, *I. ricinus*'un ise nimf formları sorumludur (Hasöksüz, 2008; Günal, 2014). TBEV, kene yumurtaları ile larva ve nimf formlarına geçer, kenelerin kan emmeleri sırasında da rodentlerden özellikle farelere bulaşır. Enfekte farelerden kan emen keneler, virüsü insan, tavşan, koyun, keçi, inek gibi diğer memelilere bulaştırırlar (Hasöksüz, 2008) (Şekil 5).



Şekil 5. Kene kaynaklı ensefalit virüsünün bulaşma döngüsünün şematik çizimi (Pfeffer ve Dobler'den, 2011)

Baskın türün *I. ricinus* olduğu Orta Avrupa da, TBE'nin en yüksek sıklığı Mayıs-haziran ve Eylül-ekim ayları arasında gerçekleşir. Urullarda, Sibiry'a'da ve Uzak Doğu'da yaygın olarak bulunan *I. persulcatus* ise sadece Mayıs ve Haziran ayları arasında yoğun bir beslenme sürecine sahiptir (Gritsun ve ark., 2003).

Dünyada'ki TBE Epidemileri

TBE, başta Orta Avrupa ve bazı İskandinav ülkeleri olmak üzere Avrupa ve Asya'nın daha çok ormanlık bölgelerinde endemiktir (Tablo 1). Tüm Baltık ülkeleri oldukça endemiktir ve üç TBEV alt tipinin hepsi birlikte dolaşımdadır (Lundkvist ve ark., 2001; Sumilo ve ark., 2006). TBE, bugüne kadar 26 Avrupa ve 7 Asya ülkesinde bildirilmiştir. TBE'nin Avrupa'daki vaka sayısı yıllık ortalama 3000 civarındadır. Avrupa Birliği ülkeleri içinde vaka rapor eden ülke sayısı 2012 yılında 19 iken 2016 yılında bu rakam 25'e yükselmiştir. 2016'da en yüksek oranları bildiren ülkeler Litvanya, Estonya ve Çekya'dır (Shapoval, 1977; ECDC, 2018).

Survey çalışma sonuçlarına göre 1990-2007 arasında; Rusya dahil Avrupa ülkelerindeki TBE vakası toplam 157.584 olup, Rusya hariç Avrupa ülkelerindeki TBE vakası ise toplam 50.486'dır. 1996 ve 1999 yıllarında yaklaşık 10.000 vaka rapor edilen Rusya yüksek riskli bir bölgedir (Petri ve ark., 2010).

Tablo 1. 2005-2009 yılları arasında TBE hastalık sıklığının arttığı ülkeler (Kim ve ark.'dan, 2009)

Ülke	Prevalans (%)
Çekya	15 - 54
Almanya	12 - 35
Güney Kore	14 - 25
İsveç	10 - 22
İsviçre	10 - 18

Avusturya TBE'in en çok görüldüğü ülkelerden biri olup insidans:100.000'de 1,9'dur (Kunz, 2003). Romanya'daki seroepidemiolojik araştırmalar sonucu TBE prevalansının % 0,6 olduğu tahmin edilmektedir (Molnar ve ark., 2008). Almanya'daki endemik bölgelerden olan Bavyera'da (Schwandorf bölgesi) vaka oranı 10 / 100.000 iken Baden-Württemberg'de (Ortenaukreis bölgesi) bu oran 6,2 / 100.000'dir (Dobler ve ark., 2012). Yunanistan'da insanların % 2'sinde, Litvanya'da ise % 2,9'unda TBEV seropozitifliği saptanmıştır (Juceviciene ve ark., 2002; Pavlidou ve ark., 2007). Litvanya'daki ineklerde % 2,3, koyunlarda % 4,2, keçilerde ise % 0,7 oranında TBEV antikör pozitifliği vardır (Juceviciene ve ark., 2005). Litvanya 2016 yılında Avrupa düzeyinde gözetim uygulandığından beri bildirilen en yüksek TBE oranını bildirmiştir (ECDC, 2018). TBE Letonya genelinde endemiktir ve ağırlıklı olarak ülkenin orta bölgelerinde görülmektedir (Karelis ve ark., 2012). Polonya'da enfeksiyon çoğunlukla kuzeydoğu (Podlaskie ve Warminsko-Mazurskie) ve güneybatıda (Opolskie) meydana gelir (Stefanoff ve ark., 2011). Doğu Polonya'da, 1261 orman işçisinin % 19,8'inde, 233 çiftçinin ise % 32'sinde TBEV antikörleri saptanmıştır (Cisak ve ark., 1998). Finlandiya'da yılda yaklaşık 20 ila 40 yeni TBE vakası kaydedilmektedir (Stefanoff ve ark., 2009). Slovenya TBE için endemiktir, insidansı yüksektir ve aşılama oranı düşüktür (Grgic Vitek ve Klavs, 2011). Fransa'da ilk vaka 1968 yılında teşhis edilmiştir (Herpe ve

ark., 2007). Fransa’da insanlarda % 1,6 TBEV İmmünglobülin G (IgG) antikorunu pozitif saptanmıştır (Schuhmacher ve ark., 1999). İsviçre’de ülke genelinde doğal TBE odakları bulunmuştur (Kunze, 2008). Norveç’te yapılan TBE seroprevalans çalışmalarında TBEV IgG oranı % 0,3-0,4 bulunmuştur. (Skarpaas ve ark., 2001; 2002). Danimarka’da yıllık TBE insidansı 4.0 / 100.000’dir (Laursen ve Knudsen, 2003; Fomsgaard ve ark., 2009). İtalya’da yıllık ortalama TBE insidansı 1992 yılında 0,06 / 100.000 iken 2006 yılında 0,88 / 100.000’e yükselmiştir (Carpi ve ark., 2009; Rizzoli ve ark., 2009). Sırbistan ve Bosna Hersek’te TBE vakaları tespit edilmiştir. Güney Arnavutluk’un bazı bölgelerinde (Permet ve Gjirocastr bölgesi) endemik olan TBE, Kuzey Hırvatistan’da ise sadece bir odakta mevcut iken son zamanlarda Adriyatik kıyısına ve adalara yayıldı. (Süss, 2008). Slovakya’da 1998 yılı ile 2007 yılları arasında yıllık ortalama TBE vaka sayısı 67’dir (Petri ve ark., 2010). Macaristan’da endemik bölgeler çoğunlukla ülkenin kuzey ve batısında yer almaktadır (Kollaritsch ve ark., 2011). Japonya’da at serumlarında % 0,4, köpek serumlarında ise % 9,3 seropozitiflik tespit edilmiştir (Takeda ve ark., 1999), Güney Kore’de kenede % 1,3 nükleik asit tespit edilmiştir (Kim ve ark., 2008). Çin’de ise insanlarda 1994 yılında 3500 vaka saptanmıştır (Süss, 2003).

Türkiye’de TBE Epidemileri

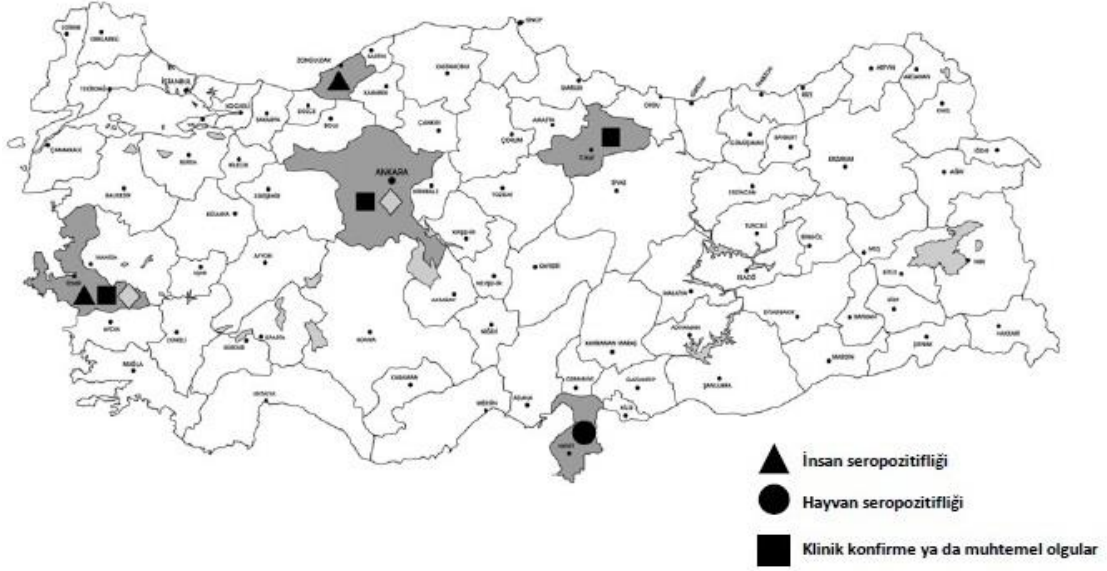
Türkiye’de yapılmış sınırlı sayıdaki çalışmada, İç Anadolu, Karadeniz ve Ege Bölgeleri başta olmak üzere diğer bölgelerde de TBE olguları veya TBEV seropozitifliği bildirilmiştir (Günel, 2014) (Tablo 2).

Tablo 2. Bölgelere göre örneklerin dağılımı ve TBEV seroprevalansı (Uyar ve ark., 2007)

Bölgeler	Örneklerin Bölgelere Göre Dağılımının (%)	TBEV Seropozitifliği %*
İç Anadolu Bölgesi	133 (47,8)	1,1
Karadeniz Bölgesi	122 (43,9)	-
Marmara Bölgesi	8 (2,9)	0,3
Doğu Anadolu Bölgesi	6 (2,2)	-
Ege Bölgesi	6 (2,2)	-
Güneydoğu Anadolu Bölgesi	3 (1,0)	-
Toplam	278 (100,0)	1,4

*: Çalışma popülasyonundaki (n:278) yüzde oranını göstermektedir.

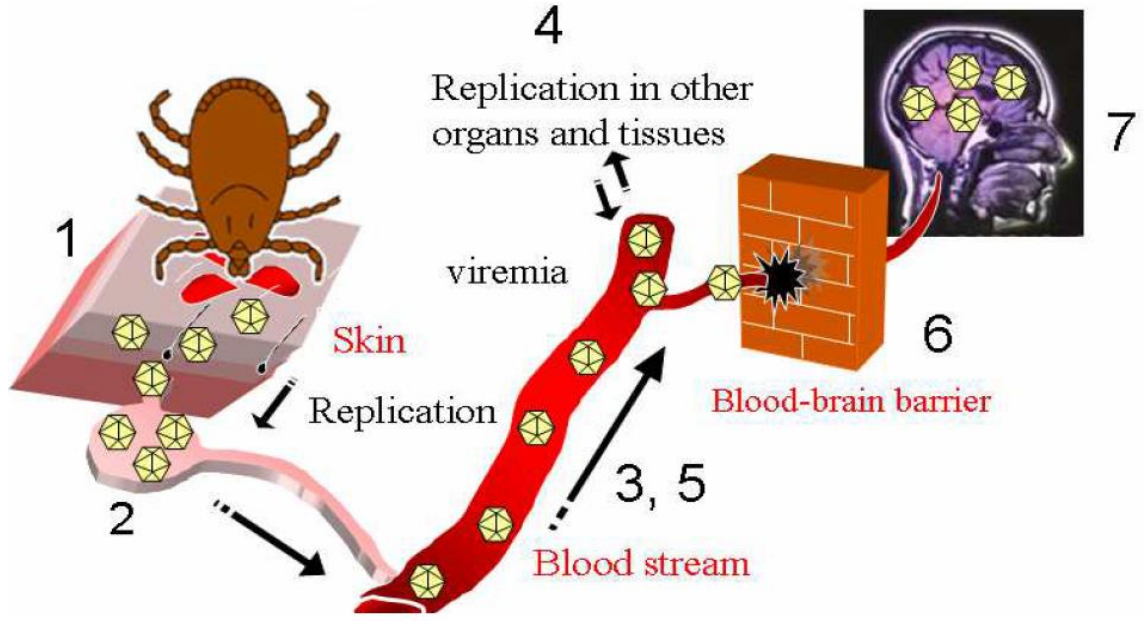
Ege Bölgesi'ndeki insanlarda, % 1,48 oranında hemaglutinasyon inhibisyon ve % 1,21 oranında nötralizan antikorların bulunduğu bildirilmiştir (Serter, 1980). Şanlıurfa ve Siverek'te yaşayan kişilerde ELISA yöntemi ile TBEV IgG pozitifliği % 10,5 oranında saptanmıştır (Ergunay ve ark., 2007). Orta Anadolu'da serum örneklerinde % 1,1 oranında IgG pozitifliği bildirilmiştir (Uyar ve ark., 2007). Tokat'ta bir vakada IgM, yedi vakada da IgG pozitifliği saptanmıştır (Esen ve ark., 2008). Ankara, Konya, Eskişehir ve Zonguldak'ta TBEV seroprevalansı % 1,9 oranında bulunmuştur. Sinop'ta indirekt floresan antikor (IFA) yöntemiyle, % 2,9 oranında pozitiflik bildirilmiştir (Güneş ve ark., 2010) (Şekil 6).



Şekil 6. Türkiye'de kene ile bulaşan ensefalit virüsü (Öktem'den, 2010)

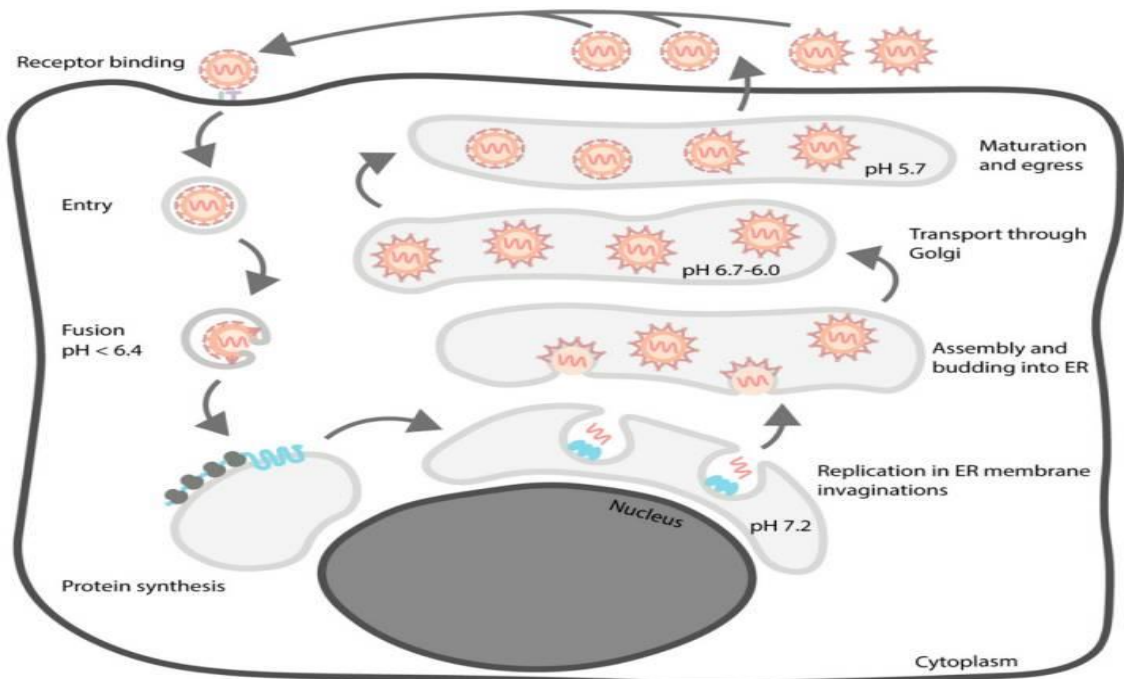
2.1.5. Patogenez

TBEV genelde kene ısırması sonucunda deride Langerhans hücreleri tarafından vücuda alındıktan sonra bölgesel lenf düğümlerine taşınır. Daha sonra T lenfositler ile etkileşime giren virüs, lenf düğümleri, timus ile dalaktaki makrofajlar, T ve B hücrelerinde çoğalır. Ardından kan damarları vasıtasıyla merkezi sinir sistemine ulaşır. Virüs sadece yüksek konsantrasyona ulaşabilirse kapiller endoteli enfekte eder ve kan-beyin bariyerini aşabilir (Şekil 7). Beyin ve spinal meninkslerde diffuz lenfosit infiltrasyonu mevcuttur. Beyin dokusu, ödemli ve hiperemiktir. SSS'deki medulla oblongata, pons, serebellum, bazal ganglionlar, talamus ve spinal kord'da mikroskobik lezyonlar yaygındır (Kaiser, 2012).



Şekil 7. TBE virüsü enfeksiyonu sırasında adımların şematik çizimi (Mantke ve ark.'dan, 2011)

Virion, hücre yüzeyindeki bir reseptörle etkileşime girer ve endositoz ile hücre içine girer. Genom replikasyonu sonrası endoplazmik retikulum lümenine tomurcuklanarak burdan ayrılır. Golgi aygıtı boyunca taşınır ve sitoplazmik veziküller içerisine alınarak bu golgi bölgesinden olgunlaşır. Olgun parçacıklar tomurcuklanma ile hücre dışına çıkar (Pulkkinen ve ark., 2018) (Şekil 8).



Şekil 8. TBE virüsünün yaşam döngüsü (Pulkkinen ve ark.'dan, 2018)

2.1.6. Klinik Belirtiler

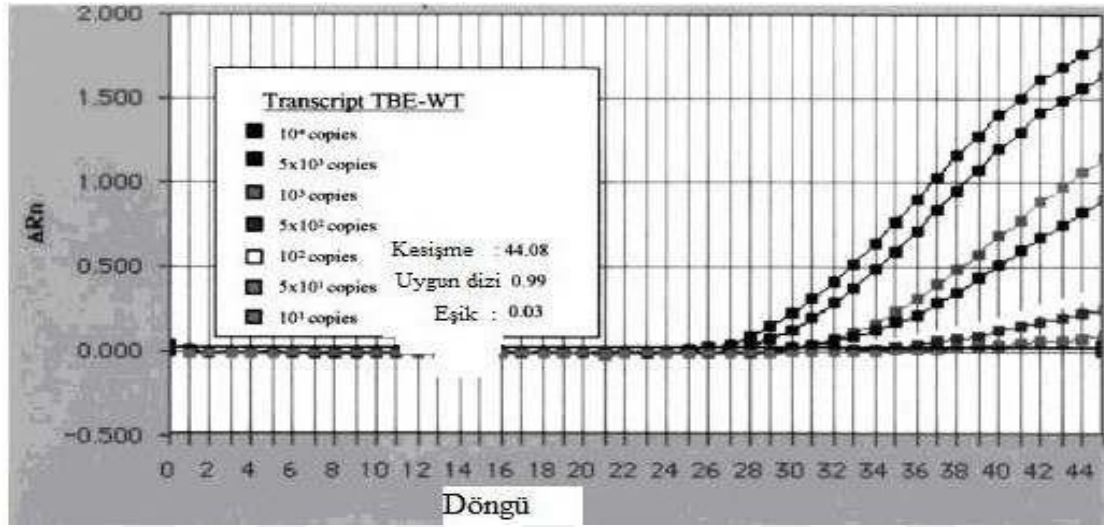
Uzak Doğu ve Avrupa alt tipleri ile oluşan enfeksiyonlarda klinik seyir farklı olup, Avrupa alt tipi iki fazlı seyreden daha ılımlı bir klinik tabloya yol açar. Hastalığın inkübasyon süresi ortalama 7 gündür. Besinle bulaşmalarda inkübasyon süresi daha kısadır (ortalama 4 gün). Serolojik çalışmalar, insanlardaki TBE enfeksiyonlarının % 70-95'inin asemptomatik olduğunu göstermektedir. Semptomatik vakaların birinci fazında (viremi fazı); ateş, halsizlik, baş-kas ağrıları, bulantı gibi genel belirtiler görülür. İkinci faz ateşin tekrar yükselmesi ile başlar ve çeşitli nörolojik semptomlar (baş ağrısı, meningeal bulgular, ataksi, bilişsel işlevlerde bozukluk, bilinç düzeyi değişiklikleri, konfüzyon vb.) ortaya çıkar. Bu fazda menenjit, meningoensefalit, meningoensefalomyelit, meningoensefaloradikülit veya spinal sinir paralizileri gelişebilir. Olguların % 13-26'sında hastalığın ikinci fazı görülmeksizin iyileşme gerçekleşir. Mortalite oranı % 1'in altındadır (Haglund ve Günther, 2003; Gritsun ve ark., 2003; Lindquist ve Vapalahti, 2008).

Köpeklerde TBE'nin klinik seyri yaygın olarak vücut ısısının yükselmesi (41,4°C'ye kadar), davranış değişikliği (yiyecekleri reddetmek, artan saldırganlık, gerginlik veya duyusal kayıp), parezi, şaşılık, göz kapağı kapanma refleksinin kaybı, kasılma, titreme, ataksi ile karakterizedir (Pfeffer ve Dobler, 2011).

2.1.7. Teşhis

TBE'nin tanısı klinik ve laboratuvar bulguları ile birlikte ortaya konulmaktadır. Hastalığın viremi döneminde viral nükleik asit, ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile saptanabilir (Şekil 9). Fakat vireminin hastalığın birinci fazı ile sınırlı olması ve hastaların çoğunlukla ikinci fazda başvurmalarından dolayı bu yöntemin pratikte değeri düşüktür. TBE tanısı genellikle serolojik testlerle pratikte ikinci fazın başından itibaren pozitifleşmeye başlayan özgül IgM ve IgG antikorlarının tespitine dayanır. Serolojik testlerden en çok tercih edilenler enzim temelli immunolojik yöntemler (ELISA) ve indirekt floresan antikor (IFA)'dur. Klinik olarak TBE şüpheli vakalarda serolojik testler sonucunda IgM ve IgG'nin pozitif çıkması TBEV enfeksiyonunun varlığı ya da aşılama sonrası persistans antikor varlığı olarak değerlendirilir. IgM ve IgG'nin negatif çıkması durumunda ise yeni bir örnekle tekrar test yapılmalıdır. Yine IgM'nin pozitif, IgG'nin ise negatif olduğu durumda TBE enfeksiyon şüphesi olarak değerlendirilir ve tanı yeni bir örnekle tekrar test edilmelidir. Son olarak IgM'nin negatif,

IgG'nin ise pozitif olduğu durumlarda ise immunité, başarılı aşılama, pasif immünizasyon, aşuya karşı yetersiz yanıt veya çapraz reaktif antikorlar olarak değerlendirilir. Viremi hastalığın ilk fazı ile sınırlı olduğundan dolayı, virüs kültürünün rutin tanıya yönelik incelemeler arasında pek yeri yoktur. Ancak virüs kültürü, rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) gibi nötralizasyon testleri için gerekli olabilir (Holzmann, 2003; Sonnenberg ve ark., 2004; Lindquist ve Vapalahti, 2008).



Şekil 9. TBE hastalığının real-time PCR ile tanısı (Schwaiger'den, 2003)

2.1.8.Tedavi

TBE için spesifik bir tedavi olmayıp, tek seçenek, semptomatik ve destekleyici tedavidir. Sıvı ve elektrolit dengesinin korunması, yeterli kalori alımı, analjezik ve antipiretik uygulanması, gerektiğinde antikonvulzan kullanımı, önemli klinik tedavi yaklaşımlarındandır. Kortikosteroid kullanımı semptomatik tedavi ile karşılaştırıldığında, hastanede yatış süresini uzattığı ve daha kötü sonuçlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Kaiser, 1999,2012). Non-steroid anti-inflamatuar ilaçlar (NSAID) yüksek ateşle mücadele için kullanılır ve özellikle pnömoni olmak üzere sekonder bakteriyel enfeksiyonları önlemek için antibiyotik verilmelidir (Kritz, 2001) .

2.1.9.Koruma ve Kontrol

Hastalıktan korunmada en etkili yol, aşılama'dır. Günümüzde, TBEV-FE suşları ile hazırlanan Rus aşuları (Encevir, Virion, Tomsk, Rusya) dışında, TBEV-W suşları ile hazırlanan Avrupa'da lisanslı benzer iki aşı daha (FSME-Immun, Baxter Vaccine AG, Viyana, Avusturya ve Encepur, Novartis, Basel, İsviçre) bulunmaktadır. Alt tip aşuları

arasında çapraz koruyuculuk gösterilmiştir. Aşılamaya başlamak için en uygun zaman, kış mevsimidir. Aşı, intramuskuler enjeksiyonla uygulanan üç dozdan oluşur. İlk aşılama serisinden üç yıl sonra rapel doz uygulanmalıdır. Sonraki rapel dozlar, yetişkinler için beş yılda bir, çocuklar ve 60 yaş üzerindekiiler için üç yılda bir uygulanmalıdır. Düzenle aşılanan ve rapellerini yaptıran kişilerde aşının etkinliği, yaklaşık % 99'dur. TBEV'e karşı etkili aşılar Avrupa ve Kanada'da birçok seyahat kliniklerinde mevcuttur; ancak Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yoktur. Avusturya'da yapılan kitlesel aşılama sonrasında % 96 oranında koruyuculuk elde edilmiştir (Barrett ve ark., 2003; Kollaritsch ve ark., 2013).

Önleyici tedbirler çok önemlidir ve öncelikli olarak kene ısırıklarının önlenmesi hedeflenmelidir. Bu yüzden hayvanlarda akarisit ve insektisit kullanım sıklığı artırılmalıdır. Düzenli olarak akarisit ve insektisit kullanılan hayvanlarda kene ile mücadelede etkin sonuçlar alınmaktadır (Dryden, 2009). Ayrıca kenelerin yoğun olabileceği alanlardan uzak durulması, bu gibi alanlarda uygun kıyafetler giyilmesi ve sütlerin pastörizasyonu da korunma açısından önemlidir (Günel, 2014).

2.2.Amaç

Bu çalışmanın amacı TBEV konaklarının endemik olarak görüldüğü bölgelerden olan Samsun, Tokat ve Sivas illerine bağlı ilçelerde bulunan koyun, keçi ve sığırlardan alınan kan, serum ve kene örneklerinde TBEV'nin varlığının/yaygınlığının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar ile kenelerin virüsün sirkülasyonundaki rolünün ortaya konulması hedeflenmektedir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

“Orta Karadeniz Bölgesi’nde Tick Borne Encephalitis Virüs (TBEV) Enfeksiyonun Epidemiyolojisi” başlıklı yüksek lisans tez konusu T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu’nun 25.07.2016 tarih ve 7-2 sayılı izni ile yürütülmüştür.

3.1.1. ELISA Kiti

Ticari olarak temin edilen EIA TBEV Ig ELISA (Test Line Brno, Czech Republic) kiti kullanıldı.

3.1.2. RNA Ekstraksiyonu, rRT PCR Kitleri, Primerler ve Prob

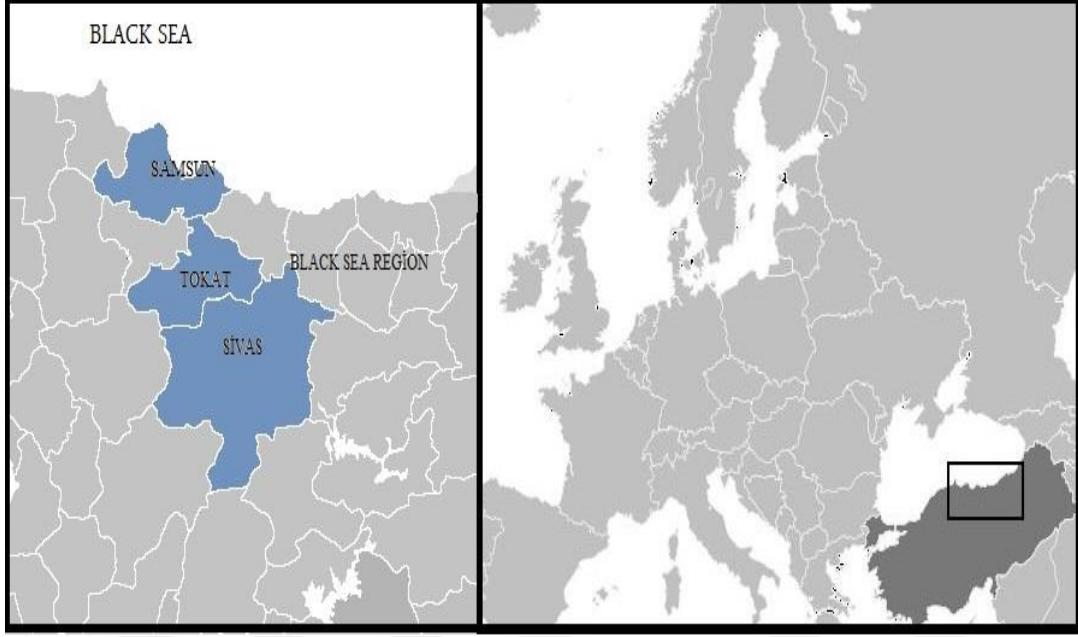
RNA ekstraksiyonu için ticari olarak temin edilen High Pure Viral Nucleic Acid Kiti (Roche, Kat No: 11858874001, Mannheim, Almanya) kullanıldı. rRT PCR için ticari olarak temin edilen tek aşamalı PCR kiti üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı (iTaq™ Universal Probes One-Step Kit, Kat No: 1725141, Biorad, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri). rRT-PCR metodu için kullanılan primerler ve probun orjinleri ile lokalizasyonları ile ilgili bilgiler Tablo 3’de sunuldu. Testte pozitif kontrol olarak Prof. Dr. Manfred Weidmann’dan (Eski adres: Institute for Virology of the University of Gottingen, Germany; Yeni Adres: Insitute of Aquaculture, University of Stirling, United Kingdom) temin edilen TBEV plazmidi ve negatif kontrol olarakta distile su kullanıldı.

Tablo 3. TBE için primerler ve problar (Schwaiger ve ark.’dan, 2003)

Primer ve Prob Adı	Dizin 5’-3’	Lokalizasyon Bölgesi (bp)
F-TBE 1	5’-GGG CGG TTC TTG TTC TCC-3’	11054-11071
F-TBE 2	5’- ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT-3’	11099-11121
F-TBE probe	5’FAM-TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA-TAMRA3’	11073-11095

3.1.3. Örneklenen İşletmeler

Bu çalışmada, Samsun ilindeki Bafra, Terme ve Ladik ilçeleri, Sivas ilindeki Yıldızeli, Hafik ve Merkez ilçeleri, Tokat ilindeki Almus, Reşadiye, Niksar ve Merkez ilçeleri olmak üzere 10 yerleşim biriminde bulunan sığır, koyun ve keçi işletmelerindeki hayvanlardan kan, kene ve serum örnekleri temin edildi (Şekil 10).



Şekil 10. Örnekleme Bölgesi

3.1.4. Tam Kan, Serum ve Kene Örnekleri

Serolojik ve virolojik testler için, Samsun (Bafra, Terme ve Ladik), Sivas (Yıldızeli, Hafik ve Merkez) ve Tokat (Almus, Reşadiye, Niksar ve Merkez) ilçelerini kapsayan 10 yerleşim birimindeki 509 koyun, 106 keçi ve 93 sığır olmak üzere toplam 708 hayvandan antikoagulanlı (EDTA) tüplere tam kan toplandı. Çalışma alanı içerisindeki işletmelerde bulunan 3 hayvan türündeki (sığır, koyun ve keçi) 708 hayvanın üzerinden farklı kene türleri olmak üzere toplam 2625 kene örneği toplandı. Toplanan kene türleri, konak hayvan ve sayıları Tablo 4 ve 5'de gösterilmiştir. Ayrıca hayvanların üzerinden toplanılan keneler tür ayrımı yapıldıktan sonra her bir hayvan üzerinden toplanılan kene en az bir homojenizat olacak şekilde hazırlanmıştır (Tablo 6). Aynı dönemde üç ilde bulunan hayvancılık işletmelerinden 147 koyun, 115 keçi ve 198 sığır olmak üzere toplam 460 hayvanın kan serumu örnekleri silikonlu tüplere alınarak laboratuvara getirildi.

Tablo 4. Kene Toplanan Hayvan Sayısı

	Samsun	Tokat	Sivas	Toplam
Koyun	73	201	235	509
Sığır	28	32	33	93
Keçi	0	64	42	106
Toplam	101	297	310	708

Tablo 5. Toplanan kene örneklerinin konak ve illere göre dağılımı

Kene	Samsun			Samsun Toplam	Sivas			Sivas Toplam	Tokat			Tokat Toplam	Toplam		
	Sığır	Koyun	Keçi		Sığır	Koyun	Keçi		Sığır	Koyun	Keçi		Sığır	Koyun	Keçi
<i>R. turanicus</i>	39	101		140	12	407	150	569	1	5		6	52	513	150
<i>R. spp.</i>	3	14		17		40	33	73		2		2	3	56	33
<i>R. bursa</i>	1	4		5		26	14	40	1	3	19	23	2	33	33
<i>D. marginatus</i>		2		2		340	13	353		75	7	82	-	417	20
<i>I. ricinus</i>	11	1		12							1	1	11	1	1
<i>H. marginatum</i>					18	6	1	25	68	77	19	164	86	83	20
<i>H. punctata</i>						8	5	13		66	6	72	-	74	11
<i>H. spp.</i>					1	31	4	36		78	27	105	1	109	31
<i>Hyalomma spp.</i>					4			4	12	2	1	15	16	2	1
<i>H. sulcata</i>							1	1		746	103	849	-	746	104
<i>H. dendriticum</i>									12		4	16	12	-	4
TOPLAM				176				1114				1335	183	2034	408
Tüm hayvanlar genel toplam												183+2034+408: 2625			
2625															

Tablo 6. Kene örneklerinden elde edilen homojenizatların kene türü bazında dağılımı

Kene Türü	Samsun			Sivas			Tokat			Toplam
	Sığır	Koyun	Keçi	Sığır	Koyun	Keçi	Sığır	Koyun	Keçi	
<i>R. turanicus</i>	18	52		6	80	20	1	4		181
<i>R. spp.</i>	2	10		13	15	9		1		50
<i>R. bursa</i>	1	4			12	9	1	2	13	42
<i>D. marginatus</i>		1			125	9		34	4	173
<i>L.ricinus</i>	7	5							1	13
<i>H.marginatum</i>				10	3	1	19	17	7	57
<i>H. punctata</i>					4	3		35	5	47
<i>H. spp.</i>				1	16	3		39	7	66
<i>Hyalommaspp.</i>				3			9	2	1	15
<i>H. sulcata</i>						1		95	28	124
<i>H.dendriticum</i>							8		3	11
	28	72	0	33	255	55	38	229	69	779

3.2. Metot

3.2.1. Tam Kan ve Serum Örneklerinin Hazırlanması

Antikoagulan madde içeren (ethylenediaminetetraacetic acid) tüplere alınan defibrine kan örneği 1500 devirde (rpm) 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Stok tüplere aktarılan plazma sıvıları, test edilinceye kadar -20°C 'de saklandı. Aynı şekilde silikonlu tüplere alınan kan örnekleri pıhtılaştıktan sonra 10 dakika 1500 devirde (rpm) santrifüj edilerek serumlar ayırt edildi. Stok tüplere aktarılan serumlar, test edilinceye kadar -20°C 'de saklandı.

3.2.2. Kene Örneklerinin Hazırlanması

Soğuk zincir altında laboratuvara getirilen kene örnekleri, kene anahtarına göre tür ve cinsiyet ayrımı yapıldı. Tür ayrımını takiben, aynı hayvan üzerinden toplanan tüm keneler (1-10 arasında) MagNa Lyser cihazının yeşil boncuklar içeren 2 ml hacimli ve içerisinde steril PBS bulunan tüplere yerleştirildi. MagNa Lyser cihazı aracılığıyla 3 dakika 7000 devirde (rpm) homojenize edildi. Elde edilen homojenizatlar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika 4400 devirde (rpm) santrifüj edildi. Süpernatantlar, biyogüvenlik kabini içerisinde steril 2 ml hacimli mikro tüplere aktarıldı. Örnekler analiz yapılıncaya kadar -80°C 'de saklandı.

3.2.3. ELISA Testi

Spesifik antikorları tespit etmek için ticari olarak temin edilen EIA TBEV Ig ELISA (Test Line Brno, Czech Republic) kiti kullanıldı. Saha serum örnekleri kullanıma alınmadan önce 56 °C'de 30 dakika süreyle inaktivasyona tabi tutuldu. Serum örnekleri ve antikor test kiti reaktifleri kullanılmadan önce oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra kısa bir vorteks yapıldı. Serumlar, kit prosedürüne uygun olarak test edildi. Buna göre; mikrotitrasyon pleytinin A1 gözü kör olarak boş bırakıldı. B1 ve C1 gözlerine negatif kontrol, D1 gözüne ise pozitif kontrol olmak üzere diğer tüm gözlere sulandırılmamış saha serum örneklerinden 50 µl konuldu. Daha sonra A1 gözü hariç tüm gözlere 50 µl murine anti-TBEV antikorları eklenerek 30 saniye çalkalayıcıda çalkalanıldı. Pleytin üzeri yapışkan bir film ile kapatılarak, orbital çalkalayıcıda 37 °C'de 1 saat inkubasyona bırakıldı. Stok yıkama solüsyonu distile su ile 1/20 oranında sulandırılarak çalışmada kullanılacak yıkama solüsyonu hazırlandı. İnkubasyon sonrası yapışkan film çıkarıldıktan sonra pleytler ELISA yıkayıcıda yıkama solüsyonu kullanılarak 5 kez yıkandı. A1 gözü hariç tüm gözlere 100 µl konjugat konuldu. Pleytin üzeri yapışkan film ile kapatılarak, orbital çalkalayıcıda 37 °C'de 60 dakika inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrası yapışkan film çıkarıldıktan sonra pleytler ELISA yıkayıcı ile yıkama solüsyonu kullanılarak tekrar 5 kez yıkandı. Yıkama sonrası, A1 gözü hariç tüm gözlere 100 µl tetramethylbenzidine (TMB) solüsyonu konuldu. Oda sıcaklığında (18-25°C'de) 15 dakika karanlıkta bekletildi. Süre sonunda A1 gözü hariç tüm gözlere 100 µl stop solüsyonu konuldu. Sonuçlar ELISA okuyucuda 450 nm filtre seçilerek okundu.

Test geçerliliği için, negatif kontrollerin ortalaması 0,200 optik dansiteden (OD) yüksek olmalı, pozitif kontrolün absorbansı ise negatif kontrollerin ortalama absorbansının yarısından düşük olmalıdır. Yapılan testlerde kullanılan kontroller bahsedilen şartlara uygun olarak tespit edildi. Negatif kontrolün absorbansının serum örneklerinin absorbansına oranı 1,5'ten küçük ise negatif, 1,5-1,99 arası şüpheli ve 2,0'den büyük ise pozitif kabul edildi. Şüpheli bulunan örnekler tekrar test edildi.

3.2.4. RNA Ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonu için ticari olarak temin edilen High Pure Viral Nucleic Acid Kiti (Roche, Cat No: 11858874001, Mannheim, Almanya) kullanıldı. Steril mikro tüp içerisine 200 µl virüs şüpheli materyal (plazma veya kene homojenizatı süpernatantı)

konuldu. Bunun üzerine 600 µl (hacminin % 1 oranında Poly A içeren) binding buffer ve 50 µl Proteinaz K eklenildi. Örnek vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 72 °C'de ki su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Karışımın 700 µl'si 2 ml hacimli toplama tüpü içerisine yerleştirilen spin kolonuna transfer edildi ve 8000 g'de 60 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atılarak aynı işlem kalan karışım bitene kadar tekrarlandı. Bu işlemler sonunda spin kolonun yer aldığı toplama tüpü değiştirildi ve spin kolona 500 µl Removal buffer konularak 8000 g'de 60 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpü tekrar değiştirilerek spin kolonu 450 µl wash buffer konuldu ve tekrar 8000 g'de 60 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpü değiştirildikten sonra spin kolona tekrar 450 µl wash buffer konuldu ve 8000 g'de 60 saniye santrifüj yapıldı. İşlem sonunda spin kolon 1,5 ml hacimli toplama tüpü içerisine yerleştirildi. Spin kolona RNase içermeyen steril distile sudan 50 µl konuldu ve 8000 g'de 60 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpünün tabanında biriken RNA örneği rRT-PCR çalışmalarında kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

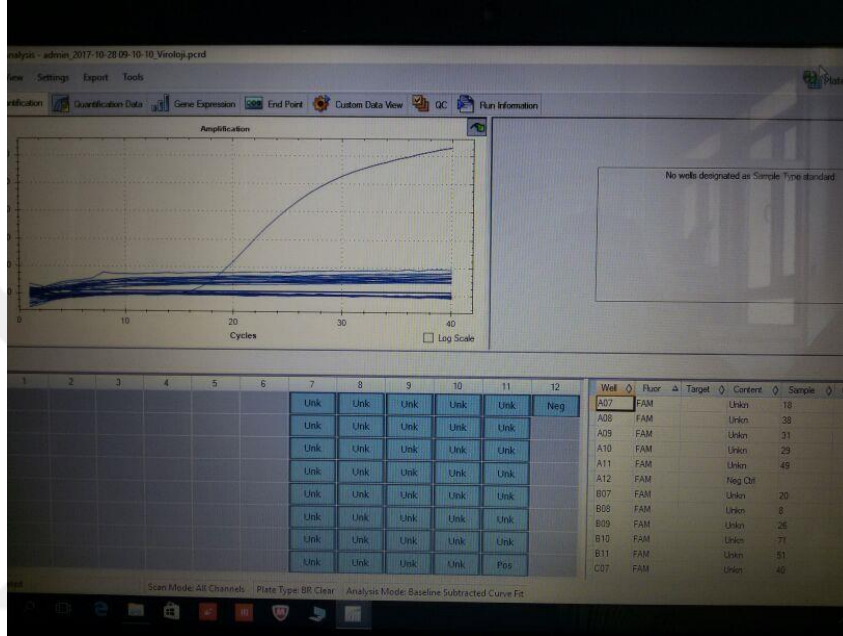
3.2.5. rRT PCR

rRT PCR işlemleri CFX Connect Optic Module (Biorad, Singapore) cihazında gerçekleştirildi. rRT PCR için ticari olarak temin edilen tek aşamalı PCR kiti üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı (iTaQ™ Universal Probes One-Step Kit, Cat No: 1725141, Biorad, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri). Reaksiyon toplam hacmi 25 µl olarak hesaplandı. Reaksiyona giren bileşenlerin hacmi ise; 12,5 µl 2X iTaQ Universal Probes One-Step Reaksiyon miksi, 5 µl distile su, 0,8 µl'şer primerler (konsantrasyonu 10 pmol), 0,4 µl prob (konsantrasyonu 10 pmol), 0,5 µl enzim karışımı (iTaQ DNA polimeraz ve reverse transkriptaz; 5U) ve 5 µl RNA olarak hesaplandı. Örnekler, buz aküsü üzerinde hazırlanarak cihaza özel tüplere konulduktan sonra cihaza yerleştirildi. Cihazda ısıl koşullar şu şekilde ayarlandı: revers transkripsiyon basamağı için 50 °C'de 10 dakika, reverse transkriptaz enzim inaktivasyonu için 95 °C'de 3 dakika inkübe edildi. Bunu takiben 40 siklus boyunca, ön denatürasyon için 95 °C'de 5 saniye, annealing basamağı için 60 °C'de 15 saniye inkübasyona bırakıldı. Son olarak ise soğutma basamağında 12 °C'de soğuma için bekletildi. Sonuçlar gerçek zamanlı olarak bilgisayar ekranında takip edildi.

4. BULGULAR

4.1. Moleküler Çalışma Sonuçları

rRT PCR sonuçlarına göre, sığır koyun ve keçilerden toplanan 779 kene homojenizatının ve 708 tam kan örneklerinden hiçbirisinde TBEV RNA'sına rastlanılmadı.



Şekil 11. Saha örneklerinin rRT PCR’da oluşturduğu ışımaya eğrileri ve sonuçları

4.2. Serolojik Çalışma Sonuçları

460 koyun, keçi ve sığırdan toplanan kan serumu örnekleri EIA TBEV Ig Kiti (Test Line, Brno, Çekya) ile testi sonucunda serumların 83’ünde antikor tespit edildi. Seropozitiflik dağılımı Tablo 7’de sunuldu. Bu veriler Türkiye’de TBEV enfeksiyonuna dair hayvan türlerindeki ilk serolojik ve virolojik bulguları içermektedir.

Tablo 7. İllerin pozitiflik yüzdeleri

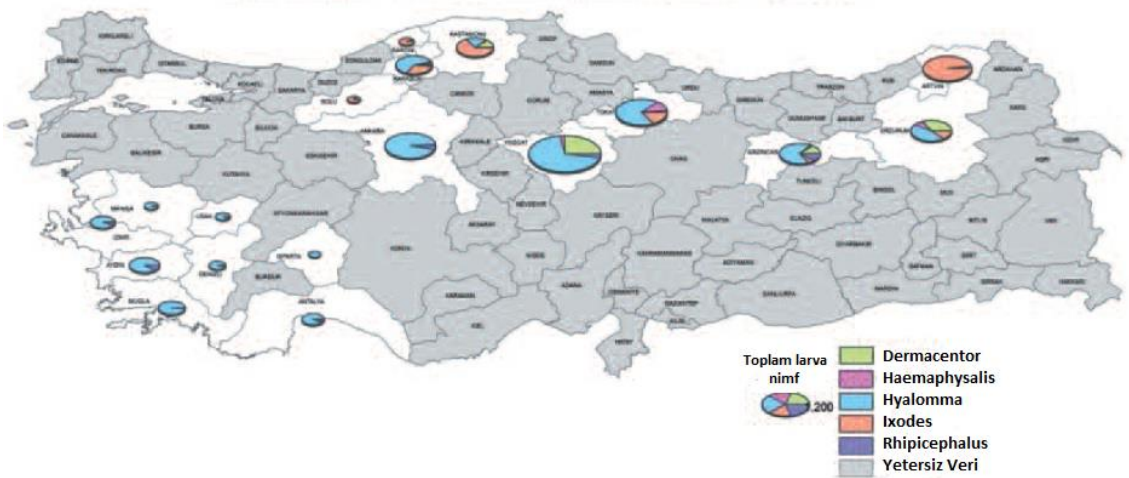
	KOYUN (%)	KEÇİ (%)	SIĞIR(%)	TOPLAM
TOKAT	1/50 (2)	7/77(9,1)	17/63 (27)	25/190(13,2)
SİVAS	13/55 (23,6)	-	24/50 (48)	37/105 (35,2)
SAMSUN	1/42 (2,4)	0/38 (0)	20/85 (23,5)	21/165 (12,7)
TOPLAM	15/147 (10,2)	7/115 (6,1)	61/198 (30,8)	83/460 (18,04)

Hayvan türleri arasında %30,8 ile en yüksek sığırlarda seropozitiflik saptanırken, onu %10,2 ile koyun ve %6,1 ile keçi izledi. İllere göre en yüksek seropozitiflik %35,2 oranıyla Sivas ilinde, onu takiben %13,2 oranıyla Tokat ilinde ve %12,7 oranıyla Samsun ilinde tespit edildi. Hayvanların üzerinden 9 farklı kene türü toplanmıştır. En yaygın kene türü %32,4 (850/2625) oranıyla *H.sulcata* tespit edildi. Onu %27,2 (715/2625) oranıyla *R.turanicus*, %16,6 (437/2625) oranıyla *D.marginatus*, %7,2 (189/2625) oranıyla *H.marginatum* izledi. Ülkemizde TBEV'nin ana vektörü olan *I.ricinus* ise % 0,5 (13/2625) oranında tespit edildi. Toplanan keneler ve toplandığı hayvan türleri hakkında detaylı bilgi Tablo 5'de sunuldu.



5. TARTIŞMA

Vektör kaynaklı viral enfeksiyonlarda antiviral tedavinin bulunmaması nedeniyle, ilgili virusların epidemiyolojisi ve yayılımının ortaya konulması önemlidir. Bu sayede enfeksiyonların ortaya çıkabileceği bölgeler önceden tahmin edilerek, vektör kontrolü veya aşılama gibi önleyici tedbirler zamanında alınabilir (Gubler, 2001). Ülkemizde TBEV ve diğer kene kökenli virüslerin varlığı hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. Kene ensefalitlerinin bulaşmasında temel rol oynayan *I. ricinus* türü kenelerin dağılım gösterdiği coğrafyalarda, TBEV seroprevalansı ülkeler arasında farklılık göstermektedir. Ülkemizde *I. ricinus*'a özellikle sahil bölgeleri başta olmak üzere birçok bölgede rastlanılmakta olup yağış miktarı ve bitki örtüsü fazla olan Karadeniz bölgesindeki sığırlarda en fazla saptanan ikinci tür olmuştur (Göksu, 1968) (Şekil 12). Bu çalışmada da *I. ricinus* sahil ili olan Samsun ilinde tespit edilmiş olup, Sivas ilinde tespit edilmemiştir. Samsun ilinde *Rhipicephalus* kenensinden sonra en çok tespit edilen kene türü olmasına karşın oran olarak oldukça düşük miktarda tespit edilmiştir.



Şekil 12. 2007-2008 yılları arasında bazı bölgelerde insanlardan toplanan kene larva ve nimflerinin örneklem büyüklüğü ve illere göre dağılımı (Aktaş ve Vatansver'den, 2014)

Schuhmacher ve ark. (1999), Fransa'da ELISA yöntemi ile insanlarda %1,6 oranında seropozitiflik saptamışlardır. Juceviciene ve ark. (2005), Litvanya'nın çeşitli coğrafi bölgelerdeki evcil hayvanların kan örneklerinde TBEV antikorlarını tespit etmiştir. Stjernberg ve ark. (2008), ELISA yöntemiyle yaptıkları çalışmalarında, 2002 yılında elde edilen kan örnekleri ile 1991'de elde edilen kan örneklerini karşılaştırmışlar, sonuçta TBEV-IgG seroprevalansında 2,4 kat artış bulunduğunu belirtmişlerdir. Salat ve

ark. (2017), Romanya’da koyunlarda % 15,02 seroprevalans saptamışlardır. Hudopisk ve ark. (2013) Slovenya’da çiğ keçi sütü tüketen insanlarda TBEV enfeksiyonunu bildirmişlerdir. Çalışmada sağlıklı kalan kişinin daha önce TBE’ye karşı aşılandığını belirtmişlerdir. Daha sonra enfekte çiftlikte koyun ve keçilerden alınan serum, kan ve süt örneklerinde yapılan çalışmada, keçi serum ve sütlerinde TBEV antikoru tespit edilmesine karşın koyunlarda antikor tespit edilememiştir. Sütü tüketilen keçiden alınan serum ve süt örneğinde TBEV RNA’sı tespit edilerek enfeksiyon kaynağı doğrulanmıştır. Diğer çiftlik hayvanlarından alınan numunelerde ise TBEV RNA saptanılmamıştır. Böhm ve ark. (2017) Almanya’da koyunlar üzerinde yaptığı çalışmada RT-PCR yöntemi ile beyin örneklerinde TBEV RNA’sı, serum örneklerinde ise TBEV antikoru tespit etmiştir. Serter (1980), insan serum örneklerinde HI testi ile % 1,4 nötralizasyon testi ile ise % 1,2 oranında antikor tespit etmiştir. Ergunay ve ark. (2007), insanlarda % 10,5 oranında TBEV IgG antikor tespit etmişlerdir. Uyar ve ark. (2007), ELISA yöntemi ile insanlarda TBEV IgG antikor tespit etmişlerdir. Güneş ve ark. (2010), Sinop’ta IFA yöntemiyle yaptıkları çalışmada insanlarda TBEV IgG pozitif olarak saptamışlar ancak yalancı pozitif sonuç olasılığını göz ardı etmeyerek olguları “olası” olarak değerlendirmişlerdir. Karan (2010), Tokat ve Ordu çevresindeki sert kenelerde yaptığı çalışmada TBEV’nin varlığını RT-PCR yöntemi ile ortaya koymaya çalışmıştır. Çalışma sonucunda toplanan kenelerde TBEV varlığına rastlanılamamıştır. Ergunay ve ark. (2011), yaptıkları bir başka çalışmada insanlarda TBEV seroprevalansını % 1,9 oranında tespit etmişlerdir. Bu çalışma *I. ricinus*’un yaşam döngüsü için uygun olan Karadeniz Bölgesindeki Samsun, Tokat ve Sivas illerinde gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda TBEV RNA’sı tespit edilememesinin nedeni, bu illerdeki hayvanlardan toplanan kene türleri içerisinde TBEV ana vektörü olan kene türlerinin az sayıda olmasından kaynaklanmış olabileceği tahmin edilmektedir. Toplanacak fazla miktardaki TBEV vektörü olan kene türleri ile yapılacak bir çalışmada farklı sonuçların çıkabileceği öngörülmektedir. Bu çalışmadan daha fazla *I. ricinus* türü kene kullanmasına rağmen Karan’da (2010) TBEV RNA’sı tespit edilememiştir. Bu durum çalışma alanımızdaki kene türlerinin TBE virüsüyle enfekte olmadığı yönünde yorumlanabilir. Kan serumu örneklerinin 83’ünde antikor (IgG) tespit edilmiş olup, bu örnekler nötralizasyon testi ile doğrulanmamıştır. Çapraz reaksiyon düşünüldüğünde ELISA ile alınan pozitif sonuçların nötralizasyon testi ile doğrulanması önerilmektedir (Holzmann, 2003). Etkenin

biyogüvenlik 3 seviyesinde çalışılmasından dolayı canlı virüs ile çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada sığırlardaki (%30,8) seropozitiflik oranı koyun (%10,2) ve keçilere (%6,1) oranla daha yüksek bulunmuştur. Bunun sebebi sığırların yaşam sürelerinin daha uzun olması, damızlık olarak sürüde daha uzun süre tutulması ve erişkin kenelerin daha çok büyük memeli hayvanları tercih etmesinden dolayı kenelere daha uzun süre maruz kalmasıyla alakalı olabileceği düşünülmektedir. Ancak Juceviciene ve ark.'nın (2005), yaptığı çalışmada koyunlardaki seropozitiflik oranı sığır ve keçilerdeki orandan daha yüksek bulunmuştur. Bu iki çalışma arasındaki farkın iki nedenden dolayı oluşabileceği düşünülmektedir. Birincisi, ülkemizdeki küçükbaş hayvan yetiştiricilerinin kene ile mücadelede daha duyarlı olduğu, ikincisi ise kenelerin aktif olduğu yaz aylarında küçükbaş sürülerin keneler için uygun yaşam alanı olmayan nemin ve sıcaklığın düşük olduğu yüksek alanlarda otlatılması olduğu düşünülmektedir. İllere göre değerlendirme yapıldığında ise Sivas'taki (%35,2) seropozitiflik oranının Samsun (%12,7) ve Tokat'tan (%13,2) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Buradaki farkın Samsun ve Tokat illerindeki hayvan yetiştiricilerinin sürü yönetimine daha hakim olmalarından ve kene ile mücadelede akarazit kullanımını düzenli yapmalarından ileri geldiği düşünülmektedir. Ayrıca Serolojik çalışmalar örneklenen hayvan sayısı, örneklenen hayvanların yaşı, örnekleme zamanı, bakım ve beslenme koşulları ve bireysel farklılıklar gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Bu faktörlerin hep birarada veya ayrı ayrı olması koşulunda serolojik çalışma sonuçlarında o oranda etkilenmektedir.

Bu çalışmanın sonuçlarıyla Türkiye'de ilk defa hayvanlarda serolojik ve virolojik olarak TBEV enfeksiyonu hakkında bilgi üretilmiştir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, kene kaynaklı hastalıkların endemik olarak seyrettiği Orta Karadeniz Bölgesindeki Samsun, Tokat ve Sivas illerindeki hayvanlardan örneklenen kan ve toplanan kenelerde virüs tespit edilememesine karşın, aynı bölgeden toplanan hayvanların serum örneklerinde antikor tespit ediliyor olması virüsün bölgede sirküle olduğuna işaret etmektedir. Kan ve kene örneklerinde virüsün tespit edilememesinin ana nedeninin örnekleme zamanı ve örneklemede ülkemiz için ana vektör olan *Ixodes ricinus* kene türünde yeterli örneklem büyüklüğüne erişilememesi olduğu düşünülmektedir. Çalışmanın serolojik sonuçları göz önüne alındığında ülkemizdeki *I. ricinus* popülasyonu nedeniyle kene ısırığı vakalarında özellikle etkenin açıklanamadığı sinir sistemi enfeksiyonlarında TBEV enfeksiyonunu göz ardı edilmemelidir. Özellikle hayvan bakıcıları, yetiştiricileri, kırsalda yaşayanlar, mezbaha personeli ve hayvan sağlığı çalışanları için büyük risk oluşturmaktadır. Bu nedenle hayvanlarda, özellikle de şimdiye kadar ihmal edilen küçük ruminantlarda kene mücadelesine önem verilerek hayvanların dış parazitlerinden korunmasına dikkat edilmeli ve rutin kontroller belli program dahilinde uygulanmalıdır. TBEV enfeksiyonu gibi vektör kenelerle bulaşan KKKAV enfeksiyonun yıllara oranla sığırlarda seropozitifliğin düşüyor olması, yıllardır sığırlarda bakanlık destekli keneye kimyasal mücadelenin etkili olduğu tezini doğrulamaktadır. Bu konudaki kamu desteğinin artırılarak devam ettirilmesi sağlanmalıdır. Viremik dönemde kesime sevk edilen hayvanlar, mezbaha personeli ve veteriner sağlık çalışanları için büyük risk oluşturmaktadır. Bu nedenle TBE hastalığının bu bulaşma yoluna dikkat çekilmeli, personele eğitim verilerek farkındalık oluşturulmaya çalışılmalıdır. Beşeri ve veteriner hekimleri TBEV konusu hakkında bilgilendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca keçi sütünün TBE'nin insanlara bulaşmasında önemli bir risk faktörü olduğu unutulmamalı ve özellikle TBE riskli alanlarda keçi ve koyun sağımı yapan insanlar ile tüketicileri pastörize edilmemiş keçi sütü tüketilmemesi konusunda uyarılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Aktaş M, Vatanserver Z, Ixodid Kene Biyolojisi ve Türkiye Keneleri. *Turkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics* 2014;7(2):1-8.
- Amato Gauci A, Zeller H. Tick-borne encephalitis joins the diseases under surveillance in the European Union. *Euro Surveill* 2012; 17(42):pii=20299.
- Barrett PN, Schober Bendixen S, Ehrlich HJ. History of TBE vaccines. *Vaccine* 2003;21:41-49.
- Blaskovic D. Outbreak of tick-borne encephalitis in Roznava natural focus. Bratislava: Vydavatelstvo SAV; 1954.
- Böhm B, Schade1 B, Bauer B, Hoffmann B, Hoffmann D, Ziegler U, Beer M, Klaus C, Weissenböck H, Böttcher J. Tick-borne encephalitis in a naturally infected sheep. *BMC Veterinary Research* (2017) 13:267.
- Bursalı A, Keskin A, Tekin S. A review of the ticks (*Acari: Ixodida*) of Turkey: species diversity, hosts and geographical distribution. *Exp Appl Acarol* 2012;57:91–104.
- Caini S, Szomor K, Ferenczi E, Szekelyne Gaspar A, Csohan A, Krisztalovics K. Tick-borne encephalitis transmitted by unpasteurised cow milk in western Hungary, September to October 2011. *Euro Surveill* 2012; 17:pii:20128.
- Carpi G, Bertolotti L, Rosati S, Rizzoli A. Prevalence and genetic variability of tick-borne encephalitis virüs in host-seeking *Ixodes ricinus* in northern Italy. *J Gen Virol* 2009; 90:2877-83.
- Charrel RN, Attoui H, Butenko AM, Clegg JC. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe, *Clin Microbiol Infect* 2004;10(12):1040-1055.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM, Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu Rev Microbiol* 1990; 649–688.
- Chumakov MP, Zeitlenok NA. Tick-borne Spring-Summer encephalitis in the Ural region. *Neuroinfections in the Ural. Sverdlovsk.*1940. p. 23-30.
- Cisak E, Sroka J, Zwolinski J, Uminski J. Seroepidemiologic study on tick-borne encephalitis among forestry workers and farmers from the Lublin region (eastern Poland). *Ann Agric Environ Med* 1998;5(2):177-181.
- Dobler G, Gniel D, Petermann R, Pfeffer M. Epidemiology and distribution of tick-borne encephalitis. *Wien Med Wochenschr* 2012; 162:230-8.
- Drozdov SG. Role of domestic animals in epidemiology of diphasic milk fever. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii.* 1959;30(4):102-8.

- Dryden MW, Flea and tick control in the 21st century: challenges and opportunities. *Vet Dermatol* 2009;20:435-440.
- Dumpis U, Crook D, Oksi J. Tick-borne encephalitis. *Clin Infect Dis* 1999;28:882-890.
- ECDC 2018. Tick-borne encephalitis - Annual Epidemiological Report for 2016. https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER_for_2016-TBE.pdf.
Erişim tarihi : 16.05.2019
- Ergunay K, Ozer N, Us D, Ozkul A, Simsek F, Kaynas S, Ustacelebi S. Seroprevalence of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in southeastern Turkey: first evidence for tick-borne encephalitis virus infections. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007;7(2):157-161.
- Ergunay K, Chris A. Whitehouse CA, Özkul A. Current Status of Human Arboviral Diseases in Turkey. *Vector-borne and zoonotic dis* 2011;11(6):731-741.
- Ergunay K, Saygan MB, Aydoğan S, Litzba N, Sener B, Lederer S, Niedrig M, Haşçelik G, Us D. Confirmed exposure to tick-borne encephalitis virus and probable human cases of tick-borne encephalitis in Central/Northern Anatolia, Turkey. *Zoonoses Public Health* 2011;58(3):220-227.
- Esen B, Gozalan A, Coplu N, Tapar FS, Uzun R, Aslan T, Ertek M, Buzgan T, Akin L. The presence of tick-borne encephalitis in an endemic area for tick-borne diseases, Turkey. *Trop Doct* 2008;38(1):27-28.
- Estrada Pena A, Ayllon N, De La Fuente J. Impact of climate trends on tick-borne pathogens transmission. *Frotiers in Physiology*, 2012;3:1-12.
- Füzik T, Formanova P, Ruzek D, Yoshii K, Niedrig M, Plevka P. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody. *Nat. Commun.* 2018;9:436.
- Fomsgaard A, Christiansen CB, Bodker R. First identification of tick-borne encephalitis in Denmark outside of Bornholm, August 2009. *Euro Surveill* 2009;14:pii=19325.
- Gallia F, Rampas J, Hollender L. Laboratory infections caused by tick-borne encephalitis virus. *Casopis lekaru ceskych.* 1949;88:224-9.
- Göksu K. Batı Karadeniz Bölgesi İllerinin Sığırlarında Müşahade Edilen Babesidae (Sporozoa: Piroplasmida) Enfeksiyonları ve Kene Enfestasyonları. *Ankara Üniv Vet Fak* 1968;15(1):46-57.
- Gubler DJ. Human arbovirus infections worldwide. *Ann N Y Acad Sci* 2001;951:13-24.

- Günel E, Kene kaynaklı ensefalit. *Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics* 2014;7(2):85-91.
- Güneş T, Poyraz Ö, Ataş M, Alim A. Sinop'ta kırsal kesimde yaşayan kişilerde kene kaynaklı ensefalit virüsü (TBEV) seroprevalansı. *Mikrobiyol Bul* 2010;44:585-591
- Gritsun TS, Venugopal K, Zanotto PM, Mikhailov MV, Sall AA, Holmes EC, Polkinghorne I, Frolova TV, Pogodina VV, Lashkevich VA, Gould EA. Complete sequence of two tick-borne flaviviruses isolated from Siberia and the UK: analysis and significance of the 5' and 3' UTRs, *Virus Res* 1997;49(1):27-39.
- Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res* 2003;57:129-146.
- Grgic Vitek M, Klavs I. High burden of tick-borne encephalitis in Slovenia challenge for vaccination policy. *Vaccine* 2011; 29:5178-83.
- Haglund M, Günther G. Tick-borne encephalitis-pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine*. 2003;21(1):11-18
- Hasöksüz M. Kene kaynaklı ensefalitler. Düzenleme Komitesi: Bodur H, Ceyhan İ, Torunoğlu MA, Yazıcıoğlu N. II. Ulusal Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu Bildiri Kitabı. 1. Baskı. Ankara: Medisan 2008;147-150.
- Herpe B, Schuffenecker I, Pillot J, Malvy D, Clouzeau B, Bui N. Tickborne encephalitis, southwestern France. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:1114-6.
- Holzmann H. Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine* 2003;21(11):36-55.
- Hudopisk N, Korva M, Janet E, Simetinger M, Vitek MG, Gubensek J, Natek V, Kraigher A, Strle F, Zupanc TA. Tick-borne Encephalitis Associated with Consumption of Raw Goat Milk, Slovenia, 2012. *Emerging Infectious Diseases* 2013; 19:5: 806-808.
- Juceviciene A, Vapalahti O, Laiskonis A, Ceplikiene J, Leinikki P. Prevalence of tick-borne encephalitis virus antibodies in Lithuania. *J Clin Virol* 2002;25(1):23-27.
- Juceviciene A, Zygutiene M, Leinikki P, Korvenkontio HB, Salminen M, Han X, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis virus infections in Lithuanian domestic animals and ticks, *Scand J Infect Dis* 2005;37(10):742-746.
- Kaiser R. The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98: a prospective study of 656 patients. *Brain* 1999;122(11):2067-2078.

- Kaiser R. Tick-borne encephalitis: Clinical findings and prognosis in adults. *Wien Med Wochenschr* 2012;162(11-12):239-243.
- Karan T. Tokat ve Ordu çevresindeki sert kenelerde (Acarı: *Ixodidae*) Kene-kökenli ensefalit virüsü varlığı tespiti. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat, Yüksek Lisans Tezi, 2010.
- Karelis G, Bormane A, Logina I, Lucenko I, Suna N, Krumina A, et al. Tick-borne encephalitis in Latvia 1973-2009: epidemiology, clinical features and sequelae. *Eur J Neurol* 2012; 19:62-8.
- Kim SY, Yun SM, Han MG, Lee IY, Lee NY, Jeong YE, Lee BC, Ju YR. Isolation of Tick-Borne Encephalitis Viruses from Wild Rodents, South Korea 2008, *Vec Borne Zoo Dis*, 8, 7-15.
- Kim S, Jeong Y, Yun M. Division of Arbovirus, Center for Immunology and pathology. 2009;23(5):15-20.
- Kunz C. TBE vaccination and the Austrian experience. *Vaccine* 2003;21(2):50–55.
- Kunze U. Is there a need for a travel vaccination against tick-borne encephalitis? *Travel Med Infect Dis* 2008; 6:380-3.
- Kollaritsch H, Chmelik V, Dontsenko I, Grzeszczuk A, Kondrusik M, Usonis V. The current perspective on tick-borne encephalitis awareness and prevention in six Central and Eastern European countries: report from a meeting of experts convened to discuss TBE in their region. *Vaccine* 2011; 29:4556-64.
- Kollaritsch H, Krasilnikov V, Holzmann H, Karganova G, Barrett A, Suss J. Background Document on Vaccines and Vaccination against Tick-borne Encephalitis (TBE). Available at: http://www.who.int/immunization/sage/6_TBE_backgr_18_Mar_net_apr_2011.pdf. January 3, 2013.
- Kritz G, Leschnik M, Leidinger E: *Ixodes ricinus*: Gemeingefährlich für Hundes! *Kleintierpraxis* 2001;46:151-160.
- Labuda M, Nuttall PA. Tick-borne viruses. *Parasitology* 2004;129:221-245.
- Laursen K, Knudsen JD. Tick-borne encephalitis: a retrospective study of clinical cases in Bornholm, Denmark. *Scand J Infect Dis* 2003; 35:354-7.
- Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *The Lancet* 2008;371(9627):1861-1871.

- Lundkvist K, Vene S, Golovljova I, Mavtchoutko V, Forsgren M, Kalnina V. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Latvia: evidence for co-circulation of three distinct subtypes. *J Med Virol* 2001; 65:730-5.
- Lundkvist A, Wallensten A, Vene S, Hjertqvist M. Tick-borne encephalitis increasing in Sweden. *Euro Surveill* 2011;16.
- Mantke OD, Karan LS, Ruzek D. Tick-Borne Encephalitis Virus: A General Overview. In: Ruzek D, editor. *Flavivirus Encephalitis: InTech*; 2011. p. 133-56.
- Molnar GB, Perseca T, Feder A, Pacuraru D, Marialaki E, Cojan A. Epidemiological assessment of morbidity and natural foci of TBE-CEE virus infection in Transylvania. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2008; 112:471-7.
- Niedrig M, Avsic T, Aberle SW, Ferenczi E, Labuda M ve ark. Quality control assessment for the serological diagnosis of tick borne encephalitis virus infections. *J Clin Virol* 2007;38:260–264.
- Nuhoğlu İ, Aydın M, Türedi S, Gündüz A, Topbaş M. Kene ile bulaşan hastalıklar. *TAF Prev Med Bull*, 2008;7,461-468.
- Öktem MA, Ege mikrobiyoloji günleri – Laboratuvar dan kliniğe-3 24-25 aralık 2010 Denizli
- Pavlidou V, Geroy S, Diza E, Antoniadis A, Papa A. Epidemiological study of tick-borne encephalitis virus in northern Greece. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007;7(4):611-5.
- Petri E, Gniel D, Zent O. Tick-borne encephalitis (TBE) trends in epidemiology and current and future management. *Travel Med Infect Dis* 2010; 8:233-45.
- Petrishcheva PA, Levkovich EN. Spring-Summer encephalitis in Leningrad region. *Papers of Medical Officers of Volkhov Front. Leningrad, Rusya*.1945.
- Pfeffer M, Dobler G. Tick-borne encephalitis virus in dogs-is this an issue?. *Parasites & vectors* 2011;4(1):59.
- Porterfield JS. Antigenic characteristic and classification of Togaviridae. In: RW Schelesinger (ed.), *The togaviruses: biology, structure, replication*. Academic Press, Inc., New York, N.Y., 1980;13-46.
- Proutski V, Gould EA, Holmes EC: Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: similarities and differences, *Nucleic Acids Res* 1997;25(6):1194-1202.
- Pulkkinen LIA, Butcher SJ, Anastasina M. Tick-Borne Encephalitis Virus: A Structural View 2018;10(7):350.

- Resmi Gazete, Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm>. Erişim tarihi: 06.12.2018
- Rizzoli A, Hauffe HC, Tagliapietra V, Neteler M, Rosa R. Forest structure and roe deer abundance predict tick-borne encephalitis risk in Italy. *PLoS One* 2009; 4:e4336.
- Rizzoli A, Hauffe HC, Carpi G, Neteler M, Rosa R. Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill* 2011;16.
- Salat J, Mihalca AD, Mihaiu M, Modry D, Ruzek D. Tick-Borne Encephalitis in Sheep, Romania. *Emerging Infectious Diseases* 2017;23-12.
- Schneider H. Über epidemische akute meningitis serosa. *Wien Klin Wschr* 1931;44:350.
- Schuhmacher H, Hoen B, Baty V, Henny J, Le Faou A, Canton P. Seroprevalence of Central European tick-borne encephalitis in the Lorraine region. *Presse Medicals* 1999;28(5):221-224.
- Schwaiger M, Cassinotti P. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of TBEV RNA. 2003;27(2):136145.
- Serter F. Tick-borne meningo-encephalitis cases in Izmir area. *EU Tıp Fak Mec* 1968;7:1-13.
- Serter D. Present status of arbovirus sero-epidemiology in the Aegean region of Turkey. In: Vesenjak-Hirjan J, Porterfield JS, Arslanagic E, eds. *Arboviruses in the Mediterranean Countries*. Stuttgart, NY: Gustav Fisher-Verlag;1980;155-161.
- Shapoval AN. Inapparent forms of tick-borne encephalitis. *Zn Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1977;(5):11-17.
- Skarpaas T, Sundoy A, Vene S, Pedersen J, Eng PG, Csángó PA. Tick-borne encephalitis in Norway. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2002;122:30-32.
- Skarpaas T, Csángó PA, Pedersen J. Tick-borne encephalitis in coastal areas of the Agder Counties. MSIS report. Oslo: The National Institute of Public Health; 2001.
- Sonenshine DE. *Biology of Ticks*. Volume 1. Newyork, Oxford: Oxford University Press, 1991;447.
- Sonnenberg K, Niedrig M, Steinhagen K, Rohwader E. State-of-the-art serological techniques for detection of antibodies against Tick-borne encephalitis virus. *Int J Med Microbiol* 2004;293(37):148-151.
- Stanek G, Wormser G, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet*, 2011, 379, s 461-473.

- Stefanoff P, Polkowska A, D'Ancona FP, Giambi C, Bruhl DL, O'Flanagan D, Dematte L, Lopalco P, Johans K. Tick-borne encephalitis surveillance systems and vaccination recommendations in UE/EEA, 2009. http://venice.cineca.org/final_report_TBE_19-01-2011.pdf Erişim tarihi: 01.03.2019
- Stefanoff P, Rogalska J, Zajkowska J, Czerska M, Seroka W, Czarkowski MP. Surveillance of aseptic central nervous system infections in Poland: is it meeting its objectives? *Euro Surveill* 2011; 16:pii=19924.
- Stjernberg L, Holmkvist K, Berglund J. A newly detected tick-borne encephalitis (TBE) focus in south-east Sweden: A follow-up study of TBE virus (TBEV) seroprevalence, *Scand J Infect Dis* 2008;40:4-10.
- Sumilo D, Bormane A, Asokliene L, Lucenko I, Vasilenko V, Randolph S. Tick-borne encephalitis in the Baltic States: identifying risk factors in space and time. *Int J Med Microbiol* 2006; 296(Suppl 40):76-9.
- Süss J, Sinnecker H, Sinnecker R, Berndt D, Zilske E, Dedek G. Epidemiology and ecology of tick-borne encephalitis in the eastern part of Germany between 1960 and 1990 and studies on the Dynamics of a natural focus of tick-borne encephalitis, 1992;224-235.
- Süss J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine* 2003;21:19-35.
- Süss J. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond-the epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveill* 2008;13:(26)18916.
- Süss J. Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-an overview. *Ticks Tick Borne Dis* 2011; 2:2-15.
- Takeda T, Ito T, Osada M, Takahashi K, Takashima I. Isolation of tick-borne encephalitis virus from wild rodents and a seroepizootiologic survey in Hokkaido, Japan. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60:287-291.
- Uyar Y, Akçalı A, Çarhan A, Özkaya E, Ertek E. Türkiye'de kene ısırığı öykülü olgularda tickborne encephalitis virüsünün seroprevalansı. *Türk Hijyen Den Biyol Derg* 2007;64(2):21-25.
- Wagner PR. Risk and Prevention of Tick-borne Encephalitis in Travelers. *J Travel Med* 2004; 11:307-312.
- Yoshii K, Song JY, Park SB, Yang J, Schmitt HJ. Tick-borne encephalitis in Japan, Republic of Korea and China. *Emerg Microbes Infect.* 2017 Sep; 6(9): e82.



T.C.

GIDA TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI
Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



Tarih/Sayı:29.07.2016/7-2
Karar No : 7- 2

ETİK KURUL RAPORU

Kurulumuza 25/07/2016 tarihinde başvurusu yapılan Doç. Dr. Harun Albayrak' ın yürütücüsü bulunduğu «Orta Karadeniz Bölgesinde Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV) enfeksiyonunun Epidemiyolojisi» konusundaki araştırma projesi kurulun 29/07/2016 tarihli oturumunda değerlendirilmiştir.

Karar: Projenin yürütülmesi uygun görülmüştür.

Üye
Muh UZUN

Üye
Yüksel DURMAZ
(Katılmadı)

Üye
Yunus GÜR

Üye
Remzi YURTSEVEN

Başkan
Dr. Neslihan ORMANCI

Üye
Gülnur SAĞLAM

Üye
Gülnur SERDAR
(Katılmadı)

Üye
Faruk ÇOPOĞLU

Üye
Adem ÖZTÜRK

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Gökhan ASAL

Doğum Yeri: Samsun

Doğum Tarihi: 24.09.1983

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller:

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Lisans

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: 19 Mayıs İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü

E-posta: gokhanasal55@hotmail.com