



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNER VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**EGE BÖLGESİNDE VİRUS NEDENLİ ARI  
HASTALIKLARININ MULTİPLEKS POLİMERAZ  
ZİNCİR REAKSİYONU İLE ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Abdurrahman Anıl ÇAĞIRGAN**

**Samsun  
Aralık-2018**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNER VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**EGE BÖLGESİNDE VİRUS NEDENLİ ARI  
HASTALIKLARININ MULTİPLEKS POLİMERAZ ZİNCİR  
REAKSİYONU İLE ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Abdurrahman Anıl ÇAĞIRGAN**

**Danışman  
Prof. Dr. Zafer YAZICI**

**Samsun  
Aralık-2018**

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

A.Anıl ÇAĞIRGAN tarafından Prof. Dr. Zafer YAZICI Danışmanlığında hazırlanan 'Ege Bölgesi'nde Virus Nedenli Arı Hastalıklarının Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Araştırılması' başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından .... /.../...tarihinde yapılan sınav ile Veteriner Viroloji Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Zafer YAZICI, ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ

Üye : Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA, ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ

Üye : Prof. Dr. Oktay GENÇ, ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ

Üye : Prof. Dr. Aykut ÖZKUL, ANKARA ÜNİVERSİTESİ

Üye : Prof. Dr. Kürşat AZKUR, KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

ONAY

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

.... / .... /.....

**Prof. Dr. Ahmet UZUN**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora eğitimime başladığım Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Ana Bilim Dalının bir üyesi olmaktan onur ve gurur duyduğumu belirtmek isterim.

Doktora eğitimim boyunca desteklerini benden esirgemeyen başta tez danışmanım Prof. Dr. Zafer YAZICI ile değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA, Prof. Dr. Harun ALBAYRAK ve Prof. Dr. Oktay GENÇ'e katkılardan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince derslerimi aksatmadan katılabilmemi sağlayan Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürü Uzman Veteriner Hekim İsmail AYDIN'a, çok değerli şefim Uzman Veteriner Hekim Kürşad ÜSTÜNAKIN' a, Veteriner Hekim Gülnur ATALAR SERDAR' a, Dr. Hamza KADI' ya ve Veteriner Hekim Ayhan AKMAN' a teşekkür ederim.

Tez dönemim boyunca desteklerini esirgemeyen ve halen çalışmakta olduğum İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü idaresine, değerli şefim Uzman Veteriner Hekim Dr. Gülnur KALAYCI'ya, çalışma arkadaşlarım Dr. Murat KAPLAN' a, Dr. Kemal PEKMEZ' e, Dr. Buket ÖZKAN' a ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Ana Bilim Dalında görev yapan Arş. Gör. Cüneyt TAMER' e teşekkür ederim.

Son olarak, hayatımın her döneminde bana maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, doktora eğitimime teşvik eden ailemin kıymetli bireyleri babam Adnan ÇAĞIRGAN, annem Hülya ÇAĞIRGAN, kardeşim Cansu ÇAĞIRGAN ve ailemize yeni katılan nişanlım Özge YILMAZ' a teşekkür ederim.

Bu çalışma, PYO.VET.1904.17.010 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

## ÖZET

### EGE BÖLGESİ' NDE VİRUS NEDENLİ ARI HASTALIKLARININ MULTİPLEKS POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE ARAŞTIRILMASI

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı yedi önemli arı virusuna karşı rutin teşhis laboratuvarlarında daha hızlı sonuç elde etmek için multipleks RT-PCR (mRT-PCR) testinin geliştirilmesi ve bu testi kullanarak Ege Bölgesinde bu yedi virus kaynaklı arı viral hastalıklarının tespit edilmesidir.

**Materyal ve Metot:** Bu çalışmanın ilk aşamasında İsrail akut arı felci virusu (IAPV), Deforme kanat virusu (DWV), Sacbrood virusu (SBV), Akut arı felci virusu (ABPV), Siyah kraliçe hücre virusu (BQCV), Kaşmir arı virusu (KBV) ve Kronik arı felci virusu (CBPV) teşhisinde kullanılacak mRT-PCR metodu modifiye edilerek optimizasyonu gerçekleştirildi. İkinci aşamada Ege Bölgesi' nin yedi ilindeki arı işletmelerinden çok aşamalı metot kullanılarak toplanan örnekler yedi virusa karşı geliştirilen mRT-PCR ile test edildi ve pozitif bulunan numunelerin dizi ve filogenetik ağaç analizleri yapıldı.

**Bulgular:** Optimize edilen mRT-PCR metodu için log<sub>10</sub> tabanlı seri dilüsyonlarda virus kopya sayısı 2500 kopya/μL olarak tespit edildi. Ege Bölgesinde örnekleme yapılan işletmelerde viral etkenlerin prevalansları DWV % 25.2, BQCV % 20.7, ABPV % 3.6, SBV % 2.7 ve CBPV % 1.8 olarak belirlendi. KBV ve IAPV ise tespit edilmedi. Filogenetik analiz sonucunda bazı genetik benzerlikler ve farklıların olduğu gözlemlendi.

**Sonuç:** Multipleks RT-PCR' ın yedi etkeni eş zamanlı olarak tespit etmesi ile ekonomik kazanç ve zaman kazandırdığı, aynı zamanda testin duyarlılığının yüksek olduğu ve rutin analizlerde de bu testin kullanılabileceği sonucuna varıldı. Geliştirilen bu test metodu ile Ege Bölgesi'nde 7 viral etkenin prevalansı belirlendi ve tespit edilen izolatların filogenetik analizi yapılarak akrabalık dereceleri incelendi.

**Anahtar Kelimeler:** mRT-PCR; Bal arısı virusları; Prevalans; Filogenetik

A. Anıl, ÇAĞIRGAN, Doktora Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Kasım-2018

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF VIRUS-INDUCED BEE DISEASES IN AEGEAN REGION WITH MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION

**Objective:** The aim of this study was to develop a multiplex RT-PCR (mRT-PCR) test to obtain faster results in routine diagnostic laboratories for seven important bee viruses and to determine these seven viral virus diseases in Aegean Region using this test.

**Material and Method:** In the first stage of this study, the multiplex RT-PCR method was modified and optimised to develop a fast diagnosis method for IAPV, DWV, SBV, ABPV, BQCV, KBV and CBPV. In second stage, the samples collected from apiaries in the seven provinces of the Aegean Region by choosing the Multi-Step Sampling Method were tested by using multiplex RT-PCR and sequencing and phylogenetic tree analysis of the positive samples were performed.

**Results:** Virus copy numbers were detected to be 2500 copy/  $\mu$ l when  $\log_{10}$  serial dilutions were performed for the optimized mRT- PCR method. The prevalence rates of viral agents were found to be DWV (25.2%), BQCV (20.7%), ABPV (3.6%), SBV (2.7%) and CBPV (1.8%) in the Aegean Region. KBV and IAPV were not detected. Some genetic similarities and differences were observed at the end of phylogenetic analysis.

**Conclusion:** It is concluded that multiplex RT-PCR test can be used in routine analysis because this method has a high level of sensitivity and achieves economic gain and time due to detecting seven agents simultaneously. The prevalence of 7 viral agents was determined with this test method in Aegean Region and phylogenetic analysis was performed to determine the origin and relatedness of obtained isolates.

**Key Words:** mRT-PCR; Honey bee viruses; Prevalence; Phylogeny.

A.Anıl ÇAĞIRGAN (Ph. D. Thesis)

Ondokuz Mayıs University - Samsun, November-2018

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ABPV</b>	:	Acute Bee Paralysis Virus / Akut Arı Felci Virusu
<b>AGID</b>	:	Agar-Gel Immunodiffusion
<b>AIV</b>	:	Apis Iridescent Virus
<b>AKS</b>	:	Arıcılık Kayıt Sistemi
<b>ALPV</b>	:	Aphid Lethal Paralysis Virus
<b>AmFV</b>	:	<i>Apis mellifera</i> Filamentous Virus
<b>AMP</b>	:	Antimikrobiyal Peptit
<b>BLAST</b>	:	Basis Local Alignment Search Tool
<b>BOH</b>	:	Rate of Homogeneity
<b>BQCV</b>	:	Black Queen Cell Virus / Siyah Kraliçe Hücre Virusu
<b>BrBV</b>	:	Brevicoryne Brassicae Picorna-Like Virus
<b>BSL-2</b>	:	Biosafety Level-2
<b>BSU</b>	:	Basic Sampling Unit
<b>CBPV</b>	:	Chronic Bee Paralysis Virus /Kronik Arı Felci Virusu
<b>CrPV</b>	:	Cricket Paralysis Virus
<b>CWV</b>	:	Cloudy Wing Virus
<b>DCV</b>	:	Drosophila C Virus
<b>DNA</b>	:	Deoksiribonukleic Acid
<b>DsRNA</b>	:	Eksojen Çift Zincirli RNA
<b>DWV</b>	:	Deformed Wing Virus / Deforme Kanat Virusu
<b>EBV</b>	:	Mısır Arı Virusu
<b>ELISA</b>	:	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
<b>EM</b>	:	Elektron Mikroskobu
<b>EMCV</b>	:	Encephalomyocarditis Virus
<b>EMEM</b>	:	Eagle Minimum Essential Medium
<b>EoPV</b>	:	Ectropis Obliqua Picorna-Like Virus
<b>HAV</b>	:	Hepatitis A Virus
<b>HiPV</b>	:	Himetobi P Virus
<b>HoCV</b>	:	Homalodisca Coagulata Virus

<b>IFV</b>	:	Infectious Flacheri Virus
<b>IGR</b>	:	İntergenik Bölge
<b>IAPV</b>	:	Israel Acute Bee Paralysis Virus /İsrail Akut Arı Felci Virusu
<b>IPTG</b>	:	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactoside
<b>IRES</b>	:	İnternal Ribozomal Giriş Bölgesi
<b>KBV</b>	:	Kashmir Bee Virus / Kaşmir Arı Virusu
<b>KV</b>	:	Kagugo Virus
<b>LB</b>	:	Luria Bertani
<b>LD</b>	:	Letal Doz
<b>LSV</b>	:	Lake Sinai Virus
<b>MCS</b>	:	Çoklu Klonlama Bölgesi
<b>ML</b>	:	Maximum Likelihood
<b>mRNA</b>	:	Messenger Ribonucleic Acid
<b>mRT-PCR</b>	:	Multipleks Reverse Transcriptase Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>NCBI</b>	:	National Centre of Biotechnology Information
<b>NJ</b>	:	Neighbour-Joining
<b>nt</b>	:	Nükleotid
<b>ORF</b>	:	Open Reading Frame
<b>PAMPs</b>	:	Pathogen-Associated Molecular Patterns
<b>PCR</b>	:	Polimerase Chain Reaction / Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PISV</b>	:	Plautia Stali Intestine Virus
<b>PnPV</b>	:	Perina Nuda Picorna-Like Virus
<b>PRRs</b>	:	Pattern Recognition Receptors
<b>PV</b>	:	Polio Virus
<b>RhPV</b>	:	Rhopalosiphum Padi Virus
<b>RNA</b>	:	Ribonucleic Acid
<b>RNAi</b>	:	RNA Interferans
<b>RT-PCR</b>	:	Reverse Transcriptase Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>SBV</b>	:	Sacbrood Virus / Sacbrood Virusu
<b>SInV-1</b>	:	Solenopsis Invicta Virus



<b>SOB</b>	:	Super Optimal Broth
<b>SPV</b>	:	Slow Paralysis Virus
<b>TaSV</b>	:	Taura Syndrome Virus
<b>TriV</b>	:	Triatoma Virus
<b>TÜİK</b>	:	Türkiye İstatistik Kurumu
<b>UTR</b>	:	Untranslated Region
<b>VaDV-1</b>	:	Varroa Destructor Virus-1
<b>VcV</b>	:	Venturia canescens virus
<b>WB</b>	:	Western Blotting
<b>%</b>	:	Yüzde
<b>µm</b>	:	Mikrometre
<b>bp</b>	:	Base Pair
<b>C</b>	:	Santigrat
<b>gr</b>	:	Gram
<b>kb</b>	:	Kilo Base Pair
<b>ml</b>	:	Mililitre
<b>Mm</b>	:	Milimolar
<b>ng</b>	:	Nanogram
<b>nm</b>	:	Nanometre
<b>°</b>	:	Derece
<b>rpm</b>	:	Rounds Per Minute
<b>V</b>	:	Volt

## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	i
<b>ÖZET</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	iv
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Bal Arısı .....	3
2.1.1. Bal Arısı Kolonisi.....	3
2.1.2. Bal Arılarının Biyolojik Gelişme Evreleri .....	4
2.2. Dünya’ da ve Türkiye’ de Arıcılığın Önemi .....	4
2.3. Bal Arısı Virusları .....	5
2.3.1. Tarihçe .....	6
2.3.2. Bal Arısı Virusunun Genel Özellikleri .....	7
2.3.3. İsrail Akut Arı Felci Virusu.....	7
2.3.4. Deforme Kanat Virusu .....	8
2.3.5. Sacbrood Virus .....	11
2.3.6. Akut Arı Felci Virusu .....	13
2.3.7. Siyah Kraliçe Hücre Virusu.....	15
2.3.8. Kaşmir Arı Virusu .....	16
2.3.9. Kronik Arı Felci Virusu.....	17
2.4. Genomik Yapı ve Organizasyon .....	20
2.5. Bulaşma.....	25
2.5.1. Bal Arısı Virus Enfeksiyonları .....	26
2.6. Patogenez .....	29
2.7. Bağışıklık .....	30
2.8. Teşhis Metotları .....	32
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	34
3.1. Materyal .....	34
3.1.1. Etik Kurulu Onayı .....	34
3.1.2. Pozitif Kontrollerin Temini .....	34
3.1.3. Çalışmada Kullanılacak Örneklerin Temini .....	34
3.1.4. Çalışmada Kullanılacak Primer Çiftleri .....	36
3.1.5. Kullanılan Malzeme ve Kimyasallar .....	37

3.2. Metot .....	40
3.2.1. Örnekleme Büyüklüğünün Tespit Edilmesi .....	40
3.2.2. İlgili Gen Bölgelerinin RT-PCR ile Çoğaltılması .....	41
3.2.3. İlgili Gen Bölgelerinin Klonlanması .....	42
3.2.4. Simpleks RT-PCR (sRT-PCR) tespit limitlerinin belirlenmesi.....	44
3.2.5. Multipleks RT-PCR Optimizasyonu .....	45
3.2.6. Ergin Arı ve Yavrulu Petek Örneklerinin Hazırlanması .....	45
3.2.7. Ergin Arı ve Yavrulu Petek Homojenizatlarının Ekstraksiyonu .....	45
3.2.8. Ergin Arı ve Yavrulu Petek Örneklerinin mRT-PCR ile Çalışılması.....	46
3.2.9. Pozitif Örneklerin Doğrulanması .....	46
3.2.10. Dizi Analizi Yapılan Örneklerin Filogenetik Ağaçlarının Oluşturulması... 46	
<b>4. BULGULAR</b> .....	48
4.1. Simpleks RT-PCR Tespit Limitleri.....	48
4.2. Multipleks RT-PCR Optimizasyonu ve Tespit Limitinin Belirlenmesi.....	51
4.2.1 Multipleks RT-PCR Optimizasyonu .....	51
4.2.2 Tespit Limitinin Belirlenmesi.....	52
4.3. Arı Örneklerinin Multipleks RT-PCR ile Test Edilmesi.....	52
4.4. Filogenetik Analiz .....	56
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	64
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	72
<b>KAYNAKÇA</b> .....	74
<b>EKLER</b> .....	89
Ek-1: Etik Kurul Raporu .....	89
Ek-2: Çalışmada elde edilen DWV nükleotid dizileri.....	90
Ek-3: Çalışmada elde edilen BQCV nükleotid dizileri .....	92
Ek-4: Çalışmada elde edilen ABPV nükleotid dizileri .....	94
Ek-5: Çalışmada elde edilen CBPV nükleotid dizileri.....	96
Ek-6: Çalışmada elde edilen SBV nükleotid dizileri .....	98
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	99

## 1. GİRİŞ

Bal arıları; bal, propolis, polen, arı sütü, kovan ve diğer ürünleri ile birlikte ekonomik öneme sahip olmanın yanı sıra, bitkisel üretimin devam edebilmesi için de gereklidir.

Ülkemizin sahip olduğu farklı iklim koşulları, bitki örtüsü ve coğrafik yapı, arıcılık faaliyetlerinin sürdürülebilir olması bakımından önemli avantajlar içerir. Arıcılık verilerine göre Türkiye’de 7 milyon 486 bin 621 koloni bulunmakta ve yıllık 107 bin ton bal üretimi gerçekleştirilmektedir. Türkiye, dünyada koloni sayısı bakımından üçüncü, bal üretimi açısından ise ikinci sırada yer almaktadır (Doğanay ve Girişken, 2017). Ege Bölgesi ise 1 milyon 681 bin 838 koloni ve 12.108 işletme ile ülke kovan ve bal üretimi miktarının ortalama 1/4’ ünü (26 bin ton) karşılaması nedeni ile arı ve arı ürünleri bakımından önemli bir yere sahiptir (TÜİK, 2015).

Bitkisel ürünleri ve kovan ürünlerini alabilmek için tüm hayvanlarda olduğu gibi arılarda da sağlıklı nesillerin yetiştirilmesi esastır. Bununla birlikte ülkemizde koloni başına alınan bal verimi dünya seviyesine göre oldukça düşük düzeydedir (Doğanay ve Girişgin, 2017). Bunun en büyük nedenleri arasında bakım-besleme koşulları, arıcıların eğitimsiz olması, arı ırk farklılıkları ve arı hastalıkları gibi faktörler gösterilebilir.

Bakteriyel, paraziter, fungal ve viral arı hastalıkları, arılar ve kolonilerin devamlılığını tehdit etmektedir. Arılarda yaşam veriminin düşmesi ve koloni kayıpları yaşanmasının en önemli nedenlerinden biri olarak viral etkenler gösterilmektedir. Bal arılarında bugüne kadar tespit edilmiş 24 virus bulunmaktadır (Yeşilbağ, 2017b). Bunlardan en önemlileri *İsrail akut arı felci virusu* (IAPV), *Deforme kanat virusu* (DWV), *Sacbrood virusu* (SBV), *Akut arı felci virusu* (ABPV), *Siyah kraliçe hücre virusu* (BQCV), *Kaşmir arı virusu* (KBV) ve *Kronik arı felci virusu*’ dur.

Bu çalışmada önemli koloni kayıplarına yol açan 7 viral hastalık etkenine karşı multipleks RT-PCR (mRT-PCR) testinin geliştirilmesi ve aynı zamanda Ege Bölgesi’nde viral nedenli arı hastalıklarının epidemiyolojisinin moleküler olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) daha etkili ve sensitiftir. Ayrıca diğer testlere göre spesifitesi daha yüksektir. Simpleks PCR (sPCR) her reaksiyonda tek hedefe yönelik çalıştığı için ekstra maddi yük ve zaman kaybına sebep olmaktadır. Aynı

reaksiyonda birden fazla etkeni tespit edebilen mRT-PCR ise hem maddi hem de zaman olarak önemli avantajlar sağlamaktadır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Bal Arısı

Bal arıları, eşek arıları, diğer arılar ve karıncalar ile birlikte Insecta sınıfında, Hymenoptera takımında ve Apidae familyasında yer alır. Bal arıları Orkide arıları (Euglossini), bambus arıları (Bombini) ve iğnesiz arılar (Meliponinae) ile birbirine çok yakındırlar (Winston, 1987).

Bal arısının vücudu deri ve kitin bir tabaka ile kaplı olup polen toplamasını sağlamak amacıyla tüylerle kaplanmıştır. Vücut baş, göğüs ve karın olmak üzere üç bölümden oluşur. Baş, yutak üstü salgı bezlerini bulundurur. Bu salgı bezleri arı sütü salgımlarken aynı zamanda balın olgunlaşmasını sağlayan invertaz enzimini salgılar. Göğüs, üç çift bacak ve iki çift kanattan oluşur. Bacaklar polen taşıma ve dengeyi sağlamada görev alır (Doğaroğlu, 2008). Apidae ailesinin birçok üyesi, arka bacaklarında polen toplama sepetleri bulunan işçilerdir. Nektar toplama ve saklama kapasitelerine göre karakterize edilirler (Winston, 1987). Kanatlar ise denge merkezi oluşturmasının yanı sıra kovanını havalandırılmasını ve balın suyunun uçurulmasını sağlar. Karın erkek arıda yedi, dişi arılarda ise altı halkadan oluşmaktadır. Halkalar arasından balmumu salgılanmaktadır (Doğaroğlu, 2008).

Günümüzde; *Apis adeniformis*, *Apis cerana*, *Apis dorsata*, *Apis florea*, *Apis koshevnikovi*, *Apis laboriosa*, *Apis mellifera*, *Apis nigrocincta* ve *Apis nuluensis* olmak üzere dokuz bal arısı türü bulunmaktadır. Avrupa bal arısı olarak bilinen *Apis mellifera* Avrupa başta olmak üzere Asya, Orta Doğu ve Afrika anakaraları boyunca dağılım göstermektedir. Morfolojik ve genetik verilere göre Avrupa'da on farklı alt türünün bulunduğu bildirilmiştir (Ruttner, 1988; Whitfield, 2006). Ülkemizde bulunan alt türleri *A. mellifera anotolia* (Anadolu arısı), *A. mellifera meda* (İran arısı), *A. mellifera caucasica* (Kafkas arısı), *A. mellifera cypria* (Kıbrıs arısı) ve *A. mellifera syriaca* (Suriye arısı) olarak bilinmektedir. Ticari olarak Avrupa'da en fazla kullanılan ırk *Apis mellifera*, Asya'da ise *Apis cerana*'dır (Doğaroğlu, 2008).

#### 2.1.1. Bal Arısı Kolonisi

Topluluk halinde yaşayan sosyal bir böcek olan bal arıları, ağaç kovuklarından kovanlara kadar birçok yerde koloniler halinde yaşayabilmektedir. Yaz aylarında bir koloniyi yaklaşık olarak 50.000 ile 60.000 arasında işçi arı, birkaç yüz erkek arı ve bir

ana arı oluşturur (Tautz, 2008). Ana arı ve işçi arılar dişidir, ancak sadece ana arı yumurtlama yeteneğine sahiptir ve bu şekilde koloninin devamlılığını sağlar. Ana arı yumurtlama dışında diğer bir görevi salgıladığı feromonlarla diğer arıların davranışlarını yönetmek ve yönlendirmektir. Ömürleri 3-5 yıl arasında değişir. İşçi arılar ise rudimenter reproduktif sisteme sahip oldukları için yumurtlayamazlar. Fakat bir koloninin en çalışkan üyeleridir. Koloni içinde beslenme, bakım, temizlik, savunma, petek örme, yavru yetiştirme gibi birçok görevi bulunur. Aktivitenin fazla olduğu ilkbahar ve sonbahar aylarında yaklaşık olarak 4-9 hafta yaşarlar. Aktivitenin azaldığı diğer aylarda ise 5-9 ay arası yaşayabilmektedirler. Erkek arılar üreme sezonunda kolonide bulunurlar (Doğanay ve Girişgen, 2017).

### **2.1.2. Bal Arılarının Biyolojik Gelişme Evreleri**

Arılar yumurta ile çoğalan canlılardır. Yumurta, yavrulu petek, pupa ve ergin dönem olmak üzere 4 farklı gelişim dönemleri görülür. Bir arı yaşamına kraliçe arı tarafından üretilen uzun-oval bir yumurta olarak başlar. Erkek arı tarafından yumurtanın döllenmesi sonucu diploid işçi arı, döllenmemesi ile de haploid erkek arı meydana gelir. Yumurta dönemi 3 gün sürer. Yumurta gelişimini larva olarak tamamlar. Larva işçi arılar tarafından arı sütü ile beslenirler ve bu süre yaklaşık olarak 4-5 gün sürer. Bu evrenin sonunda işçi arılar tarafından petek gözü kapatılır. Pupa evresinde iç organlar ve kütikula tabakası gelişir. Bu süre yaklaşık olarak 12 gün sürer ve ergin arı oluşur. Yumurtadan ergin arı çıkışına kadar toplam gelişme süresi ana arıda 16 gün, işçi arıda 21 gün ve erkek arıda 24 gündür (Doğanay ve Girişgen, 2017).

### **2.2. Dünya' da ve Türkiye' de Arıcılığın Önemi**

Arılar en küçük evcil hayvanlardır. Yüzyıllardır insanoğlu tarafından bal elde etmek için çamur, kütük ve tahta kutularda yetiştirilmektedir. Günümüzde kullanılan kovanların kullanımına geçilince tüm dünyada baldan balmumuna kadar geniş bir ürün yelpazesi oluşmuştur. Arıcılık ürünleri gıda sektörü, kozmetik sektörü, sağlık sektörü ve kimya sektörü gibi birçok sahada kullanım alanı bulmaktadır (Doğanay ve Girişgen, 2017). Bunlara ek olarak arılar biyoçeşitlilik ve bitki türlerinin polinasyonu için gereklidir. Böceklere bağlı polinasyonun gıda sektörüne katkılarının 153 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir (Gallai ve ark., 2009). Meyve ve sebze üretiminde, 115 önde gelen küresel gıda ürününün 52' si doğrudan bal arılarına bağlıdır. Buna ek olarak üretilen

meyvelerin kalitesi, ürün miktarı, boyutu bal arılarının kullanılmasıyla artmaktadır (Klein ve ark., 2007).

Dünyada toplam 81 milyon arı kolonisi bulunmaktadır. Koloni sayısı bakımından önde gelen ülkeler Hindistan, Çin, Türkiye, Etiyopya ve Rusya, bal üretiminde önde gelen ülkeler ise Çin, Türkiye, Arjantin, Rusya ve ABD' dir (Doğanay ve Girişgen, 2017). Avrupa ülkeleri ve ABD' de yıllar geçtikçe koloni sayısı azalırken Asya, Avrupa ve Güney Amerika' da artmaktadır (Vanengelsdorp ve Meixner, 2010). Avrupa kıtasında toplam 13 milyon koloni bulunmakta ve iki yüz yirmi bin ton bal elde edilmektedir (Chauzat ve ark., 2013). ABD' de koloni sayısının 2009 verilerine göre 2.3 milyon olduğu düşünülürse, koloni sayısının son elli yılda % 61' den daha fazla azaldığı görülmektedir. Bu azalmanın bakteriyel, viral, paraziter hastalıkların yanısıra tarım ilaçlarının yaygın kullanımı ya da iklim, beslenme, zayıf kraliçe arı, sosyo-ekonomik faktörler ve sebebi bilinmeyen birçok faktör olarak gösterilebilir (Van Engelsdorp ve Meixner, 2010).

Ülkemizde cumhuriyetin ilk yıllarından itibaren bal ve arı ürünlerini arttırmak amacıyla mevcut sorunların tespiti ve giderilmesi arıcılık faaliyetlerinin artmasına sebep olmuştur. I. Ziraat kongresi ile modern arıcılığa tam anlamıyla geçilmiş ve Tarım Bakanlığı bütçesinin her yıl düzenli olarak arttırılması ile arıcılığın ülke ekonomisine önemli katkısı olmuştur (Yurtoğlu, 2017). TÜİK (2015) verilerine göre ülkemizde 7 milyon 486 bin 621 koloni bulunmakta ve 107 bin ton bal üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu rakamlarla dünyada koloni sayısından üçüncü, bal üretimi açısından ise ikinci sırada gelmektedir. Muğla, Ordu, Adana, Aydın, Antalya, Mersin ve İzmir koloni sayısı ile bal üretiminin en yoğun olduğu illerimizdir.

### **2.3. Bal Arısı Virusları**

Doğada bulunan hemen hemen her canlının virusla enfekte olması, virus çeşitliliğini arttırmaktadır. Bu çeşitlilik viral genomun şekli, genom organizasyonu, farklı konakçı ve dokuları enfekte edebilmesi ile ilgilidir. Birçoğu, sadece elektron mikroskobu ile görülebilecek kadar küçüktür ve persiste enfeksiyonlar şeklinde görülmektedir (Hails ve ark., 2008; de Miranda, 2012).

Arı kolonileri, bir veya birden daha fazla bal arısı virusu ile enfekte olmaları durumunda da sağlıklı görünmeye devam edebilmektedirler. Bu tür enfeksiyonlar nesilden nesile koloniye zarar vermeden popülasyonda varlığını sürdürebilmekte; ancak

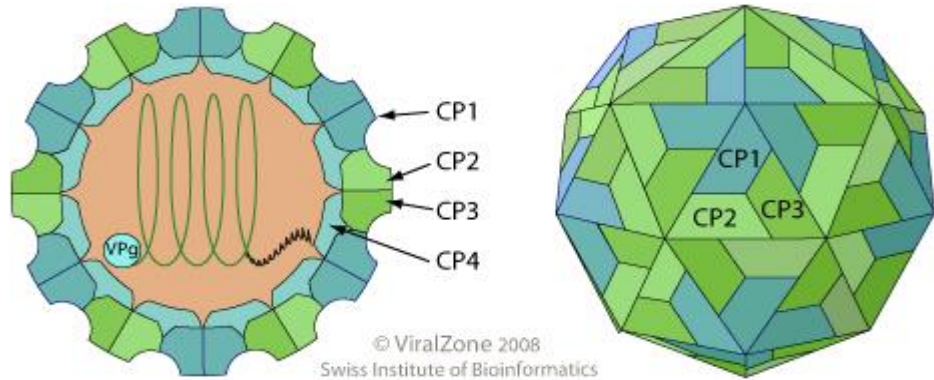


bazı büyüme evrelerinde veya organlarda tekrar stimüle olarak akut veya ölümcül enfeksiyonlara sebep olabilmektedirler (Ribi re ve ark., 2008).

Bazı arı virusları *Nosema* spp. ve *Varroa destructor* gibi parazitler ile ilişkilendirilmektedir. Bunların yanı sıra arı virusları kovan b ceklerinde (*Aethina tumida*; Eyer ve ark., 2009), akarlarda (*Tropilaelaps* spp.; Dainat ve ark., 2008), karıncalarda (Sebastien ve ark., 2015), yabani arılar ve eşek arılarında da tespit edilmiştir (Riebiere ve ark., 2012).

### 2.3.1. Tarihçe

Yaklaşık olarak 24 arı virusunun varlığı bilinmektedir (Yeşilbağ, 2017b). *Filamentous Virus* (AmFV) ve *Apis Iridescent Virus* (AIV) haricinde tamamı izometrik şekle sahip tek iplik ekli RNA (Ribonukleic Acid) genomu taşıyan viruslardır (Şekil-1). Boyutlarındaki farklılıklar dışında birçok arı virusu yapı ve şekil yönünden birbirinden ayırt edilemezler. Sadece CBPV izometrik olmayan bir şekle sahip olduğu için diğer arı viruslarından farklıdır. Bununla birlikte, viruslar genetik ve protein kompozisyonu bakımından birbirlerinden oldukça farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar ayırıcı tanıların temelini oluşturan özelliklerdir (Bailey ve Ball, 1991; de Miranda, 2008; Ribi re ve ark., 2008).



Şekil 1. Picornavirus kapsid yapısı ve organizasyon şeması. Dicistroviruslar ve Iflaviruslar benzer konformasyonlar içerirler (Viral Zone, 2018)

Arı virusları dünya çapında oldukça yaygındırlar. Birçok arı virusu bireysel veya koloni seviyesinde ölümcül zararlar verebilmesine rağmen koloni içerisinde ve koloniler arasında d şuk titrede ve zararsız bir şekilde yayılmaya devam edebilmektedir. Diğer arı patojenlerine göre arı viruslarının daha zor tanımlanmaları, hastalık sürecinin tam olarak

bilinmemesi, teşhis ve hastalık sürecinin yönetiminde güçlükler neden olur. Moleküler teşhis yöntemlerinin duyarlılıklarının artması ve etkenlerin tespit edilmesinde önemli gelişmeler olmasına rağmen, virus tespiti halen gelişmekte olan önemli bir süreç olduğu için hastalık geçmişinin, epidemiyolojisinin ve patolojisinin geliştirilmesi adına kapsamlı niceliksel kriterlere ihtiyaç duyulmaktadır (Ribi ere ve ark., 2008).

### **2.3.2. Bal Arısı Virusunun Genel  zellikleri**

Viruslar mikroorganizmalar arasında en basit yapıya sahiptir; ancak yapısal özellikleri, çoğalma şekilleri, hastalık oluşturma yöntemleri ise karmaşık bir yapıya sahiptirler. Yapısı tek veya çift iplik ekli DNA (Deoksiribonukleic Acid) veya RNA' dan oluşan genetik bir materyal ve onu çevreleyen kapsid proteinlerinden oluşmaktadırlar. Bazı virusların yapısında zarf bulunur. Zarflar yüzey antijenleri ve proteinleri taşımakla görevlidir (Yeşilba , 2017a).

Bal arısı virus kapsidinin dış yüzeyi tekrarlanan 60 protomerden ve VP1, VP2 ve VP3 olan  c alt protein biriminden oluşur. Bu alt birimlere ilave olarak bazı viruslarda (BQCV ve ABPV) VP4 proteini bulunur (Govan ve ark., 2000; Leat ve ark., 2000). VP4 viral partikülün yüzeyinde bulunmaz, VP1'in altında i  yüzeyde bulunur. Kapsid proteini virusun RNAaz aktivitesi ve düzensiz  evre koşullarından korunmasında, konakçı spesifitesi ve doku tropizminden sorumludur (Chen ve Siede, 2007).

Yapılan elektron mikroskop incelemeleri bal arısı virionlarının 17-30 nm çapında küre şeklinde hafif ovoid olduklarını ortaya koymaktadır (Bailey, 1976; Ball ve Bailey, 1991).

Bal arısı ve kolonilerinde enfeksiyon oluşturan önemli viruslar arasında *İsrail akut arı felci virusu* (IAPV), *Deforme kanat virusu* (DWV), *Sacbrood virusu* (SBV), *Akut arı felci virusu* (ABPV), *Siyah kraliçe hücre virusu* (BQCV), *Kaşmir arı virusu* (KBV) ve *Kronik arı felci virusu* (CBPV)  nemli bir yere sahiptirler (Chen ve Siede, 2007; Ribi ere ve ark., 2008; Yeşilba , 2017b).

### **2.3.3. İsrail Akut Arı Felci Virusu**

IAPV ilk olarak 2004 yılında yüksek mortalite ve ani koloni kayıplarının yaşandığı İsrail' de tespit edildi ve etkenin *Dicistroviridae* ailesinde yer aldığı belirlendi (Maori ve ark., 2007). Virus KBV ve ABPV ile genetik olarak yakındır; ayrıca bulaşma yolları, ilk konakçıdaki yaşam döngüleri, yüksek titrede ölümcül olmaları gibi

özellikleride benzerlik göstermektedir (de Miranda ve ark., 2010). IAPV dünyada farklı bölgeler ve coğrafik koşullarda bulunmaktadır (Chen ve Evans; 2007; Blanchard ve ark., 2008; Yan ve ark., 2009; Formato ve ark., 2010; Kukielka ve Sánchez-Vizcaíno, 2010; Francis ve Kryger, 2012; Özkırım ve Schiesser, 2013).

Amerika Birleşik Devletleri genelinde yaşanan ani koloni kayıpları ile IAPV arasında önemli bir bağlantı olduğu bildirilmiştir (Cox-Foster ve ark., 2007). IAPV *Varroa destructor*'da replikasyon yeteneğine sahiptir ve etkene vektörlük yapmaktadır (Di Prisco ve ark., 2011; Chen ve ark., 2014). Arılardaki IAPV miktarı Varroa yoğunluğu ve temas süresi ile pozitif korrelasyon göstermektedir. Ayrıca parazit-virus birlikteliği konakçı bağışıklığını zayıflatmakta ve virusun replikasyonu artmaktadır (Di Prisco ve ark., 2011).

Yumurta, larva, pupa, işçi arı, erkek arı ve kraliçe arılarda IAPV görülmektedir, ayrıca etken arı sütü, bal, polen, dışkı ve spermada da tespit edilebilir. Yavru arılarda ergin arılara göre görülme sıklığı daha fazladır. Deneysel olarak yapılan çalışmada IAPV enfeksiyonu seviyesi, zayıf ve güçlü kolonilere göre farklılık göstermektedir. Güçlü kolonilerde istatistiksel olarak mevsimsel farklılıklar görülmemiş, zayıf kolonilerde ise kayıpların ilkbahardan başlayarak yaz ve sonbahara kadar artarak devam ettiği, kışın ise kolonin tamamen kaybolduğu gözlemlenmiştir (Chen ve ark., 2014).

Yeni tanımlanan bir arı virusu olduğu için enfeksiyon mekanizması, bulaşma yolları ile ilgili çalışmalar yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

#### **2.3.4. Deforme Kanat Virusü**

Arılarda kanat deformasyonları uzun zamandan beri viruslar ile ilişkilendirilmektedir. Arılarda oluşan kanat deformasyonları ile ilk defa 1980' li yılların başında karşılaşılmıştır (Bailey ve Ball, 1991). Kanat deformasyonu ve vücut boyunun kısa olmasına sebep olarak daha Varroa enfestasyonları düşünülmüş (Akratanakul ve Burgett, 1975; Koch ve Ritter, 1991), ancak parazitin az veya hiç olmadığı kolonilerde benzer semptomlar görülmesine karşın parazitin olduğu bazı kolonilerde semptomların görülmediği belirlenmiştir (Marcangeli ve ark., 1992; Ball, 1993). Yapılan araştırmalar sonucunda etken olarak yüksek titreli ikozehedral simetriye sahip pozitif polariteli bir RNA virus olan DWV tespit edilmiş (Bailey ve Ball, 1991; Ball, 1993) ve kanatlarda şekillenen deformasyon ve gelişme geriliğinden dolayı bu ismi almıştır (Ball, 1993). DWV, bal arılarında kanat deformasyonlarının yanı sıra gövde küçülmesine ve renk

bozukluklarına neden olur (Chen, 2004; Chen, 2007). Ayrıca etken sadece bal arılarını değil aynı zamanda *Vespa crabro* türü yaban arılarını da enfekte ederek kanatlarında deformasyonlara neden olmaktadır (Forzan ve ark., 2017).

DWV *Iflaviridae* ailesinde, zarfsız, linear, yaklaşık olarak 9-11 kb uzunluğunda bir virustur (Valles ve ark., 2017). Serolojik özelliklerinin farklı olması nedeniyle ilk olarak *Mısır arı virusu* (EBV)' nun Japon suşu olarak düşünülmüş (Ball, 1989), daha sonra antiserumunun elde edilmesi ile birlikte farklı bir virus olduğu belirlenmiştir (Ribiere, 2008). *Varroa destructor virus-1* (VaDV-1) ve *Kagugo virus* (KV) ile aynı aileden olup genetik olarak birbirlerine çok yakındır (de Miranda ve Genersch, 2010).

DWV bal arılarında en fazla tespit edilen viral etkenlerden birisidir (Chen ve ark., 2004; Tentcheva ve ark., 2004; Yue ve Genersch, 2005; Berenyi ve ark., 2006; Gülmez ve ark., 2008; Rodriguez ve ark., 2014; Shumkova ve ark., 2018). Tentcheva ve ark. (2004b) yaptıkları araştırmalar sonucunda kayıpları yaşanan Fransız arı kolonilerinde % 97 oranında DWV tespit etmişlerdir. Avusturya' da yapılan başka bir araştırmada, hastalık ve ölüm olduğu bilinen kolonilerde % 91 oranında DWV bildirilmiştir (Berenyi ve ark., 2006). Chen ve ark. (2004a) tafından klinik semptom gösteren arıların % 100' ünde, klinik semptom göstermeyen arıların % 75' inde etken tespit edilmiştir. Ayrıca yavrulu peteklerden alınan örneklerde larva aşamasında % 80, pupa aşamasında % 90 ve toplanan *Varroa* örneklerinde % 92 oranında DWV tespit edilmiştir.

Viral replikasyonun aktivasyonu ve arılardaki virus enfeksiyonunun oluşumundan sonra virus partikülünün kazanımı ve bulaşması, arı popülasyonu içindeki farklı yaşam aşamaları ve farklı bireyler arasındaki parazitlerin varlığı ile ilişkilendirilmektedir (Ribiere, 2008). Bu yüzden DWV'nin ilk tespitinden sonra sürekli olarak *V. destructor* ile ilişkilendirilmiştir (Ball, 1989; Bowen-Walker ve ark., 1999; Nordström ve ark., 1999). *Varroa* ile DWV enfeksiyonu arasındaki yakın ilişki, enfeste olmayan hücrelere göre enfeste hücrelerde DWV' nin belirgin bir şekilde fazla tespit edilmesi ile doğrulanmıştır (Bowen-Walker ve ark., 1999). Tentcheva ve ark. (2006) ise erkek arıların prepupa evresinde hücrelerde bulunan parazit miktarı ile DWV varlığı arasında pozitif korrelasyon olduğunu belirtmişlerdir. *Varroa* ile mücadele edilen ve edilmeyen kolonilerin karşılaştırıldığı bir çalışmada, 2 hafta aralıklarla yaz başından ilkbahar sonuna kadar yapılan akarazit tedavisinin sonucu olarak tedavi edilmeyen

kolonide virus miktarının 1000 kat daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır (Locke ve ark., 2017).

*V. destructor* beslenme şekli ile viral replikasyonu aktive edebilmektedir. Parazitin tükürük salgısında bulunan bazı biyokimyasal komponentleri tam olarak karakterize edilmese de, ihtiva ettiği proteinler arının humoral ve hücrel immun sistemini baskılayabilmekte ve Varroa varlığı immunsüpresif bir etkiye sebep olabilmektedir (Gregory ve ark., 2005). Tükürük salgısının immunsüpresif etkisinin latent enfeksiyon mekanizmasında da etkili olabileceği düşünölmektedir (Ribiere, 2008). Nosema varlığının Varroa' nın aksine DWV ile negatif korrelasyon oluşturduğu, konakçı bağırsak hücrelerine tutunmak için rekabet halinde oldukları belirtilmiştir (Costa ve ark., 2011).

DWV moleküler olarak yumurta dahil olmak üzere arıların gelişim evrelerinin tamamında tespit edilebilir (Chen ve ark., 2004; Chen ve ark., 2005b; Chen ve ark., 2006b). Virus kraliçe arıların bağırsak, spermateka ve ovaryum da dahil olmak üzere tüm organlarında (Chen ve ark., 2005a; Chen ve ark., 2006b), erkek arıların spermlerinde (Yue ve ark., 2006) rastlanılmıştır. DWV' nin arı sütünde de tespit edilmesi virusun horizontal olarak oral yolla bulaşabileceğinin de kanıtıdır (Yue and Genersch, 2005).

Virusun vücutta dağılımına göre, klinik belirti gösteren arılarda baş, toraks ve abdomende güçlü pozitiflik tespit edilirken, klinik belirti göstermeyen arıların toraks ve abdomeninde pozitiflik görülmesine rağmen baş bölgesinde pozitiflik tespit edilmemiştir (Yue and Genersch, 2005).

DWV virus miktarının büyüme evrelerine göre farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir. Virus titresindeki değişkenlik farklı büyüme evrelerinde DWV için oluşan direnci gösterebilmektedir. Buna göre erkek arılarda virusun daha az ve düşük titreli olarak tespit edilmesi DWV' ye karşı daha dirençli olduklarını göstermektedir (Chen 2005a).

Sonuç olarak DWV ile birlikte görölen *V. destructor* enfestasyonu, beslenme yetersizliği ve elverişsiz iklim koşulları; ani koloni kayıplarının, yavrulu peteklerdeki larva ve pupa ölümlerinin, kanatlarda oluşan deformasyonların sebeplerini oluşturmaktadır (Chen 2005a). Ayrıca güçlü kolonilerin zayıf kolonilere oranla DWV' ye karşı daha dirençli oldukları görölmektedir (Di Prisco ve ark., 2011).

### 2.3.5. Sacbrood Virus

Sacbrood bal arılarının enfeksiyöz bir hastalığı olup gelişmekte olan larvalarda kayıplara ve karakteristik semptomlara neden olmaktadır. Hastalıklı larvalar kese benzeri bir görünüm almaktadır (Ball, 1999).

SBV ilk olarak 1913 yılında tespit edilmesine rağmen (White, 1917), karakterizasyonu 1964'de (Bailey ve ark., 1964a), tam genom ve moleküler karakterizasyonu ise 1999 yılında yapılmıştır (Ghosh ve ark., 1999). Virus, *Iflaviridae* ailesinde *Iflavirus* genusu içerisinde, pozitif polariteli, tek iplikçikli 28 nm çapında, zarfsız ve yuvarlak RNA virusudur (Bailey, 1968; King ve ark., 2011).

Enfekte olan larva, pupa dönemine geçemez ve deri altında içinde SBV ile zengin sıvı içeren torbalar meydana gelir. Virus replikasyonu larvada başlar ve daha sonra enfekte larva inci beyaz renkten solgun sarı renge dönüşür. Hastalığın ilerleyen aşamalarında larvanın derisi sert ve içi sıvı dolu kese şeklini almaktadır. Bu görünümünden dolayı hastalık kese/torba anlamına gelen Sacbrood olarak isimlendirilmiştir (Bailey, 1975). Ölü larva, ilerleyen aşamalarda koyu siyah renkte görülmektedir. Bu dönemde sıklıkla Amerikan yavru çürüklüğü ile karıştırılmaktadır, ancak Sacbrood ile enfekte larvalar yavru gözlerinden kolayca ayrılabilirken, Amerikan yavru çürüklüğünün olduğu petek gözlerinde bulunan larvalar uzamaktadır (Şekil-2). Bu durum sahada hastalığı ayırt etmede önemli bir kriterdir (Chen ve Siede, 2007).

SBV hem larva hem ergin arı dönemlerinde görülebilmese rağmen, hastalığa özellikle 2 günlük larvalar daha duyarlıdır (Ball ve Bailey, 1997). Ergin arılar hastalığı taşırlar fakat larvalar kadar etkene duyarlı değildir (Chen ve Siede, 2007).



**Şekil 2.** Amerikan yavru çürüklüğünde yavrulu peteklerin petek hücresinden uzaklaştırılırken iplik şeklinde uzama görülmektedir. Bu uzama Sacbrood enfeksiyonlarında görülmemektedir (<http://beeaware.org.au/archive-pest/american-foulbrood/>)

Varroa enfestasyonlarının bulunduğu kolonilerde etken tespit edildiğinden, bu hastalığa Varroa' nın katkısı olduğu düşünülmektedir. Virusa Varroa' nın salyasında rastlanmıştır (Shen ve ark., 2005a). Deneysel olarak yapılan enfeksiyonlarda SBV ile kontamine Varroa' nın sağlıklı pupalara etkeni bulaştırdığı bildirilmiştir (Ball, 1989). Tentcheva ve ark. (2004b) *V. destructor* tespit edilen kolonilerin % 14' ünde SBV' yi tespit etmişlerdir. Shen ve ark. (2005b) SBV tespit edilen kolonide karşılaştırmalı yapmış oldukları çalışmada, Varroa bulunmayan hücreler ile Varroa enfeste olan hücrelerdeki virus miktarlarının farklı olmadığını tespit etmişlerdir. Ayrıca virusun Varroa' da replike olduğuna ilişkin bir veri olmaması, parazitin virusu enfekte arılardan edinmiş olabileceği ihtimalini oluşturmaktadır (Ribiere, 2008).

Hastalığın varlığı mevsimsel olarak değişiklik göstermektedir. İlkbahar ve yaz mevsimlerinde daha sık görülürken, kışın daha az rastlanılmaktadır (Chen ve Siede, 2007). Hastalık yaz aylarında pupalara oranla ergin arılarda daha fazla görülmektedir. Ergin arıların % 68' inde, pupaların % 18' inde etken tespit edilmiştir (Tentcheva ve ark., 2004b).

SBV enfeksiyonu yıldan yıla persiste olarak kolonide kalabilmektedir. Genç arılar, ölü larvaları koloniden atma yani temizleme esnasında etkeni alırlar. Virus hipofarengeal bezlerde birikmeye başlar (Bailey, 1969a) ve ergin işçi arı olduklarında larvaları besleme sırasında glandular sekresyonla virusu bulaştırır. Arılar glandular sekresyonları polen toplarken kullanmaktadır. Polen yüksek mikarda virus ihtiva

ettiğinde taze polenle beslenen kolonide bulunan larva ve genç arılar virus ile kolaylıkla enfekte olabilmektedir. Ergin arılardan larvalara bal, arı sütü ve polen gibi kontamine gıdalar aracılığıyla SBV' nin horizontal olarak bulaşması moleküler teşhis yöntemleri kullanılarak doğrulanmıştır (Shen ve ark., 2005a). SBV yumurta, larva, pupa ve ergin dönemleri olmak üzere arıların tüm gelişim evrelerinde tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2005a; Shen ve ark., 2005a; Chen ve ark., 2006b). Chen ve ark. (2006b) 10 kraliçe arının 6' sında ve pozitif bulunan 6 kraliçe arının yumurtalarında SBV tespit etmişlerdir. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında etkenin transovarial olarak bulaştığı fakat birincil bulaşma yolunun beslenme yolu olduğu düşünülmektedir (Ribiere, 2008).

Arı işletmelerinde yaygın olarak görülen bu hastalık; Avrupa ve dünyanın bir çok bölgesinde görülmektedir (Grabensteiner ve ark., 2001; Tentcheva ve ark., 2004; Berenyi ve ark., 2006; Antunez ve ark., 2006; Nielsen ve ark., 2008; Freiberg ve ark., 2012; Yang ve ark., 2013).

### **2.3.6. Akut Arı Felci Virus**

ABPV laboratuvar çalışmaları sırasında tesadüfi olarak bulunmuş fakat doğada arıların hastalığı veya ölümüyle doğrudan ilişkilendirilememiştir. Beslenme, püskürtme ve enjeksiyon yoluyla yapılan deneysel enfeksiyonlar sonucu etkenin 2-4 gün arasında titreme, kanatlarda ve vücutta felç, 1-2 gün içerisinde de ölümlere yol açtığı bildirilmiştir. CBPV ile benzer semptomlar göstermesine karşın daha erken ölümlerin görülmesi sebebiyle bu ismi almıştır (Bailey, 1963).

Virus, *Dicistroviridae* ailesinde *Aparavirus* genusu içerisinde zarfsız, linear, pozitif polariteli, 8-10 kb uzunluğunda, 30 nm boyutunda, tek iplikçikli RNA virusudur (Valley ve ark., 2017). IAPV ve KBV ile aynı virus ailesi içinde yer alır ve antijenik benzerlik gösterir (de Miranda ve ark., 2010). Yapılan ilk serolojik testler sonucunda klinik semptom göstermeyen arılarda CBPV ve ABPV' nin düşük titrelerde olduğu, semptom görülen arılarda ise sadece CBPV' nin yüksek oranda olduğu, ABPV' nin ise bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu tespit enfeksiyonun doğada arıları etkilemediği görüşüne sebep olmuştur (Bailey, 1963). Moleküler teşhis metodlarının ilerlemesiyle birlikte etkenin doğada da bulunduğu, klinik semptom göstermeden ergin arılarda tespit edilebileceği bildirilmiştir (Genersch ve Aubert, 2010).

ABPV bal arılarının gelişim evreleri olan larva ve ergin arılarda tespit edilmiştir. Ergin arılarda virus miktarına ve parazit enfestasyonuna bağlı olmak üzere genellikle



linik semptom göstermeksizin özellikle yaz aylarında kolonilerde bulunabilmektedir (Bailey ve ark., 1981).

ABPV' nin arıların beyin ve glandular bezlerinde tespit edildiği (Bailey and Milne, 1969), aynı zamanda dışkılarında da virus partikülünün bulunduğu bildirilmiştir (Bailey and Gibbs, 1964). Kolonilerde etkenin en önemli bulaşma kaynağı enfekte arıların glandular sekresyonunda bulunan virus partikülünün larvanın beslenmesi sırasında ağız yolu ile alınması şeklinde olmaktadır. Fazla miktarda virus partikülü vücuda alınmışsa, enfekte olan larva ölmekte ya da klinik semptom göstermeden ergin konakçı olarak yaşamına devam etmektedir (Bailey ve Ball, 1991). Ayrıca, erkek arıların spermelerinde etkene rastlanması vertikal bulaşma olabileceğini göstermektedir (Yue ve ark., 2006).

DeneySEL olarak enfekte edilen arılarda *Varroa destructor*' un virusu alarak sağlıklı pupalara aktardığı gösterilmiştir (Ball, 1983). Enfekte konakçıdan uzaklaştırıldıktan 36 saat sonra etkeni iletebildiği ve sonraki birkaç konakçıyı daha enfekte ettiği ifade edilmiştir. Virusun her bulaşmada azalması ve virusun kazanımı ile bulaşma arasında latent dönem olmaması, *Varroa*' da replikasyonun olmadığını düşündürmektedir. ABPV' nin *Varroa* aracılığıyla etkili şekilde bulaş sağlanmakta fakat replikasyon olduğuna dair kesin bir kanıt bulunmamaktadır. Enfeksiyon, sistemik olarak enfekte olmuş arıların hemolenf yoluyla alınması ve sindirim sisteminde birikmesi sonucu oluşabilmektedir (Wiegers, 1988). Bazı çalışmalarda etkenin *Varroa*' da tespit edilmiş olması, *Varroa*' nın bulaşmadaki önemini ortaya koymaktadır (Bakonyi ve ark., 2002; Tentcheva ve ark., 2004b; Chantawannakul ve ark., 2006). *V. destructor*' un koloni sönmelerindeki rolünü detaylandırmak gerekirse; ABPV bir kolonide klinik semptom gösterdiğinde ve kolonide parazit popülasyonu fazla olduğunda etkenin arılara bulaşması daha hızlı olmaktadır. Bu durum koloninin sönmesine sebep olmaktadır (Martin, 2001).

Son beş yıl içinde ABD' de arı kolonilerinde ABPV sporadik enfeksiyon oluşturmaktadır (Chen ve Siede, 2007). Avusturya' da en çok görülen ikinci viral arı hastalığıdır (Berenyi ve ark., 2006). Avrupa' da ve ABD' de *Varroa* ile birlikte birçok koloninin azalmasına ve sönmesine sebep olmuştur (Bakonyi ve ark., 2002; Antunez ve ark., 2006; Berenyi ve ark., 2006). Fransa' da arılarda ve *V. destructor*' de etkenin insidensi ve mevsimsel oluşumu araştırılmıştır. Bunun için 360 farklı kovandan klinik semptom gösteren ergin arı ve pupa toplanmıştır. ABPV ergin arıların % 58' inde,

pupaların % 23' ünde tespit edilmiştir. Bu kovanlarda tespit edilen Varroaların % 36' sında ABPV tespit edilmiştir. Virus, enfeste kolonilerde daha çok yaz sonu ve sonbaharda tespit edilmiştir ki bu mevsimler Varroa varlığının zirve yaptığı mevsimlerdir. Bu da virusun Varroa ile taşındığına dair hipoteze katkı sağlamaktadır. Fakat arıların ABPV pozitif olarak bulunduğu kovanlardan alınan Varroa örneklerinin pozitif çıkmaması, etkenin bireyler arası temas ile bulaşmış olabileceğini de düşündürmektedir (Tenchteva ve ark., 2004b).

Sonuç olarak ABPV dünyada yaygın olarak görülmesine karşın sıklıkla klinik belirti göstermezken kolonilerde yaşanan kayıplar genellikle Varroa enfestasyonu ile birlikte ilişkilendirilmektedir (Ribiere, 2008).

### **2.3.7. Siyah Kraliçe Hücre Virus**

BQCV ilk defa ölü kraliçe larva ve pupalarında tespit edilmiştir. Yetiştikleri kapalı petek hücrelerinde çürümüş ve siyah renkli olarak bulunmuşlardır. Hücrenin siyah renkli olmasından dolayı hastalık bu isim ile adlandırılmıştır (Bailey ve Woods, 1977).

Etken, *Dicistroviridae* ailesinde *Triatovirus* cinsi içerisinde yer alan zarfsız, linear, pozitif polariteli, 8-10 kb uzunluğunda, 30 nm boyutunda, tek iplikçikli RNA virusudur (Spurny ve ark., 2016).

BQCV daha çok petek hücreleri kapalı durumda kraliçe larva ve pupalarını etkiler. Baharda ve yazın ilk haftalarında kraliçe yetiştiriciliği yapılan kolonilerde virus enfeksiyonları yüksek insidens göstermektedir (Ribiere, 2008). Bu hastalığın erken dönem semptomları SBV ile benzerdir. Etken larva döneminde kolayca çoğalabilir, pupa evresine geçtiğinde enfekte pupa siyah renge döner ve hızlı bir şekilde ölüm görülür. Kraliçe hücreleri siyah renkli olur ki bu da hastalığı karakterize eden görüntüyü oluşturmaktadır. İşçi arılar BQCV ile enfekte olabilir fakat klinik bir bulgu gözlenmez. Virus partikülü işçi arılar tarafından ağız yoluyla alındığında replikasyon şekillenmez (Chen ve Siede, 2007).

Moleküler olarak yapılan çalışmalarda etkenin vertikal olarak bulaştığı tespit edilmiştir. 10 kraliçe arı ve bunların yumurtalarından oluşturulan havuzlarda (her havuz 50 yumurta) BQCV bulunmuştur. 100 larvanın ve 100 ergin arının sırasıyla % 25 ve % 4' ünde etken tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2006b). BQCV kraliçe arıların sindirim sisteminde ve ovaryumlarında belirlenmiş olup baş, hemolenf ve spermetekalarında bulunamamıştır (Ribiere, 2008).

Hastalık salgınları sıklıkla *Noesama apis* ile ilişkilendirilmektedir. Kolonilerde Nosema' nin varlığı ilkbahar ve yaz aylarında artarken, BQCV' nin varlığında da artış görülmektedir (Bailey, 1981). *N.apis* ile enfeste kolonilerde BQCV' nin ergin arılarda hızlı bir şekilde çoğaldığı görülmüştür (Bailey, 1982a).

*N. apis* ergin arıların sindirim sistemini enfekte ettiğinde BQCV' nin bu dokulara olan duyarlılığı artmaktadır. İngiltere ve Galler' de *N. apis* ile enfeste kolonilerde BQCV tespit edilmiştir (Bailey ve ark., 1981). Başka bir saha araştırmasında, Avusturya'da BQCV bulunan kolonilerin % 78' inde *N. apis* pozitif, *N. apis* ile enfeste olan bu kolonilerin ise %75' i BQCV pozitif olarak tespit edilmiştir (Berenyi ve ark., 2006).

Varroa' nin diğer arı etkenlerinde olduğu gibi BQCV' nin de bulaşmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Bailey ve ark., 1976). Tayland' da arı kolonilerden toplanan Varroalarda BQCV bulunması bu durumu desteklemektedir (Chantawannakul ve ark., 2006).

### **2.3.8. Kaşmir Arı Virusu**

Asya orjinli olan KBV, ilk defa *Apis cerena* cinsi bal arılarından izole edilmiştir ve *Apis cerena* kullanılarak hazırlanan inokulumlar ile *A. mellifera* cinsi bal arılarına enjekte edildiğinde ölümler görülmüştür. Adını Hindistan'ın kuzeybatısında bulunan Kaşmir bölgesinden almıştır (Bailey ve Woods, 1977). Daha sonra etken Avusturalya'da toplanan *A. mellifera* örneklerinde tespit edilmiştir (Bailey ve ark., 1979).

Etken, *Dicistroviridae* ailesinde *Aparavirus* genusu içerisinde zarfsız, linear, pozitif polariteli, 8-10 kb uzunluğunda, 30 nm boyutunda, tek iplikçikli RNA virusudur (Valley ve ark., 2017). IAPV ve ABPV ile aynı virus ailesindedir ve bu iki virus ile antijenik olarak yakındır (de Miranda ve ark., 2010).

Laboratuvar ortamında ergin arı ve larvalara KBV enjekte edilmesi hızlı seyirli ölümlere yol açmaktadır; ancak ABPV gibi ergin arılarda paraliz benzeri semptomlar oluşturmamaktadır. KBV bilinen tüm arı virusları içinde en ölümcül olanıdır; hem ergin arılara hem de pupalara birkaç virus partikülü enjekte edildiğinde virüs hızla çoğalmakta ve üç gün içinde ölüme neden olmaktadır. Ergin arılar etkenin bulunduğu gıdalar ile beslendiğinde enfeksiyon oluşmadığı gözlenmiştir. Canlı arılar arasında kütikulaya doğrudan temas yoluyla etkenin bulaşmış olduğu düşünülmektedir (Bailey ve ark., 1979). Pupalara enjekte edildiğinde KBV' nin LD<sub>50</sub> değeri 35 virus partikülü olarak hesaplanmıştır. İnokulasyondan sonraki 24 saat içerisinde virus en yüksek değerine

ulaşmıştır (Dall, 1987). KBV arıların biyolojik evrelerinin tamamında (Hornitzky, 1981; Hornitzky, 1982) ve klinik semptom göstermeden persiste enfeksiyon şeklinde bulunabilmektedir (Dall, 1985; Anderson ve Gibs, 1988).

KBV enfeksiyonunun insidensi diğer arı virusları DWV, BQCV, SBV, ABPV ile kıyaslandığında düşüktür. Fransa’ da yapılan bir çalışmada çalışmada ergin arılarda % 17, pupalarda ise % 5 oranında KBV tespit edilmiştir (Tentcheva ve ark., 2004). Avrupa’ da insidensi düşük olmasına rağmen, ABD’ de oldukça yaygın olarak görülmektedir (Allen ve Ball, 1996). Almanya, Macaristan, Slovenya, Lüksemburg, Polonya ve Avusturya’ dan toplam 281 koloniden 25 koloni KBV pozitif olarak tespit edilmiştir. KBV enfekte kolonilerin 20’ sinde arıların şikayetçi oldukları rapor edilmiştir. Bunların 15’ i kışın görülen yüksek ölümlerden, 5’ i ise zayıf koloni, baharın kısa sürmesi ve kovan zararlılarından şikayetçi olmuşlardır. Diğer KBV pozitif 5 kolonide ise klinik tabloya rastlanmamıştır (Siede ve ark., 2005).

KBV sıklıkla Varroa ile ilişkilendirilmektedir. Klinik semptom göstermeyen persiste enfeksiyon, Varroa varlığıyla beraber ölümcül seviyede aktive olabilmektedir (Bailey ve ark., 1979). Arı kolonilerinde yüksek Varroa enfestasyonları yüksek virulansla sonuçlanmaktadır (Hung ve ark., 1996). Varroa KBV için önemli bir vektördür ve virus pozitif olan arıdan etkeni alarak negatif olan arıya beslenmesi sırasında taşır (Chen ve ark., 2004b).

ABPV ve KBV varlığı mevsimsel olarak farklılıklar göstermektedir. Her ikisinin de insidensi az olmasına ve ABPV Varroa varlığı ile birlikte yaz aylarında daha sık görülmesine rağmen, KBV ilkbahar aylarında daha sık tespit edilmektedir (Tentcheva, 2004).

### **2.3.9. Kronik Arı Felci Virüsü**

CBPV bal arılarında enfeksiyöz ve bulaşıcı bir hastalığa neden olmaktadır. Hasta arılar tüysüz ve siyah renklidir, bu yüzden ‘hairless black syndrome’ ya da ‘little black’ olarak isimlendirilmiştir. İzolasyon ve karakterizasyonu ilk olarak Bailey ve ark. (1963) tarafından yapılmıştır.

CBPV’ nin fiziko-kimyasal özellikleri, simetrisi ve boyutu, genomik organizasyon ve yapısı tamamen farklıdır. Viral partikül 30-60 nm boyunda 20 nm genişliğindedir. Tek iplikçiğe sahip olan RNA; RNA1 (3674 nt) ve RNA2 (2305 nt) olmak üzere iki parçadan oluşmaktadır (Oliver ve ark., 2008b). Uluslararası Virus

Taksonomi Komitesi tarafından sınıflandırılması yapılmamıştır (ICTV, 2018); ancak RNA1-ORF3 *Nodaviridae* ve *Tombusviridae* aileleri ile benzerlik göstermiş olduğu bildirilmektedir (Oliver ve ark., 2008b). Runckel ve ark. (2011) tarafından CBPV benzeri *Lake Sinai Virus 1* (LSV-1) ve *Lake Sinai Virus 2* (LSV-2) tespit edilmiştir. Yeni bulunan mosinovirus CBPV ve LSV ile benzerdir; bu virusların birlikte yeni bir virus ailesi altında sınıflandırılması düşünülmektedir (Schuster ve ark., 2014).

Ergin arıların viral hastalıklarında fiziksel ve davranışsal olarak gözlemlenebilen en önemli semptom paralizdir. Paralizin klinik olarak belirtisi titreme ve uçamayan arıların kovan önünde kümeleşmesi olarak tanımlanmaktadır (Ball ve Bailey, 1997). CBPV enfeksiyonlarında tip-1 ve 2 olmak üzere iki farklı klinik sendrom vardır (Bailey ve Ball, 1991; Ball ve Bailey, 1997).

Tip 1 sendromu, Britanya'da en yaygın görülen, kanatların ve etkilenen arıların vücutlarında anormal titreme hareketleri görülen formdur. Bu arılar uçamazlar, yürümeye çalışırlar ve kovan önünde yerde, bitkilerin üzerinde kümeler oluştururlar. Kovan içindeki arılar ise çerçevenin en üstünde bulunurlar. Karın bölgeleri şişmiş ve genişlemiştir. Bunun sebebi arılarda bulunan bal kesesinin sıvı ile dolması ve şişmesidir. Hastalık belirtilerinin başlamasından birkaç gün sonra hasta arılar ölmeye başlar. Şiddetli enfeksiyon geçiren kolonilerde özellikle yazın sıcak dönemlerinde koloni sönmeleri görülür. Kovanda sadece kraliçe arı ve birkaç işçi arı kaldığı gözlemlenir (Ribiere ve ark., 2010). Tip 2 sendromda ise arılar uçabilir fakat tüysüz ve koyu-siyah renktedirler. Kolonide bulunan sağlıklı bireylerden daha küçük görünürler ve karınlarında bulunan şişkinlikten dolayı nispeten ayrılırlar. Parlak görünümlüdürler, ışık altında gövde kaygan yüzeyli görünür. Kolonideki diğer arıların saldırılarına maruz kalırlar. Birkaç gün içinde uçamamaya başlarlar, titreme ve ardından ölüm gerçekleşir (Ribiere ve ark., 2010).

Tip 2 sendromu gösteren arılarda Tip 1 sendromu gösteren arılardaki kadar CBPV partikülü tespit edilmiş, serolojik olarak Tip-1 ve Tip-2' nin ayırt edilemeyeceği bildirilmiştir (Rinderer and Green, 1976). Ayrıca bazı durumlarda kolonilerde Tip 1 sendrom ve Tip 2 sendromu aynı anda ortaya çıkabilmektedir (Ribiere ve ark., 2010).

Titreme ve sürünmenin birçok hastalığın belirtisi olmasından dolayı farklı hastalıklar ve kimyasal intoksikasyonlar ile karışabilir. Arıların koloni önlerinde sürünmesi durumunun *Nosama apis*, *Malpighamoeba mellificae* ve *Acarapis woodi* gibi enfeksiyonlarda da görülmesi hastalık teşhisi açısından oldukça kafa karıştırıcıdır (Ball

and Bailey, 1997). Bailey (1967) kovan girişlerinde sürünen arı bulunan kolonilerin % 70' inde belirtilen parazit enfeksiyonların bulunmadığını, CBPV olduğunu bildirmiştir. CBPV'nin doğal koşullarda paralitik semptomları tetikleyen birincil bal arısı virusu olduğu söylenebilir.

Klinik semptom görülen arılarda CBPV viral yükünün en fazla olduğu yer beyindir (Blanchard ve ark., 2007; Olivier ve ark., 2008b). Paralizden etkilenen arıların özellikle somata ve nöropatik bölgelerinin etkilendiği in-situ hidridizasyon tekniği ile gösterilmiştir. Özellikle beynin duyuşsal ve görsel nörofilleri gibi nöronal bölgelerde CBPV partikül sayısının çok yüksek olduğu belirlenmiştir (Oliver ve ark., 2008b).

CBPV için en iyi bilinen iki bulaşma yolu vardır. Bunlardan ilki kalabalık kolonilerde hastalıklı bireylerden sağlıklı bireylere kontakt yol ile viral etkenin bulaşması (Bailey ve ark., 1983), ikincisi ise felçli arıların dışkılarından yayılan virus partikülünün sağlıklı arılar tarafından oral yolla alınmasıdır (Ribiere ve ark., 2007). İki bulaşma yolu da genellikle ilkbahar aylarında ve yaz başlangıcında koloni sayısının artması sırasında görülür (Ribiere ve ark., 2010). Deneysel enfeksiyonlar, sağlıklı ergin arılarda klinik semptomların, inokulumun enjeksiyonundan 5-6 gün sonra olduğunu göstermektedir. Bu durum doğada da aynı sürede oluşmaktadır (Chevin ve ark., 2012; Amiri ve ark., 2014).

Bal arısı viruslarının bazılarının bulaşmasında parazit vektörler önemli rol oynamaktadırlar. BQCV Nosema spp. ile ilişkilendirilirken, DWV ve ABPV' nin bulaşmasında ise Varroa destructor rol oynamaktadır. Yapılan deneysel enfeksiyonlar CBPV ile Nosema ceranea arasında oluşan sinerjizmanın arıların ölümüne yol açtığını göstermiştir (Toplak ve ark., 2013) fakat bu sinerjizmanın doğal enfeksiyonlarda olup olmadığı bilinmemektedir (Ribiere ve ark., 2002). Yapılan çalışmalarda Varroa ile CBPV arasında ilgi olmadığı bildirilmiştir (Ribiere ve ark., 2002; Tenctheva ve ark., 2004), ancak Celle ve ark. (2008) Varroa' da virus partikülünü tespit etmiştir. Ayrıca *Formica rufa* ve *Camponotus vagus* cinsi karıncalarda etken tespit edilirken, bulaşma yolunda nasıl bir etkisinin olduğu henüz belirlenmemiştir (Celle ve ark., 2008).

Enfekte arı kolonilerinde moleküler teşhis yöntemleri kullanılarak yumurtadan ergin bireye kadar tüm biyolojik evrelerinde CBPV tespit edilmiştir (Blanchard ve ark., 2007) fakat sadece ergin bireylerde hastalık görülmektedir (Ribiere ve ark., 2010). Kovan girişinde bulunan bekçi arıların viral yükünün, polen toplayan ve kovan içinde bulunan arılara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (Blanchard ve ark., 2007). Ani koloni

kayıplarının yaşandığı kolonilerde ise kraliçe arıların ve çok az işçi arının kolonide kaldığı görülmüştür (Ribiere ve ark., 2010).

CBPV dünyanın birçok bölgesinde her mevsimde sporodik olarak görülür. Etken kolonilerde ani ve hızlı kayıplara yol açmayabilir fakat işçi arılarda önemli kayıplar verilmesine sebebiyet verir. Enfeksiyonun koloni üzerinde etkileri net olarak ortaya konulmasada, zayıf bal arısı kolonileri için önemli bir risk faktörü olduğu açıktır (Chen ve Siede, 2007).

#### **2.4. Genomik Yapı ve Organizasyon**

*Filamentöz virus* ve *Apis iridescent virus* dışında kalan tüm bal arısı virusları pozitif polariteli, ikozahedral pseudo T=3 simetriye sahip, zarfsız ve farklı biyolojik özelliklere sahip RNA viruslarıdır. Kapsidin dış yapısı birbirini tekrarlayan 60 protomerden oluşurken, VP1, VP2, VP3 olmak üzere üç yapısal protein bulunur. BQCV ve ABPV gibi bazı viruslarda ise, küçük bir protein olan VP4 bulunur (Govan ve ark., 2000). VP4 viral partikülün dış yapısında bulunmaz, iç yüzeyde VP1' in altında yer alır. Kapsid proteinleri RNase aktivitesi ve düzensiz çevre koşullarından korunmada, konakçı spesifitesi ve doku tropizminde önemli rol oynar (Chen ve Siede, 2007).

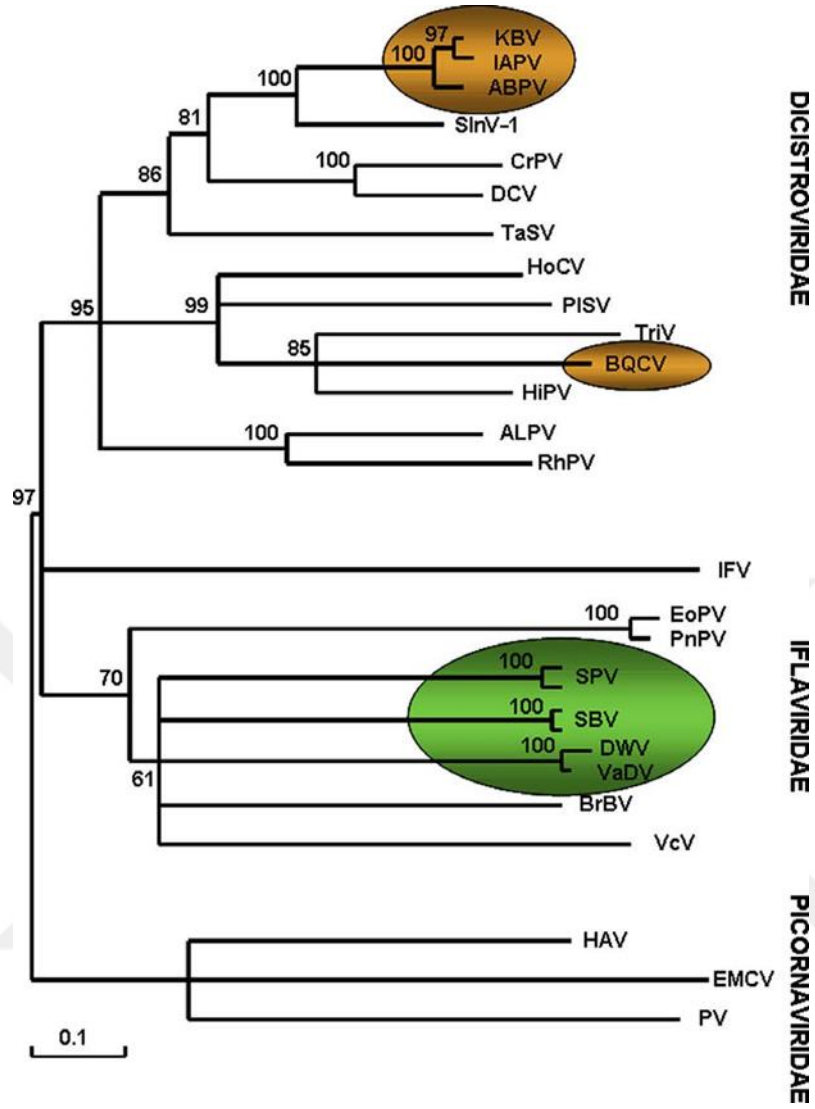
Pozitif polariteli RNA virusları viral proteinlerin translasyonunda mRNA (Messenger Ribonucleic Acid) gibi rol oynamaktadırlar. Virusun replikasyonu konakçı sitoplazmasında gerçekleşmektedir. Virus konakçı hücrenin yüzeyine tutunmakta, konakçı hücre zarındaki resöptörler aracılığıyla hücre yüzeyine bağlanmakta ve bu şekilde konakçı hücreye girmektedir. RNA genomu, konakçı hücrenin içine girdikten sonra RNA replikasyonu için yapısal ve yapısal olmayan proteinler oluşturmak üzere protein öncülerine çevrilmektedir. RNA bağımlı RNA polimeraz enziminin yardımı ile pozitif iplikçikten negatif iplikçik kopyalanmakta, yeni genomik iplikçiklerin çoğalması için bir şablon görevi görmektedir. Pozitif iplikçikli RNA ve yapısal proteinler üretildiğinde, viral partikülün paketleme işlemi gerçekleşmektedir. En son olarak virion hücre yüzeyinden salınmaktadır (Yeşilbağ, 2017b).

Bal arısı viruslarının birçoğu picorna-like virus süper ailesine ait olup, ailenin karakteristik özelliklerini taşımaktadırlar. Kapsid proteinlerle çevrili RNA genomu, VPg olarak adlandırılan küçük bir protein bulundurmaktadır. VPg proteini RNA genomunun 5' ucundan stabilizasyonunu sağlamakta ayrıca translasyon ve transkripsiyonda görev almaktadır (Chen ve Siede, 2007).

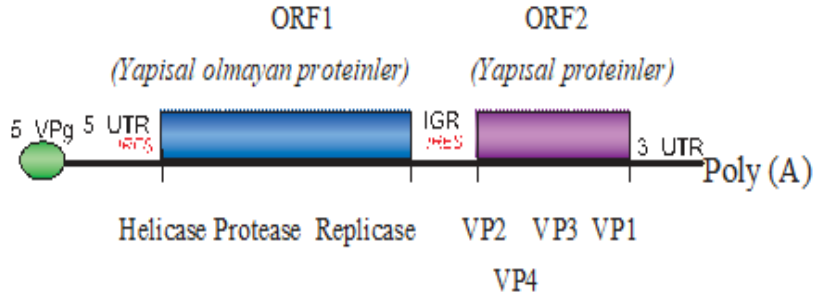
Bal arısı viruslarının genom uzunluğu, poly-A kuyruğu hariç 8500-10.140 bp arasında değişmektedir. SBV, DWV tek geniş bir Open Reading Frame (ORF) içerirken, IAPV, KBV, ABPV ve BQCV iki ORF içermektedir. Genomik organizasyonun oluşumu bakımından bal arısı virusları ikiye ayrılmaktadır. IAPV, ABPV, KBV ve BQCV monopartit bisistronik yani 5' ucunda bulunan ORF tarafında yapısal olmayan proteinler kodlanırken, 3' ucunda bulunan ORF tarafında yapısal proteinler kodlanır. DWV ve SBV ise monopartit monosistronik (Mayo, 2002), CBPV ise bipartittir, RNA1 ve RNA2 fragmentlerinde sırasıyla üç ve dört overlapping ORF bulunmaktadır (Olivier ve ark., 2008b). *Dicistroviridae*, *Iflaviridae* ve *Picornoviridae* ailesinde bulunan bazı bal arısı virusları, insekt virusları ve yakın ilişkili oldukları viruslar gösterilmiştir (Şekil-3).

IAPV-ABPV-KBV *Dicistroviridae* ailesinde *Aparavirus* genusu içerisinde yer almaktadır. BQCV ise IAPV-KBV-ABPV ve *Criquet paralysis virus* ile birlikte *Dicistroviridae* familyasında, *Triatovirus* genusu içerisinde tanımlanmaktadır (Le Gall ve ark., 2008). *Dicistroviridae* ailesinde bulunan viruslarda intergenik bölge (IGR) ile ayrılmış iki ORF bulunmaktadır (Şekil-4). Büyük olan ORF 5' ucunda bulunmaktadır. Virus replikasyonundan ve işlenmesinden sorumlu yapısal olmayan proteinler burada bulunur. Helikaz, 3C proteaz ve RNA bağımlı RNA polimeraz fonksiyonel bölgeleri tanımlanmıştır. Küçük olan ORF, 3' ucuna doğru yerleşmiş olarak bulunmakta ve viral partikülde bulunan yapısal kapsid proteinlerini kodlamaktadır. Genomun 3' ucunun sonunda doğal olarak poli-adenilat bulunmaktadır (Govan ve ark., 2000; de Miranda ve ark., 2004; Maori ve ark., 2007).





**Şekil 3.** Dicistroviridae, Iflaviridae ve Picornaviridae ailelerine ait korunmuş bölgeler olan kapsid protein, 3-C proteaz, RNA bağımlı RNA polimeraz gen bölge temelli oluşturulmuş filogram ABPV, KBV, IAPV, SInV-1 (Solenopsis invicta virus), CrPV (cricket paralysis virus), DCV (Drosophila C virus), TaSV (Taura syndrome virus), HoCV (Homalodisca coagulata virus), PISV (Plautia stali intestine virus), TriV (Triatoma virus), BQCV (black queen cell virus), HiPV (Himetobi P virus), ALPV (aphid lethal paralysis virus), RhPV (Rhopalosiphum padi virus), IFV (infectious flacheri virus), EoPV (Ectropis obliqua picorna-like virus), PnPV (Perina nuda picorna-like virus); SPV (slow paralysis virus), SBV (sacbrood virus), DWV (deformed wing virus), VaDV (Varroa destructor virus), BrBV (Brevicoryne brassicae picorna-like virus), VcV (Venturia canescens virus), HAV (hepatitis A virus), EMCV (Encephalomyocarditis virus), PV (polio virus) (de Miranda, 2004)

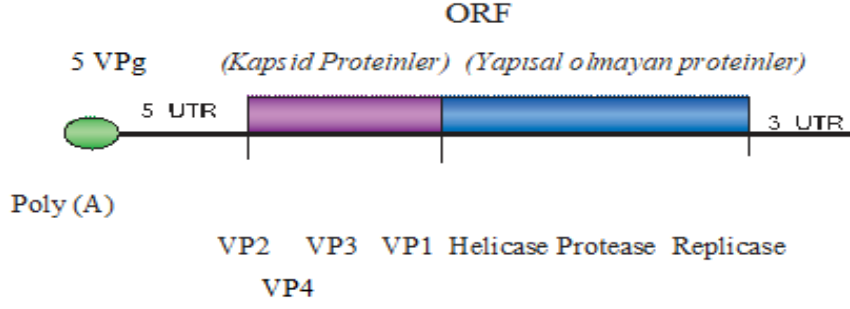


Şekil 4. Dicistroviridae ailesine ait virusların genomik yapılarının şematize edilmesi (Chen ve Siede, 2007)

*Dicistroviridae* ailesine ait virusların en önemli özelliklerinden birisi korunmuş bir bölge olan İnternal Ribozomal Giriş Bölgesinin (IRES) varlığıdır. IRES, Dicistroviruslarda 5' çevrilmeyen bölge (5' UTR-untranslated region) olarak tanımlanan yerde bulunmaktadır (Jan, 2006). IRES sayesinde 5' cap bulunmadan mRNA' nın ilerleyen bölgelerinden ribozoma bağlanıp translasyonu başlatabilmektedir (Yeşilbağ, 2017a).

IAPV, ABPV ve KBV birbirlerine benzemelerine, çapraz reaksiyon verebilmelerine karşın serolojik ve moleküler olarak ayırt edilebilmektedirler (de Miranda ve ark., 2010). ORF nükleik asit değişiklikleri analiz edildiğinde ABPV-KBV ve IAPV kompleksinin büyük değişiklikler gösterdiği düşünülebilir. IGR ve 3' UTR bölgeleri yüksek oranda korunmuş bölgeler olup, birbirileri arasında % 80 benzerlik gösterirken (de Miranda ve ark., 2004; Palacios ve ark., 2008), tersine 5' UTR nükleotid dizileri değişkendir ve %40 oranında benzerlik gösterir (de Miranda ve ark., 2004; Chen ve Evans, 2007; Palacios ve ark., 2008).

DWV ve SBV, Iflavirus ailesi içerisinde yer almaktadır. Virion oval yapıda, monosistronik ve 22-30 nm uzunluğuna sahiptir. Tek iplikçikli, pozitif polariteli ve tek ORF' ye sahiptir. Genomun 5' ucu, RNA replikasyonunda rol oynayan kovalent olarak bağlanmış bir protein olan VPg'yi taşımaktadır (Valles ve ark., 2017).

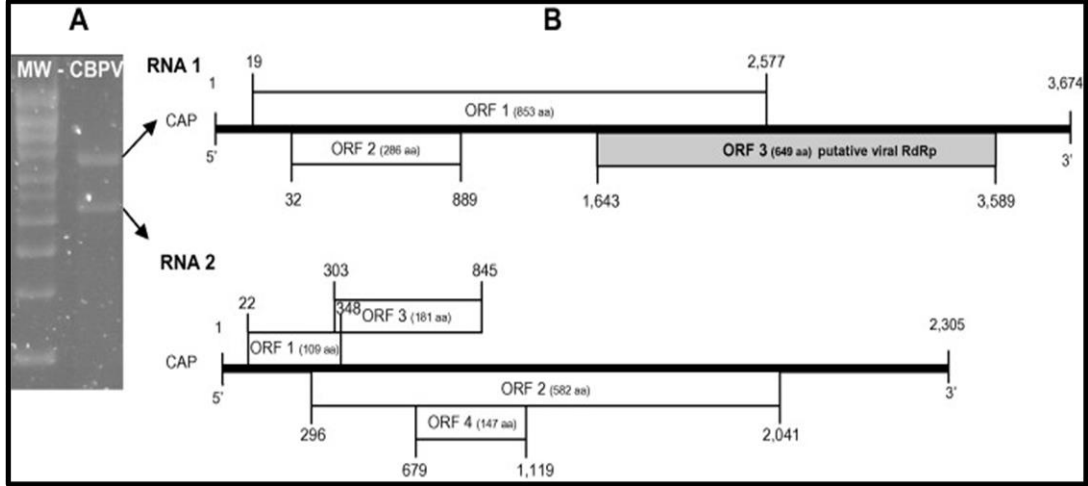


**Şekil 5.** Iflaviridae ailesine ait virusların genomik yapılarının şematize edilmesi (Chen ve Siede, 2007)

Kapsid proteinlerini sırasıyla VP2-VP4-VP3-VP1 oluşturmaktadır. Bunlar yapısal proteinler olarak da adlandırılmaktadır. Yapısal olmayan proteinler ise Helikaz, 3- C proteaz ve replikaz proteinlerinden oluşmaktadır (Şekil-5) (Chen ve Siede, 2007).

CBPV genomu orjinal olarak beş tek iplikçikli RNA fragmanı içermektedir. Bunlardan ikisi büyük olan RNA1 ve RNA2 fragmentleridir. Yaklaşık olarak sırasıyla 4200 ve 2800 bp uzunluklarındadırlar. Küçük RNA'lar 3a, 3b, 3c olmak üzere yaklaşık olarak 1100 bp uzunluklarındadırlar (Overton ve ark., 1982; Fauquet ve ark., 2005). RNA1 fragmentinde üç, RNA2 fragmentinde dört overlapping ORF bulunmaktadır (Şekil-6) (Olivier ve ark., 2008b).

CBPV şimdiye kadar sınıflandıramamıştır. Fakat RNA1-ORF3'de bulunan RNA bağımlı RNA polimeraz gen bölgesi *Nodaviridae* ve *Tombusviridae* aileleri ile benzerlik göstermektedir (Olivier ve ark., 2008b). Alphanodavirus ve Betanodavirus, *Nodaviridae* ailesinde pozitif polariteli, oval, 32-37 nm uzunluğunda ve zarfsız viruslardır (Fauquet ve ark., 2005). Alphanodaviruslar tıpkı CBPV gibi insektlerde uçamama, paraliz ve ölüm ile sonuçlanan hastalık tablosu ortaya çıkarırken, Betanodaviruslar balıklarda ensefalopati ve retinopati ile seyreden bulgular meydana getirmektedir (Ball ve Johnson, 1998; Fauquet ve ark., 2005).

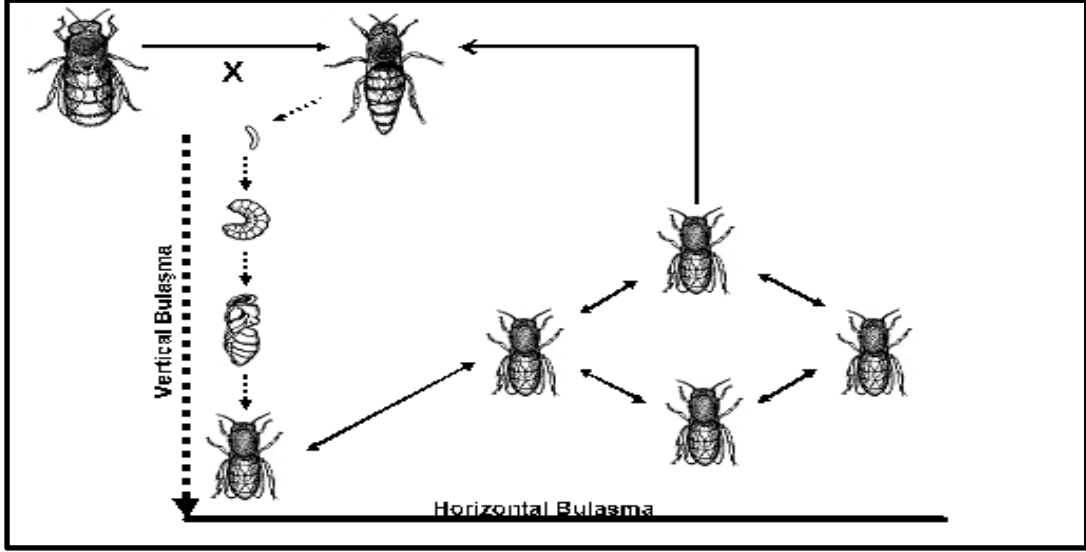


**Şekil 6.** CBPV genom karakterizasyonu. A) Moleküler büyüklüklerine göre jel elektroforez görüntüsü. B) RNA1 ve RNA2 fragmentlerinin şematize edilmesi, ORF ve protein büyüklüklerinin gösterilmesi (Ribiere ve ark., 2010)

Nodaviruslar ve CBPV arasında belirgin benzerlikler bulunmaktadır. Her ikisi de sinir sistemini etkilemektedir. Bipartit genomik yapıya sahip olup RNA1, RNA2 ve RNA3 fragmentlerine sahiptirler. RNA1 tarafından RdRp kodlanırken, RNA2 kapsid proteinlerini kodlamaktadır (Ribiere ve ark., 2010). Bir başka benzerlik ise 5' cap yapısının olması ve 3' ucunda poly-A kuyruğunun olmamasıdır (Fauquet ve ark., 2005).

## 2.5. Bulaşma

Zorunlu hücre içi canlılar olan viruslar, hayatlarına devam edebilmek için konakçı hücre ve komponentlerine ihtiyaç duymaktadır. Virusların yaşam sürekliliğini sağlayan en önemli basamaklardan biri bulaşma şekilleridir. Bulaşma bir popülasyondaki virusun yayılımını ve sürekliliğini belirlemektedir. Bir viral etkenin nasıl bulaştığını bilmek onunla mücadele ve kontrol programını güçlendirmektedir. Bulaşma vertikal yolla, horizontal yolla ya da her iki yolla birden olabilmektedir (Şekil-7). Horizontal bulaşma aynı jenerasyonun bireyleri arasındaki bulaşmadır. Bulaşma solunum, gıda ve venereal yolla olursa direkt bulaşma, parazit, sinek vb. aracı ile bir bireye geçerse indirekt bulaşma olarak adlandırılmaktadır. Vertikal bulaşma ise etkenin anneden yavruya ya da yumurtaya geçmesidir. Bulaşma yolları bir virusun virulansının belirlenmesinde kritik role sahiptir. Horizontal bulaşmayı etkileyen en önemli faktör popülasyon yoğunluğu ve virusun çoğalma hızıdır. Vertikal bulaşma ise uzun süreli persiste enfeksiyonların oluşmasında rol oynamaktadır (Yeşilbağ, 2017b).



Şekil 7. Bal arısı viruslarının bulaşma yolu (Chen ve ark., 2006)

### 2.5.1. Bal Arısı Virusu Enfeksiyonları

Arılar bir arada yaşayan sosyal varlıklardır. Popülasyonun yoğun olması ve bunun birbirleri arasındaki teması artırması patojenlerin kolaylıkla yayılmasına sebep olmaktadır (Chen ve Siede, 2007). Viruslar yumurta, larva, pupa, ergin dönemlerinin tamamında arıları enfekte edebilmektedir. Saha şartlarında arı virusları latent veya persiste olarak bulunabilmektedirler. Üstelik sağlıklı arı kolonilerinde bir veya birden fazla viral etken tespit edilebilmektedir (Benjeddou ve ark., 2001; Evans, 2001; Chen ve ark., 2004c).

#### 2.5.1.1. Horizontal Bulaşma

##### 2.5.1.1.1. Gıda Kaynaklı Horizontal Bulaşma

Horizontal bulaşma, arılarda en sık görülen bulaşma modeli olup kontamine gıdaların tüketilmesi ile oluşur. Bal arıları için doğal yollarla tüketilen gıdalar bal, polen ve arı sütüdür. İşçi arıların larvaları ağız ile beslemesi, popülasyon yoğunluğu ve yoğun fiziksel temas kolonilerde gıda kaynaklı bulaşmayı doğrudan etkileyen faktörler olarak ortaya çıkmaktadır. Koloniye kraliçe arı katılması, ağızdan besleme, polen paketleme, nektar işleme gibi bazı davranışlar da gıda kaynaklı bulaşma ihtimalini arttırmaktadır (Chen ve ark., 2006a).

Bal arılarındaki gıda kaynaklı bulaşmanın en önemli kanıtı viral etkenlerin gıda, bağırsak ve dışkıda tespit edilmesi olarak gösterilmektedir. Yapılan çalışmalarda koloni

gıda kaynaklarından olan polende arı viruslarından altısı (BQCV, DWV, SBV, ABPV, CBPV, KBV), balda ise ikisi (BQCV ve DWV) belirlenmiştir. Arı sütünde viral etkene rastlanmamıştır (Chen ve ark., 2006a) Shen ve ark., (2005a) KBV ve SBV etkenlerini tüm gelişme evrelerinde tespit etmelerinin yanı sıra arı keki, bal, polen ve arı sütünde de tespit etmişlerdir.

Chen ve ark. (2006a) kraliçe arıların bağırsağında BQCV ve DWV miktarının hemolenf, ovaryum, baş, spermatekaya göre daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada steril petrilere arı dışkıları toplanmış, yapılan moleküler çalışmalar sonucunda BQCV ve DWV tespit edilmiştir. Aynı arıların bağırsaklarında yine aynı iki virus tespit edilmiş ve sonuçlar gıda kaynaklı bulaşmanın ispatı niteliğinde olmuştur.

#### **2.5.1.1.2. Venereal Bulaşma**

Venereal bulaşma çiftleşme sırasında virusun bir bireyden başka bir bireye bulaşmasıdır. Bu bulaşma arılarda tam olarak netlik kazanmamıştır. Fakat erkek arılarında (Chen ve ark., 2004a), semenlerinde (Chen ve ark., 2006a) ve kraliçe arıların spermetekalarında (Chen ve ark., 2006b) viral etken tespit edilmiştir. Bu çalışmalar venereal bulaşmanın önemini ortaya koymuş olsa da daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

#### **2.5.1.1.3. Fekal-Oral Bulaşma**

Fekal-oral bulaşma, gıdaların dışkıları ile kontamine olması sonucu etkenin enfekte olmayan arılara bulaşmasıdır. Kalabalık koloni fekal-oral bulaşma için önemlidir. BQCV ve DWV kraliçe arıların dışkılarında tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2006b). Kontamine gıdanın alimenter yolla alınması veya kovan temizliğinden sorumlu işçi arıların hücrelerde bulunan dışkılarıyla teması ile bulaşma şekillenebilmektedir. Alınan gıdalarda, arıların sindirim organlarında ve dışkıda etkenlere rastlanması gıda kaynaklı bulaşma ve fekal-oral bulaşmanın benzerliklerini ortaya koymaktadır (Chen ve ark., 2006b). Bal arılarında dokularda tespit edilen virus miktarları farklılık göstermektedir. Sindirim sisteminde belirlenen virus miktarı diğer dokularda bulunan virus miktarından daha fazladır (Chen ve ark., 2006b). Sindirim sisteminin virusların birikimi açısından birincil bölge olduğu ve buradaki epitel hücrelerin virus enfeksiyonlarının yayılmasında ana portal olduğu düşünülmektedir (Chen ve Siede; 2007).

#### **2.5.1.1.4. *Varroa destructor* ile indirekt bulaşma**

Vector-born bulaşma, indirekt horizontal bulaşma yollarından olup, ara konakçı olarak bir vektöre ihtiyaç duymaktadır. Bu vektör etkeni bir konakçıdan diğer bir konakçıya iletmektedir (Chen ve Siede; 2007).

*Varroa destructor*, ergin arılar (işçi arı, erkek arı, kraliçe arı) ve yavru bulunan peteklerden beslenmektedir. Özellikle erkek arı larvalarının gözlerinde bulunmaktadır (Bailey ve Ball, 1991). Hem ergin *Varroa* hem de nimfler ağızlarında bulunan çengeller ile hücre duvarına tutunmaktadırlar. Hemolenf ile beslenen bu parazit, arıların yaşam kalitesini etkileyerek, immun sistemin direncini ve canlılığını azaltarak, birkaç yıl içinde kolonilerin sönmesine yol açmaktadır (Yang ve Cox-Foster, 2005). *Varroa* enfestasyonları ile ilişkili olarak ABPV, CBPV, slow paralysis virus (SPV), BQCV, KBV, cloudy Wing Virus (CWV), SBV, DWV koloni kayıplarının yaşanmasına sebep olmaktadır (Allen ve Ball, 1996; Martin ve ark., 1998; Martin, 2001; Tentcheva ve ark., 2004b).

Yapılan deneysel çalışmalarda etkeni taşıyan *Varroa*'nın sağlıklı kolonideki bireylere etkeni bulaştırdığı gösterilmiştir. *Varroa*'nın viral etkenin bulaşmasında önemli bir vektör olduğu ilk defa Bowen-Walker ve ark. (1999) tarafından ortaya çıkarılmıştır. Yine yapılan başka bir çalışmada KBV ile enfekte *Varroa*'lar sağlıklı arılara etkeni bulaştırmışlardır. *Varroa* enfestasyonlarının yoğun olmasının etkenin bulaşma olasılığını arttırdığı belirtilmiştir (Chen ve ark., 2004b).

*Varroa*'nın arı viruslarının bulaşmasında ve aktive olmasındaki etkisi doğrulanmasına rağmen, kendi aralarındaki bulaşma mekanizması henüz açıklığa kavuşturulamamıştır. Fakat virusların bu parazitte replike olmaları ve tükürüğünde virus tespit edilmesi biyolojik vektör olduğunu ortaya koymaktadır (Ongus ve ark., 2004; Shen ve ark., 2005b).

#### **2.5.1.2. Vertikal Bulaşma**

Yumurta, larva, pupa gelişme dönemlerinde viral etkenlerin görülmesi vertikal bulaşmanın en büyük göstergesidir (Chen ve Siede, 2007). Bazı kolonilerde *Varroa* enfestasyonları görülmeden DWV ile enfekte kraliçe arıların görülmesi ve aynı koloninin yumurtalarında etkene rastlanması vertikal bulaşmanın olduğunun kanıtıdır. Ayrıca virusların kraliçe arının ovaryumlarında ve yumurtaların yüzeylerinde bulunması da vertikal bulaşmanın olduğunun diğer göstergelerindedir (Chen ve ark., 2006b).

Ovaryumlarda virus titresi bağırsaklara göre daha düşüktür. Bunun sebebi olarak ovaryumlarda virusun replike olmaması veya latent olarak kalması gösterilebilir. Bu durumun embriyolar üzerine zararlı etkisinin olduğu düşünülmektedir (Chen ve ark., 2006b).

Horizontal bulaşma patojen miktarı ile doğrudan ilgilidir. Ne kadar çok patojen replike olursa, bulaşma o kadar hızlı ve yüksek oranda olmaktadır. Vertikal bulaşma ise daha çok latent seyirli enfeksiyolarda olmakta ve tüm dönemleri etkilemektedir. Fakat konakçıda replikasyon hızı fazla olabilir ve bu mortalitelere sebep olabilir. Bu da etkenin yeni konakçılara bulaşmasını olumsuz yönde etkileyebilir (Chen ve Siede, 2007).

## 2.6. Patogenez

Arı viruslarının enfeksiyon modelleri *Belirgin Enfeksiyon* ve *Gizli Enfeksiyon* modelleri olarak belirtilmektedir. Belirgin enfeksiyonda virus partikülü üretimi vardır ve klinik belirti görülmektedir. Enfeksiyon sonunda arı ya ölür ya da tamamen iyileşir. Belirgin enfeksiyon akut ve kronik olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Akut enfeksiyon kısa sürede klinik bulgularla şekillenerek ölümlere sebebiyet vermektedir. Ergin arılarda görülen CBPV ve larvalarda görülen SBV örnek olarak gösterilebilir. Kronik enfeksiyon ise ömür boyu devam edebilir ve virus partikülü çoğalmaya devam edebilir (Yeşilbağ, 2017b).

Gizli enfeksiyon, hiçbir klinik belirti göstermeksizin virus partikülünün tespit edilebildiği latent ve persiste enfeksiyon modelidir (Yeşilbağ, 2017b). Virus, düzensiz koşullar ya da çevre koşullarının değişkenlik gösterdiği stres faktörleri altında hızla çoğalabilir ve önemli koloni kayıplarına yol açabilir. Klinik belirti göstermeksizin virusun taşınması popülasyonda önemli bir kaynak oluşturur ve epidemiyolojik olarak çok büyük bir öneme sahiptir (Chen ve Siede, 2007).

Arı viruslarının bulaşma yollarının aydınlatılmasına rağmen patogenezini tam olarak aydınlatılamamıştır. Arılar sıklıkla birden fazla virusla enfekte olmakta, bunun yanı sıra paraziter enfeksiyonlarla birlikte görülmekte, bu yüzden latent veya persiste enfeksiyonlar oluşturmaktadırlar. Bunun için bir hastalığın hangi virustan kaynaklandığını kanıtlamak zordur. Konakçının birden fazla virusu aynı anda bulundurması da karışık (miks) enfeksiyon varlığını ispatlamaz. Bununla birlikte, Deforme kanat virusu ile yapılan çalışmalarda virus yüklerinin tespitinin, enfekte arılardaki hastalık nedeninin kanıtlanmasında yeni bir yol sağladığını ortaya koymuştur.



Klinik semptom gösteren; vücut ağırlıkları azalmış ve kanatlarında büzülme olan arılarda klinik semptom göstermeyen, sağlıklı arılara göre 4.4 kat daha fazla viral yük tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2005b). DWV ile yapılan çalışma, aynı konakta birden çok virusun bir arada bulunması durumunda viral yükün belirlenmesinin virus ile hastalık arasındaki nedensel ilişkiyi birbirine bağlayabileceğini açıkça göstermektedir.

Arı viruslarının doku tropizmi konusu reseptör-virus moleküler mekanizmaları tam olarak bilinmediğinden açıklanamamaktadır. *In vitro* koşullarda arı viruslarının çoğaltılamaması bunun sebebi olarak gösterilebilir. Fakat son yıllarda yeni hücre hatları geliştirilmektedir (Goblirsch ve ark., 2013; Ju ve ark., 2015).

Arı virusları vücuda ilk giriş yerlerinden hemolenf aracılığıyla sistematik olarak ikincil hedef dokulara yayılırlar. Örneğin, KBV ön-arka bağırsak epitelleri, sindirim sistemi kas dokusu, epidermis, trakea epitelleri, hemosit gibi dokuları enfekte eder ve buralarda çoğalır. Sinir sistemini enfekte ettiğine dair herhangi bir bulguya rastlanmamıştır (Dall, 1987). SBV işçi arıların çoğunlukla hipofarengal bezlerinde birikir, bununla birlikte yağ, kas dokuları ve trekeal hücrelerde görülür (Lee ve Furgala, 1967). CBPV' nin özellikle sinir hücrelerine affinitesi vardır. Bu durum CBPV enfeksiyonlarında neden paraliz görüldüğünü açıklamaktadır. Virus sindirim sistemi, mandibular ve hipofarengal bezlerde bulunabilirken, yağ ve kas dokuda bulunmaz (Lee and Furgala, 1965). ABPV partikülleri beyin, hipofarengal bez ve yağ hücrelerinin sitoplazmalarında tespit edilmiştir (Furgala ve Lee, 1966). DWV yağ doku, ovaryum ve spermatekalar dahil vücudun tamamında görülebilmektedir (Fievet ve ark., 2006). IAPV ve BQCV' nin sitopatolojik etkisi henüz tam anlamıyla bilinmemektedir.

Arı virusları *A. mellifera* ile sınırlı kalmadığı, *A. cerana*, bambus arıları, varroa ve bazı karınca türlerinde görüldüğü için konakçı çeşitliği gösterirler. Konakçı çeşitliği göstermesi ve tamamına yakının RNA virusu olmasından dolayı; genetik değişkenlikler, yeni konakçılara adapte olması, birden fazla virusla enfekte olmasından dolayı rekombinasyonlar ve reassortmentlerin olması yeni virusların ortaya çıkmasına sebep olabilir (Chen ve Siede, 2007).

## **2.7. Bağışıklık**

Bağışıklık bal arılarında koloni bağışıklığı ve bireysel bağışıklık olmak üzere iki şekilde ele alınabilir. Kolonide bağışıklığın sağlanmasında her bireye farklı görevler düşmektedir. Bunların başında işçi arıların petek gözlerini temizlemeleri, ölmüş olan

ergin arı ve pupaları uzaklaştırmaları gelmektedir. Ya da bazı ergin arıların kovan dışında ölmeleri kolonide hastalıkların yayılmaması bakımından önemlidir (Evans ve Spivak, 2010). Kovan içinde termoregülasyonun sağlanması bazı patojenlerin elemine edilmesini sağlamaktadır. Örneğin bazı sıcaklığa duyarlı mantar enfeksiyonlarında işçi arılar tarafından kovan içi sıcaklık arttırılmaktadır (Simone-Finstrom ve ark., 2014).

Tüm bunlara ek olarak bal arıları bitki reçinelerinden propolis üretimi yapmaktadırlar. Propolis hem antimikrobiyal ve antiviral etkilidir hem de kovayı dış etkenlerden ve hava akımından korumaktadır. Ayrıca kovan içindeki bal arıları su kaynağı olarak bu reçineleri kullanabilmektedir (Simone-Finstrom ve Spivak, 2010; Popova ve ark., 2014). Propolisin ihtiva ettiği p-Kumarik asit gibi organik asitler immun sistem direncini arttırmaktadır (Mao ve ark., 2013). Yine içindeki bazı organik asitler ise *Varroa*' ya karşı mitisidal etkilidir (Damiani ve ark., 2010; Popova ve ark., 2014).

Bal arılarının bireysel olarak patojenlere karşı doğuştan var olan bazı savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Dış iskelet yapısını oluşturan kütikula ve sindirim sistemi boyunca uzanan peritrofik membran örnek olarak verilebilecek fiziksel ve kimyasal bariyerlerdir. Bu bariyerler patojenin tutunmasını ve invaze olmasını engellemektedirler (Evans ve Spivak, 2010). Eğer etken tutunur ve hücre içine girerse ikinci bir savunma mekanizması yolu olan hücresel ve humoral savunma mekanizması devreye girmektedir (Wilson-Rich ve ark., 2008). Patojen üzerinde bulunan Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) adı verilen bazı korunaklı komponentlerin ve bu kompenetleri tanıyan resöptörlerin (Pattern Recognition Receptors (PRRs)) PAMP' lara tutunması yolu ile olur (Brutscher ve Flenniken, 2015). PAMP' ların PRR' ler tarafından yakalanması ile istilacı patojenlere karşı hemolenf ile ilişkili fagositoz, nodül formasyon ve kapsilasyonu içeren hücresel immun yanıt başlamaktadır. Fenoloksidaz hemolenfin koaglutinasyon veya melanizasyonu düzenlemekte ve antimikrobiyal peptitler (AMP) sentezlenmeye başlamaktadır. Defensin, abaesin, himenoptesin, bazı mikrobiyal enfeksiyonlarda indüklenen ve bal arılarında identifiye edilmiş bazı AMP'lerdir (Casteels-Josson ve ark., 1994; Vizoli ve Salzet; 2002).

İnspektlerde Toll, imd, Jak-STAT ve JNK olmak üzere bazı sinyal yolları (signaling pathway) bulunmaktadır. Bu sinyal yollarının birçok AMP geninin ifadesini kontrol ettikleri *Drozofila*' nın virus enfeksiyonlarında gösterilmiştir (Zambon ve ark., 2005). Azzami ve ark. (2012) hücresel ve humoral immun yanıtın ABPV enfeksiyonunda

etkilenmediğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise IAPV enfeksiyonunda hücrel immun yanıt sinyal yollarının etkilendiği tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2014).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, insektlerde RNA interferans (RNAi) olarak adlandırılan, doğuştan var olan antiviral bir cevap olduğu söylenmektedir (Ding, 2010). Doğuştan antiviral bir yol olan, eksojen çift zincirli RNA (dsRNA) saptanmasıyla tetiklenmekte, RNA replikasyonu sırasında oluşmaktadır. Bal arılarında dsRNA ile uyarılan antiviral cevaba aracılık etmede RNAi' nin rolü çeşitli çalışmalarda doğrulanmıştır. Bunlardan biri yoğun koloni kayıplarının yaşandığı kolonilerde işçi arılardan yapılan dizi analizlerinde IAPV nükleotidleri ile RNAi eşleştiği ve viral etken ile savaştığı bildirilmiştir (Chejenovsky ve ark., 2014).

Bağışıklığa etkili en önemli faktörlerden biri de beslenmedir. Bal arıları beslenme ihtiyaçlarını nektarlar ve polenlerle karşılamaktadırlar. Alınan besin tüm koloninin ihtiyacını karşılamalı ve uzun periyotlarda yetecek şekilde saklanabilir olmalıdır. Kovanda en uzun süreli olarak bal ve arı keki saklanabilmektedir. Nektar ve bal karbonhidrat içerdiği için enerji ihtiyacını gidermek adına bal arılarının tüm yaşam döngülerinde kullanılmaktadır. Arı keki ve polen ise protein ihtiyacını karşılamakta, yavru yetiştirme, büyüme ve bağışıklık için önem arz etmektedir (Di Pasquale ve ark., 2013).

Birçok canlıda bağışıklık ve beslenme arasında olan ilişki ortaya koyulmuştur. Diyetle meydana gelen kısıtlamalar sonucu bağışıklık sistemi etkilenmektedir. Örneğin polenin ihtiva ettiği esansiyel amino asitler, AMP gibi sinyal yollarında gerekli olan peptitlerin sentezi için gereklidir. Bal ve nektar gibi karbonhidratlar ise hücrel ve humoral bağışıklıkla ilgili prosesler için enerji kaynağı olarak kullanılmaktadırlar (Di Pasquale ve ark., 2013).

## **2.8. Teşhis Metotları**

Arılarda yaşam veriminin düşmesi ve yaşanan koloni kayıplarının en büyük nedenlerinden biri olarak viral etkenler kabul edilmektedir. Bu amaçla; arı viruslarının tespit edilebilmesi için agar-gel immunodiffusion testi (AGID), ELISA, elektron mikroskobu (EM) ve Western blotting (WB) ve moleküler yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Arı viruslarının teşhisinde AGID ve ELISA yöntemleri yaygın olarak kullanılmalarına rağmen moleküler teknikler kadar duyarlı değildir (Allen ve Ball, 1996).

Günümüzde arı viruslarını tespit etmede en güvenilir metot olarak moleküler teknikler görülmektedir. Stoltz ve ark. (1995) KBV tespiti için spesifik primerler ile RT-PCR metodu geliştirdikten sonra bu metot serolojik testlerle kıyaslandığında daha yüksek spesifite ve sensitivite gösterdiğinden, daha sonraki yıllarda arı viruslarının teşhisinde önemli bir yer tutmuştur.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) daha etkili, sensitivitesi ve spesifitesi daha yüksektir. Simpleks PCR her reaksiyonda tek hedefe yönelik çalıştığı için ekstra maddi yük ve zaman kaybına sebep olmaktadır. Multipleks PCR' da ise aynı reaksiyonda birden fazla hedef olduğu için hem maddi anlamda hem de zaman anlamında önemli kazançlar sağlamaktadır (Yin ve ark., 2012; Sguazzo ve ark., 2013; Piewbang ve ark., 2016; Wang ve ark., 2017).

Bu çalışmanın amacı yedi önemli arı virusuna karşı rutin teşhis laboratuvarlarında daha hızlı sonuç elde etmek için multipleks RT-PCR (mRT-PCR) testinin geliştirilmesi ve bu testi kullanarak Ege Bölgesinde bu yedi virus kaynaklı arı viral hastalıklarının tespit edilmesidir.

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Etik Kurulu Onayı**

Bu çalışma İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Etik Kurulu'nun 28.09.2017 tarih ve 210 sayılı onayı ile gerçekleştirilmiştir.

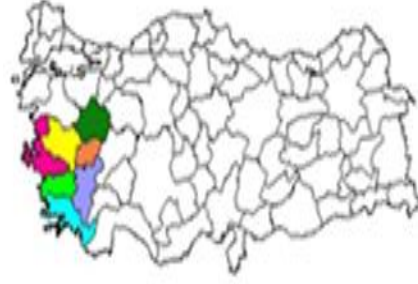
##### **3.1.2. Pozitif Kontrollerin Temini**

mRT-PCR'ın optimizasyonunu sağlamak amacıyla, gerekli olan pozitif RNA kontrolleri ve homojenizatları Budapeşte Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ve İnfeksiyöz Hastalıkları Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Tamas Bakonyi'den temin edilirken, pozitif kontrolleri temin edilemeyen KBV ve IAPV ise sentetik gen olarak sentezletirildi.

##### **3.1.3. Çalışmada Kullanılacak Örneklerin Temini**

Bu çalışma İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü çalışma alanı içinde yer alan Muğla, Denizli, Aydın, İzmir, Uşak, Kütahya ve Manisa illerinden mevcut viral arı hastalıklarından: IAPV, DWV, SBV, ABPV, BQCV, KBV ve CBPV etkenlerinin tespiti amacıyla 'Çok Aşamalı Örnekleme Metodu' kullanılarak örnekleme yapılmıştır. Örnekleme yapılan iller ve örnek sayıları Şekil-8'de gösterilmiştir. Toplamda 110 işletmeden ergin arı ve 107 işletmeden yavrulu petek örnekleri toplanmıştır.

Bu çalışmada Örnekleme Çerçevesi çalışma alanındaki illere kayıtlı tüm işletmelerin bir listesi veya işletmedeki kovan sayısı gibi gerçek bir liste olan Gıda Tarım Hayvancılık Bakanlığı Arıcılık Kayıt Sistemi (AKS) 2016 yılı kayıtları, TUIK 2015 yılı verileri ile de kıyaslanarak kullanılmıştır. Birinci aşama olarak her ilden seçilecek işletmeler çalışma alanından alınacak toplam işletme büyüklüğü ile orantılıdır.



Şekil 8. Örnekleme haritası ve örneklenen işletme sayıları

### 3.1.4. Çalışmada Kullanılacak Primer Çiftleri

Çalışmada kullanılacak primer çiftleri ticari olarak sentezletirilmiş olup Tablo-1’ de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Yedi virus için kullanılan primerler ve ampikon uzunlukları

<b>Etken</b>	<b>Primer Çiftleri</b>	<b>Ampikon uzunluğu</b>	<b>Yayın</b>
<b>IAPV-F</b>	<i>CGAACTTGGTGACTTGAAG</i>	110 bp	Cox-Foster ve ark., 2007
<b>IAPV-R</b>	<i>GCATCAGTCGTCTCCAGG</i>		
<b>DWV-F</b>	<i>TGGTCAATTACAAGCTACTTGG</i>	269 bp	Squazza ve ark.,2013
<b>DWV-R</b>	<i>TAGTTGGACCAGTAGCACTCAT</i>		
<b>SBV-F</b>	<i>CGTAATTGCGGAGTGAAAGATT</i>	342 bp	Squazza ve ark.,2013
<b>SBV-R</b>	<i>AGATTCCCTTCGAGGGTACCTCATC</i>		
<b>AIV-F</b>	<i>GGTGCCCTATTTAGGGTGAGGA</i>	460 bp	Squazza ve ark.,2013
<b>ABPV-R</b>	<i>ACTACAGAAGGCAATGTCCAAGA</i>		
<b>BQCV-F</b>	<i>CTTATCGAGGAGGAGTTCGAGT</i>	536 bp	Squazza ve ark.,2013
<b>BQCV-R</b>	<i>GCAATAGATAAAGTGAGCCCTCC</i>		
<b>AIV-F</b>	<i>GGTGCCCTATTTAGGGTGAGGA</i>	641 bp	Reynaldi ve ark., 2013
<b>AIV-R</b>	<i>TGCACGGGAAGTATAAATAATTCT</i>		
<b>CBPV-F</b>	<i>AACCTGCCTCAACACAGGCAAC</i>	774 bp	Squazza ve ark.,2013
<b>CBPV-R</b>	<i>ACATCTCTTCTCGGTGTCAGCC</i>		

### 3.1.5. Kullanılan Malzeme ve Kimyasallar

#### **Biyogüvenlik Kabini**

Heraeus, Germany

#### **Ekstraksiyon Cihazı**

Roche, MagnaPure, Germany

#### **PCR Isı Döngü Cihazı**

Techne TC-412, United Kingdom

#### **Etüv**

Nüve EN-032, Ankara

#### **Çalkalayıcı**

Biosan, Latvia

#### **Vorteks cihazı**

Clifton Cyclone 63573, England

#### **Jel Görüntüleme Cihazı**

Vilber Lourmat, EEC.

#### **Jel Elektroforez Cihazı**

Thermo, USA

#### **Steril Havan**

Ergin arı ve yavrulu petek örnekleri steril kum ile steril havanda ezildi.

#### **High Pure Viral Nucleic Acid Kit**

Roche Magna Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, Lot: 21179300,  
Germany

#### **Jm 109 E.coli Hücreleri**

F' *traD36 lacIq (lacZ) M15 proA+B+/e14 (McrA) (lac-proAB) thi*  
*gyrA96 (Nalr) endA1 hsdR17 (r<sub>K</sub>+m<sub>K</sub>) relA1 supE44 recA1*(Promega).

#### **Vektör**

Promega, pGEM-T Easy, USA



## Agaroz

Sigma, Kat No: A9539-10G, USA

## Ampisilin Stok Solüsyonu (100 mg/ml)

Üzerine 10 ml distile su ilave edildi. 0.2 µm'lik filtrelerden geçirilerek kullanıldı.

## Super Optimal Broth (S.O.B) Hazırlanışı

<b><u>Hazırlanışı:</u></b> Tripton	10 gr
Yeast Ekstrakt	2.5 gr
MgSO <sub>4</sub>	2.4 gr
Dekstroz	1.8 gr
NaCl	0.25 gr
KCl	0.9 gr
Distile Su	500 ml

## Luria Bertani Agar

<b><u>Hazırlanışı:</u></b> Tripton	5 gr
Yeast Ekstrakt	2.5 gr
NaCl	5 gr
Agar	7.5 gr
Distile Su	500 ml

Hazırlanan besiyeri karışımı 121°C' de 20 dakika otoklav edildikten sonra 56°C'ye kadar soğutulmuştur. Soğuduktan sonra 1ml' ye 1µl olacak şekilde Ampisilin (100 mg/ml) ve 2 ml IPTG (100 mM ) (isopropyl-β-D-thiogalactoside) ilave edilmiştir. Agar pleytlere dökülerek +4°C' de saklanmıştır.

## 2XYT Buyyon

<b><u>Hazırlanışı:</u></b> Bacto Triton	8 gr
Yeast Ekstrakt	2.5 gr
NaCl	2.5 gr
Distile Su	500 ml

Hazırlanan besiyeri karışımı 121°C’ de 20 dakika otoklav edildikten sonra 56°C’ye kadar soğutulmuştur. Soğuduktan sonra 1ml’ ye 1µl olacak şekilde Ampisilin (100 mg/ml) ilave edilmiştir. +4°C’ de saklanmıştır.

**IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) stok çözeltisi (100 mM)**

IPTG 0.238 gr

Distile su 10 ml’ ye tamamlandı. 0.2 µm’lik filtrelerden geçirilerek kullanıldı.

Ependorf tüplere 1 ml alınarak, -20°C’ ye kaldırıldı.

**Ethidium bromide**

Nalgene Fisher Scientific, BP-1302-10, USA

**Vasat**

EMEM (Eagle Minimum Essential Medium), Sigma, Lot: RNBF1794, United Kingdom.

**One-Step RT-PCR Kiti**

Roche, Transcriptor one-step RT-PCR kiti, Lot: 25117900, Germany

**Plazmid Ekstraksiyon Kiti**

Thermo, Kat No: K0502, USA

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Örnekleme Büyüklüğünün Tespit Edilmesi

Gerekli örnekler için örnek büyüklüğü %95 güven düzeyinde, %3 beklenen prevalans ve % 5 istenen hassasiyet '+/-' değerleri ile çok aşamalı örnekleme metodu kullanılarak belirlenmiştir. Çalışma alanındaki birinci aşamada (işletmeler için) gerekli örnek büyüklüğü için kullanılan girdiler ve buna göre toplam gerekli örnek sayısı (Tablo-2) ve bunların illere göre dağılımı (Tablo-3) aşağıda tablolar halinde sunulmuştur.

**Tablo 2.** Örnek Büyüklüğünün Hesaplanması

Gerekli güven düzeyi (%)	95
Beklenen Prevalans (Yaygınlık) (%)	3
İstenen Hassasiyet '+/-' (%)	5
Küme başına BSU sayısı (b)	150
ROH	0,01
Tasarım etkisi (D)	2,49
Basit rastgele örnekleme için Örnek Büyüklüğü	45
Küme örnekleme için Örnek Büyüklüğü	111

BSU → (Basic Sampling Unit) temel örnekleme ünitesi

ROH → (Rate of homogeneity) Homojenlik oranı

#### Basit rastgele örnekleme için örnek büyüklüğü hesaplama formülü:

$$n_{\text{Basit Rastgele Örneklem}} = \frac{(Z^2 * P(1 - P))}{e^2}$$
$$n = 1,96^2 * 0,03(1 - 0,03)/0,05^2 = 44,71622$$

Z = istenen güven düzeyine karşılık gelen standart normal dağılım değeri  
(% 95 CI için Z = 1.96)

P = beklenen prevalans (yaygınlık) % si

e = istenen hassasiyet % (yarım istenen güven aralığı genişliği).

Küçük popülasyonlar için n,  $n(\text{adj}) = (N \times n) / (N + n)$  olacak şekilde ayarlanabilir. Sonlu nüfus büyüklüğü için ayarlamalar Thrusfield (2005) tarafından açıklanmıştır.

#### Tasarım etkisi (D) formülü:

$$D = 1 + ((BSU - 1) * ROH)$$
$$D = 1 + ((150 - 1) * 0,01) = 2,49$$

### Küme örnekleme de örnek büyüklüğü hesaplama formülü:

$$n_{\text{Küme Örnekleme}} = n_{\text{Basit Rastgele Örneklem}} * D$$
$$n_{\text{küme}} = 44,71622 * 2,49 = 111,3$$

**Tablo 3.** Çalışma için seçilen illerde bulan arıcılık işletmeleri ve örneklerin dağılımı

İllerin işletme sayılarının Bölgedeki toplam işletmelere göre orantılı dağılımı				
İller	İldeki Toplam İşletme Sayısı	İldeki Toplam Kovan Sayısının Bölgedeki Toplam Kovan Sayısına Oranı (%)	Oransal Dağılıma Göre Örneklenecek İşletme Sayısı	Örneklenen İşletme Sayısı
AYDIN	280386	16,67%	19	18
DENİZLİ	114602	6,81%	8	7
İZMİR	215743	12,83%	14	21
KÜTAHYA	24060	1,43%	2	2
MANİSA	80894	4,81%	5	8
MUĞLA	958328	56,98%	63	54
UŞAK	7825	0,47%	1	1
<b>Genel Toplam</b>	<b>1,681,838</b>	<b>%100</b>	<b>111</b>	<b>111</b>

### 3.2.2. İlgili Gen Bölgelerinin RT-PCR ile Çoğaltılması

Her bir etken spesifik primer çiftleri kullanılarak RT-PCR metodu ile amplifiye edilmiştir. Bu işlem için kullanılan reaksiyon karışım içeriği Tablo-4, reaksiyon koşulları Tablo-5' te verilmiştir. Elde edilen RT-PCR ürünleri etidyum bromür içeren %2'lik agaroz jelde 80 V' ta 60 dakika yürütülerek UV ışık altında spesifik bantlar görüntülenmiştir.

**Tablo 4.** RT-PCR yöntemi için hazırlanan reaksiyon karışımı ve miktarları

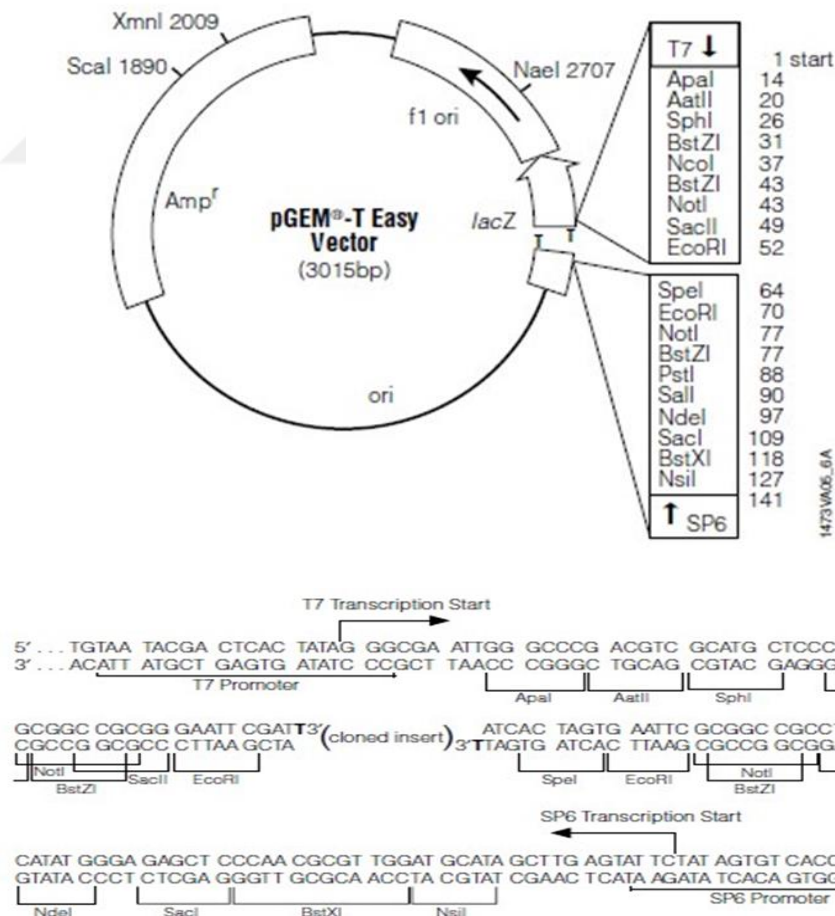
Karışım	Hacim (µl)
5x Buffer (Roche)	10
Forward Primer (10 p/mol)	2
Reverse Primer (10 p/mol)	2
Enzim Miks (Roche)	1
RNA	5
Distile su	30
<b>Toplam</b>	<b>50</b>

**Tablo 5.** RT- PCR test reaksiyonunun evreleri, ısı, zaman ve siklus koşulları

Evre	Isı (°C)	Zaman	Siklus
Transkripsiyon	50	30 dk	1
İlk denaturasyon	95	7 dk	1
Denaturasyon	95	20 sn	
Bağlanma	56	20 sn	45
Uzama	72	30 sn	
Son uzama	72	10 dk	1

### 3.2.3. İlgili Gen Bölgelerinin Klonlanması

Bu çalışmada IAPV, DWV, SBV, ABPV, BQCV, KBV, CBPV viruslarının RT-PCR ile çoğaltılan ilgili gen bölgeleri, mRT-PCR ve sRT-PCR testlerinde tespit miktarlarının belirlenmesi için pGEM T Easy (Şekil-9) (Promega, Germany) vektörüne klonlandı.



**Şekil 9.** T/A klonlama vektörü olan pGEM – Teasy vektörü

#### Klonlama işlemi:

1. İlk olarak reaksiyon karışımı (Tablo-6) hazırlandı ve 16 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.
2. İnkübasyon işleminin sonrası karışıma, daha önceden -80 °C' de stoklanmış ve buz içerisinde çözdürülmüş olan *E. coli JM109* bakteri hücrelerinden 50'şer µl eklendi ve buz içerisinde 20 dakika bekletildi.
3. Bu sürenin sonunda ısı şoku için 42 °C' de 50 saniye su banyosunda tutuldu.
4. Isı şokunu takiben karışım tekrar buz içerisinde 2 dakika bekletildi.
5. İki dakikanın tamamlanmasının ardından, karışımın üzerine 250 µl Super Optimal Broth (SOB) besiyeri ilave edildi ve 37 °C' de 250 rpm' de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon sonunda karışım LB (100 µg/ml ampisilin, 0.1 mM IPTG ve 20 µg/ml X-Gal) besiyerine ekildi. Daha sonra 37 °C' de 12-16 saat inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonunda besiyerlerinden beyaz koloniler toplanarak LB (100 µg/ml ampisilin) sıvı besiyerlerine ekildi.
8. Sıvı besiyerleri 37 °C' de 250 rpm' de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
9. İnkübasyon sonunda plazmid ekstraksiyon kiti ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi.
10. Ekstraksiyon sonrasında plazmid doğrulaması yapabilmek için HF EcoR I restriksiyon enzimi kullanılarak enzim kesim işlemi yapıldı (Tablo-7).
11. Enzim kesme işlemi için hazırlanan karışımdan 9 µl alınarak 1 µl plazmid ile karıştırıldı. Hazırlanan 10 µl' lik karışım 37 °C' de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Karışımın tamamı % 1.5' luk agoroz jelde 80 V' de 45 dakika yürütüldü.

**Tablo 6.** Klonma için gerekli olan reaksiyon karışımı

Karışım	Hacim ((µl)
RT-PCR ürünü	7
pGEM-T Easy vektör	2
2X buffer	10
DNA ligaz enzimi (Promega)	2
<b>Toplam</b>	<b>21</b>

**Tablo 7.** Enzim kesme işlemi için kullanılan karışım

Karışım	Hacim ((µl)
Enzim (HF EcoRI)	1
10X buffer	10
Distile Su	79
<b>Toplam</b>	<b>90</b>

DWV için 269 bp, SBV için 342 bp, ABPV 460 bp, BQCV için 536 bp ve CBPV için 774 bp gen bölgelerinin klonlaması yapıldı ve bu işlem sonrası plazmid ekstraksiyonu gerçekleştirildi. IAPV için 110 bp ve KBV için 641 bp uzunluğundaki gen bölgeleri ticari olarak sentezi yaptırılmıştır. Bu iki gen bölgesi üretici firma tarafından plazmide kopyalanmış şekilde gönderildiğinden dolayı klonlama yapılmamıştır.

### 3.2.4. Simpleks RT-PCR (sRT-PCR) tespit limitlerinin belirlenmesi

Ekstraksiyon yapılan ve ticari olarak sentezi yaptırılan plazmidlerin spektrofotome ile ölçümleri yapıldı ve aşağıda belirtilen DNA hesaplama formülü kullanılarak DNA kopya sayısı hesaplandı. Plazmidler logaritma 10 (log<sub>10</sub>) tabanına göre 10<sup>-1</sup>'den 10<sup>-12</sup>'ye kadar seri dilüsyonları hazırlanarak sRT-PCR' da tespit limitleri belirlendi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.

$$\text{DNA kopya sayısı} = \frac{\text{Miktar (ng)} \times 6.022 \times 10^{23}}{\text{Uzunluk (plazmid insert)} \times 1 \times 10^9 \times 650}$$

### 3.2.5. Multipleks RT-PCR Optimizasyonu

Çalışmada tespit limitlerinin sRT-PCR yöntemi kullanılarak belirlenmesinden sonra mRT-PCR optimizasyon aşamasına geçildi. Optimizasyonda ilk aşama iki virus için dupleks RT-PCR denemesi olarak yapıldı. Bu işlem için IAPV ve DWV karışımında eşit kopya sayısı olacak şekilde çalışıldı. Daha sonra yapılan her reaksiyonda, pozitif kontrol sayısı bir artırılarak sırasıyla üç, dört, beş, altı ve yedi virus için RT-PCR yöntemi uygulandı. Reaksiyon karışımı ve koşullarının verimli olarak tespit edilmesi için aşağıda belirtilen modifikasyonlar yapıldı.

- Farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları (2 mM, 2,5 mM, 3 mM ve 3.5 mM) kullanıldı.
- Farklı primer bağlanma sıcaklıkları (52 °C' den 64 °C' ye kadar) denendi.
- Uzama süresi 30 saniye ile 3 dakika (30 saniye, 45 saniye, 1 dakika, 1 dakika 30 saniye ve 3 dakika) arasında değişen sürelerde çalışıldı.
- 63 °C' den 72 °C' ye kadar farklı uzama sıcaklıkları denendi.
- Taq Polimeraz enzimi farklı miktarlarda kullanıldı.
- Farklı primer konsantrasyonları denendi.
- Amplifikasyon kalitesini arttırmak amacıyla DMSO kullanıldı.

### 3.2.6. Ergin Arı ve Yavrulu Petek Örneklerinin Hazırlanması

Seçilen illerde bulunan arı işletmelerinden toplanan örnekler soğuk zincir koşullarına uygun olacak şekilde laboratuvara getirildi ve homojenizatlar oluşturuldu. Homojenizatların hazırlanmasında ergin ve yavrulu petekler kullanılarak havuzlama yöntemi kullanıldı. Bu işlem için ayrı ayrı olmak koşulu ve her biri 1 örnek olarak kabul edilen 15-20 adet ergin arı ve 15-20 yavrulu petek örneği içeren havuzlar hazırlandı. Bu havuzlar biyogüvenlik kabini (BSL-2) içerisinde steril bir havanda %10 fetal bovine serum içeren EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) besiyerinden 9 ml (1/10 oranında) eklenerek ezildi ve homojenize edildi. Daha sonra +4 °C' de 30 dakikada 3500 rpm' de santrifüj edildi.

### 3.2.7. Ergin Arı ve Yavrulu Petek Homojenizatlarının Ekstraksiyonu

Arı homojenizat örneklerinden elde edilen süpernatantlarından total nükleik asit ekstraksiyonu otomatik ekstraksiyon cihazı (Roche, MagnaPure, Germany) kullanılarak, ilgili firmanın belirttiği prosedüre bağlı kalınarak gerçekleştirildi. Her örnek için 200 µl



süpernatant kullanıldı. Homojenizatlardan elde edilen RNA örnekleri çalışmada kullanılmaya kadar -80°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

### 3.2.8. Ergin Arı ve Yavrulu Petek Örneklerinin mRT-PCR ile Çalışılması

Ekstraksiyon işleminden sonra 111 ergin arı ve 107 yavrulu petek örneğine mRT-PCR uygulandı.

### 3.2.9. Pozitif Örneklerin Doğrulanması

Pozitif olarak tespit edilen örneklerin dizi analizleri Forward ve Reverse olmak üzere çift yönlü olarak yaptırıldı (Microsynt, İsviçre). Dizi analizinde Tablo-8' de belirtilen primer çiftleri kullanıldı.

Nükleotid dizileri DNADynamo DNA Analysis Software kullanılarak düzenlendi ve konsensüs dizi elde edildi. Elde edilen konsensüs dizilerin doğrulanması National Centre of Biotechnology Information (NCBI) veri tabanında bulunan Bacis Local Alignment Search Tool (BLAST) kullanılarak yapıldı (Altschul ve ark., 1990).

**Tablo 8.** Dizi analizi için kullanılan primer çiftleri

Etken	Primer Çiftleri	Amplikon uzunluğu	Yayın
DWV HP-F DWV HP-R	CCACATGGTCTGAATGGATGACG CACGACGCTTACTACACCAC	618 bp	Reddy ve ark., 2013
SBV-F SBV-R	CGTAATTGCGGAGTGGAAAGATT AGATTCCCTCGAGGGTACCTCATC	342 bp	Squazza ve ark.,2013
ABPV CP-F ABPV CP-R	TTATGTGTCCAGAGACTGTATCCA GCTCCTATTGCTCGGTTTTTCGGT	900 bp	Benjeddou ve ark., 2001
BQCV-F BQCV-R	TGCAACCTCCTACGAACTCT TCCATGGCGACAGTTACATC	514 bp	Tapazsti ve ark., 2009
CBPV RNA1-F CBPV RNA2-R	TCAGACACCGAATCTGATTATTG CCGAGACAAAGGTCATCAT	1525 bp	Blanchard ve ark., 2009

### 3.2.10. Dizi Analizi Yapılan Örneklerin Filogenetik Ağaçlarının

#### Oluşturulması

Çalışmada elde edilen DWV, SBV, ABPV, BQCV, CBPV viruslarına ait konsensüs dizileri filogenetik analizinin yapılması amacıyla kullanılmıştır. Konsensüs dizileri ve GenBankası'ndan sağlanan referans dizileri çoklu dizi sıralaması ClustalW algoritması kullanılarak gerçekleştirildi. Daha sonra verilerin en iyi DNA / Protein modeli

belirlendi ve filogenetik ağaçlar MEGA 6 programında Neighbor-Joining (NJ) veya Maximum Likelihood (ML) metotları kullanılarak çizildi.



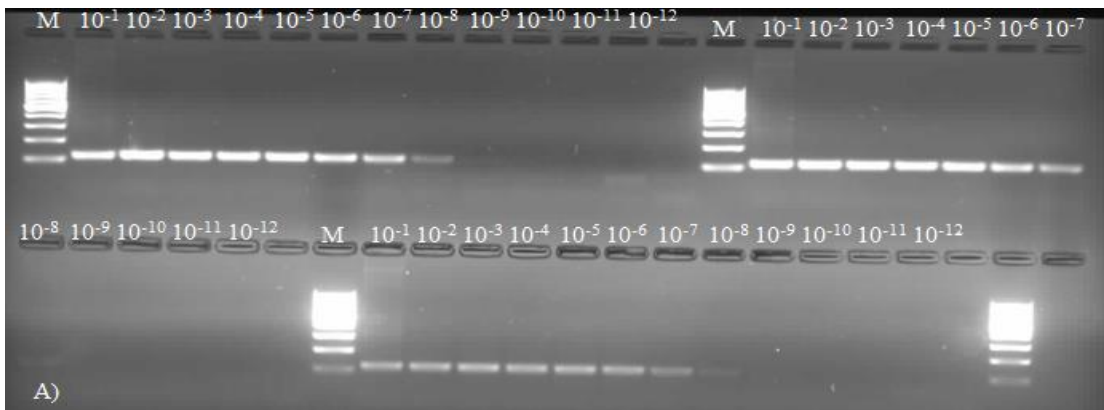
## 4. BULGULAR

### 4.1. Simpleks RT-PCR Tespit Limitleri

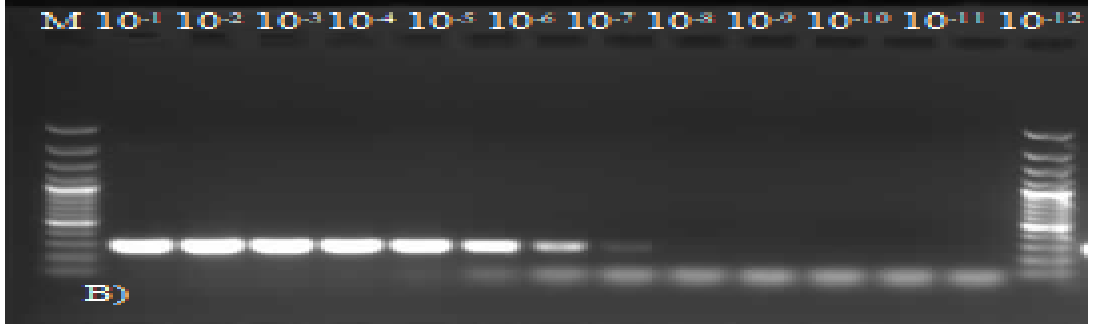
Plazmid miktarları spektrofotometrik ölçümler sonucuna göre DWV, SBV, ABPV, BCQV ve CPBV için sırasıyla 85, 97, 107, 109 ve 100 ng/μl olarak tespit edildi. Ticari olarak sentez işlemi gerçekleştirilen IAPV ve KBV için ise miktarları sırasıyla 202 ng/μl ve 142 ng/μl olarak belirlendi. Yapılan hesaplamalar sonucunda IAPV, DWV, SBV, ABPV, BQCV, KBV, CBPV için sırasıyla  $5,5 \times 10^{10}$  kopya/μl,  $2,39 \times 10^{10}$  kopya/μl,  $2,68 \times 10^{10}$  kopya/μl,  $2,85 \times 10^{10}$  kopya/μl,  $2,84 \times 10^{10}$  kopya/μl,  $3,6 \times 10^{10}$  kopya/μl,  $2,54 \times 10^{10}$  kopya/μl olarak hesaplandı. Daha sonra  $\log_{10}$  tabanına göre  $10^{-1}$ ' den  $10^{-12}$ ' ye kadar seri dilüsyonları yapıldı.

Tespit limiti çalışmaları üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Çalışmalar sonucunda IAPV için  $10^{-8}$  dilüsyona kadar (μl' de 550 DNA kopyası), DWV için  $10^{-7}$  dilüsyona kadar (μl' de 2390 DNA kopyası), SBV için  $10^{-7}$  dilüsyona kadar (μl' de 2690 DNA kopyası), ABPV için  $10^{-8}$  dilüsyona kadar (μl' de 285 DNA kopyası), BQCV için  $10^{-7}$  dilüsyona kadar (μl' de 2840 DNA kopyası), KBV için  $10^{-8}$  dilüsyona kadar (μl' de 360 DNA kopyası) ve CBPV için  $10^{-8}$  dilüsyona kadar (μl' de 244 DNA kopyası) pozitiflik gözlemlendi.

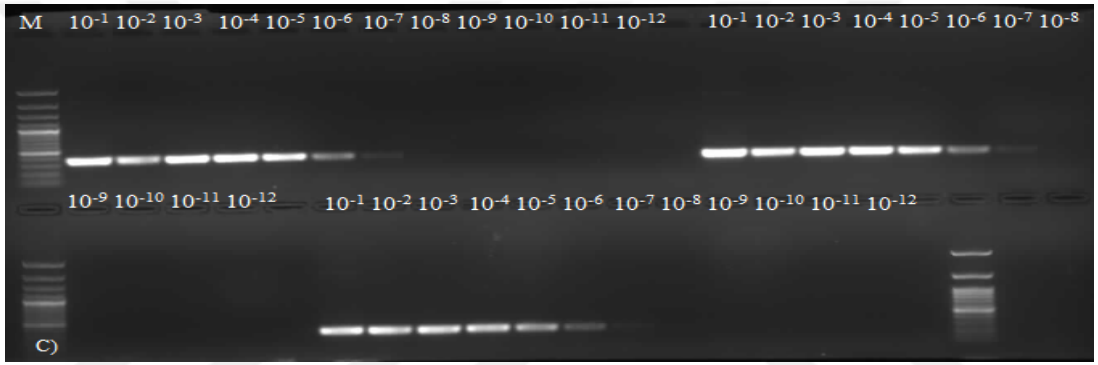
Tespit limitleri belirlenen etkenlerin UV ışığı altındaki jel elektroforez görüntüleri Şekil-10 (A), Şekil-11 (B), Şekil-12 (C), Şekil-13 (D), Şekil-14 (E), Şekil-15 (F) ve Şekil-16 (G)'da gösterilmiştir.



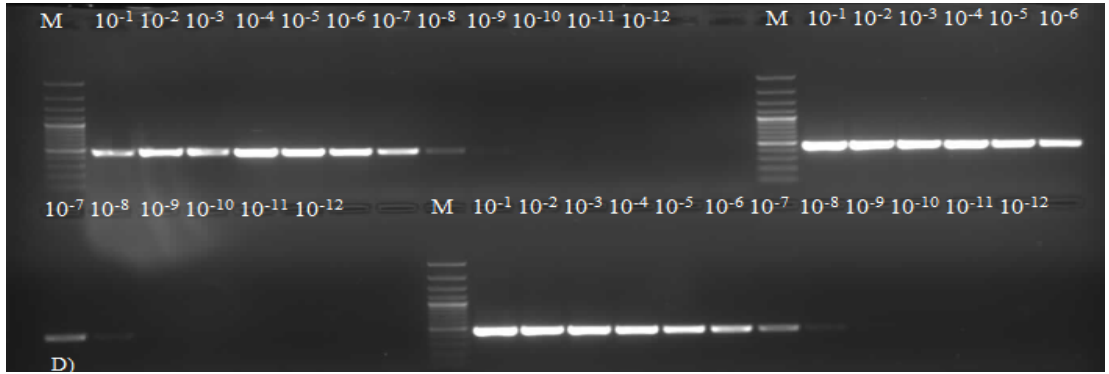
Şekil 10. A) İsrail akut arı felci virusunun sRT-PCR ile  $\log_{10}$  tabanlı seri dilüsyonlarının agaroz jel görüntüsü. M: Marker



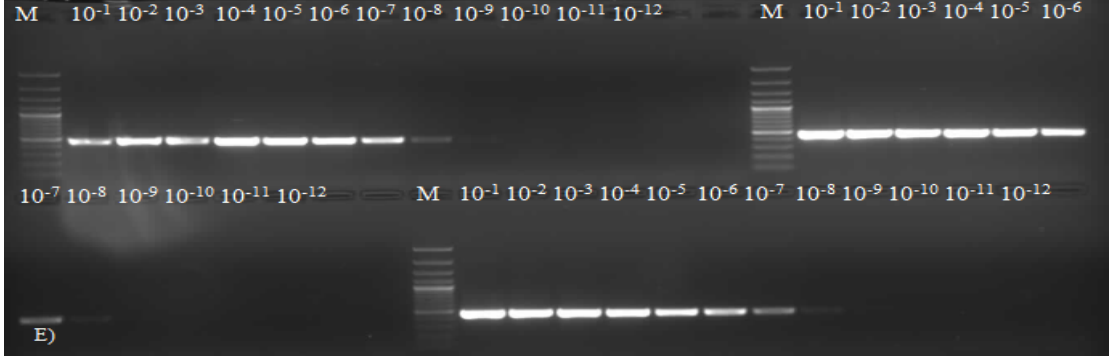
**Şekil 11. B)** Deforme kanat virusunun sRT-PCR ile log<sub>10</sub> tabanlı seri dilüsyonlarının agaroz jel görüntüsü.  
M: Marker



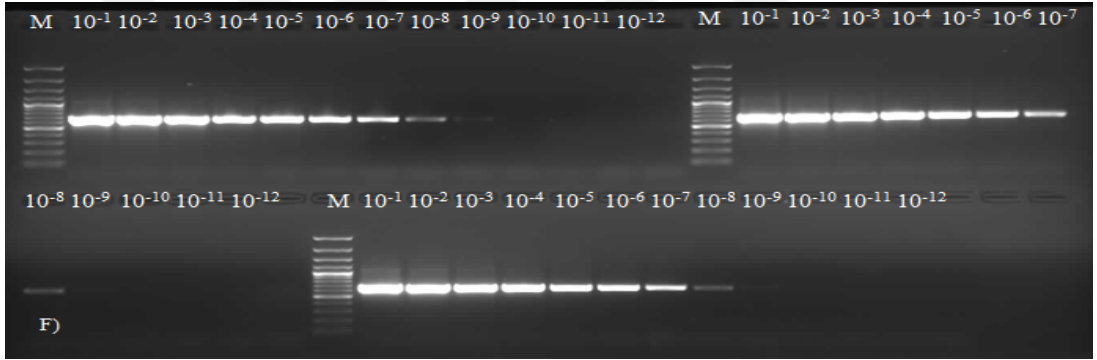
**Şekil 12. C)** Sacbrood virusunun sRT-PCR ile log<sub>10</sub> tabanlı seri dilüsyonlarının agaroz jel görüntüsü.  
M: Marker



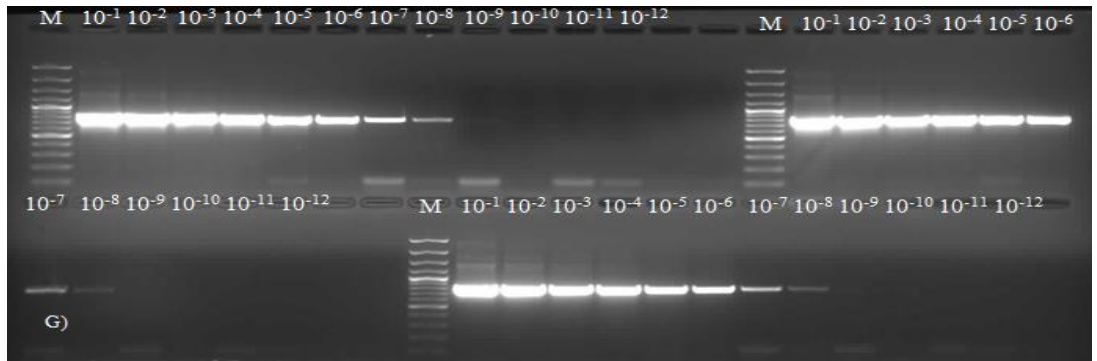
**Şekil 13. D)** Akut arı felci virusunun sRT-PCR ile log<sub>10</sub> tabanlı seri dilüsyonlarının agaroz jel görüntüsü.  
M: Marker



**Şekil 14.** E) Siyah kraliçe hücre virusunun sRT-PCR ile  $\log_{10}$  tabanlı seri dilüsyonlarının agaroz jel görüntüsü. M: Marker



**Şekil 15.** F) Kaşmir arı virusunun sRT-PCR ile  $\log_{10}$  tabanlı seri dilüsyonlarının agaroz jel görüntüsü. M: Marker



**Şekil 16.** G) Kronik arı felci virusunun sRT-PCR ile  $\log_{10}$  tabanlı seri dilüsyonlarının agaroz jel görüntüsü. M: Marker

## 4.2. Multipleks RT-PCR Optimizasyonu ve Tespit Limitinin Belirlenmesi

### 4.2.1 Multipleks RT-PCR Optimizasyonu

Tespit limitlerini ve miktarlarını belirlediğimiz IAPV ve DWV kopya sayıları eşit miktarlarda olacak şekilde karıştırılarak ikili RT-PCR yapıldı. Kit prosedürüne uygun olarak yapılan bu ilk çalışmada ikili bant görüldü. Daha sonra karışımda eşit kopya sayısı olacak şekilde, her çalışmada pozitif kontrol sayısı bir arttırılarak sırasıyla üçlü, dördü, beşli, altılı ve yedili RT-PCR uygulandı. Kit içerik ve prosedürüne göre dördü RT-PCR' ye kadar sonuç alındı; ancak beşli, altılı, yedili multipleks RT-PCR uygulamalarında bantların tamamı gözlenmedi.

Reaksiyon, farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında (2 mM, 2,5 mM, 3 mM ve 3.5 mM) ve 52 °C' den 64 °C' ye kadar değişen primer bağlanma sıcaklıklarında tekrar edildi. Yedi örneğinde aynı anda pozitif olarak görüldüğü optimum MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu 2 mM, bağlanma sıcaklığı ise 58 °C' olarak bulundu.

En uygun primer konsantrasyonun 0.4 µM, uzama sıcaklığının 72 °C, uzama süresinin ise 1 dakika olduğu tespit edildi. Amplifikasyon kalitesini arttırmak amacıyla kullanılan DMSO' nun bant kalitesini arttırmadığı gözlemlendi. Multipleks RT-PCR için kullanılan reaksiyon karışım içeriği ve oranları Tablo-9, reaksiyon koşulları Tablo-10' da verilmiştir.

Elde edilen PCR ürünleri % 2.5' luk agaroz jelde 85 V' de 80 dakika yürütülerek UV ışığı altında görüntülenmiştir.

**Tablo 9.** Multipleks RT-PCR testinde kullanılan reaksiyon karışımı

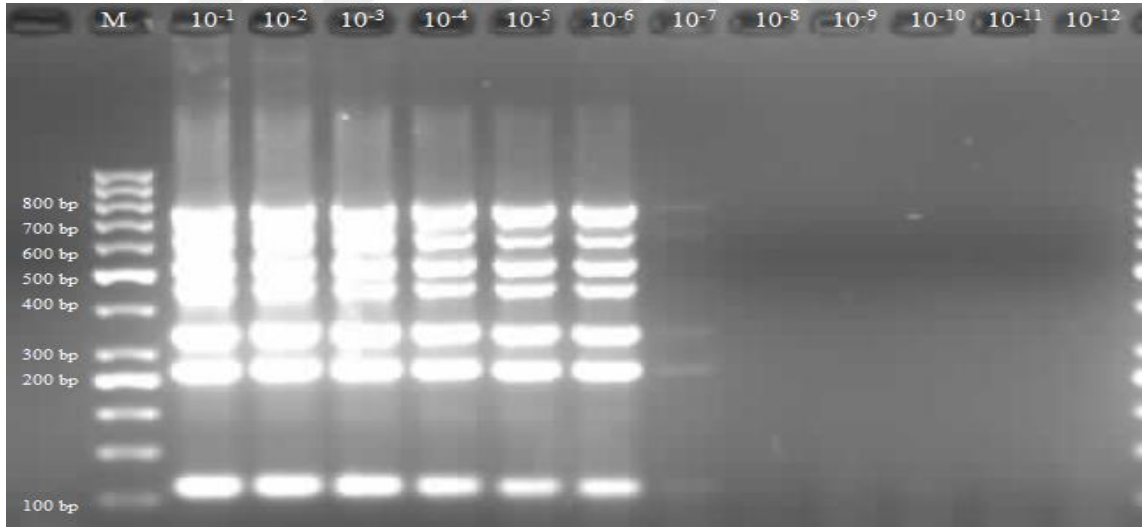
Karışım	Hacim ((µl)
RNA	5
Enzim (Roche)	1
Forward Primerleri	7
Reverse Primerleri	7
MgCl <sub>2</sub>	1.5
5X Buffer (Roche)	10
Distile su	18.5
<b>Toplam</b>	<b>50</b>

**Tablo 10.** Multipleks RT-PCR testinde kullanılan ısı, zaman ve siklus koşulları

Evre	Isı (°C)	Zaman	Siklus
Ters transkripsiyon	50	30 dk	1
İlk denaturasyon	95	7 dk	1
Denaturasyon	95	20 sn	
Bağlanma	58	20 sn	45
Uzama	72	1 dk	
Son uzama	72	10 dk	1

#### 4.2.2 Tespit Limitinin Belirlenmesi

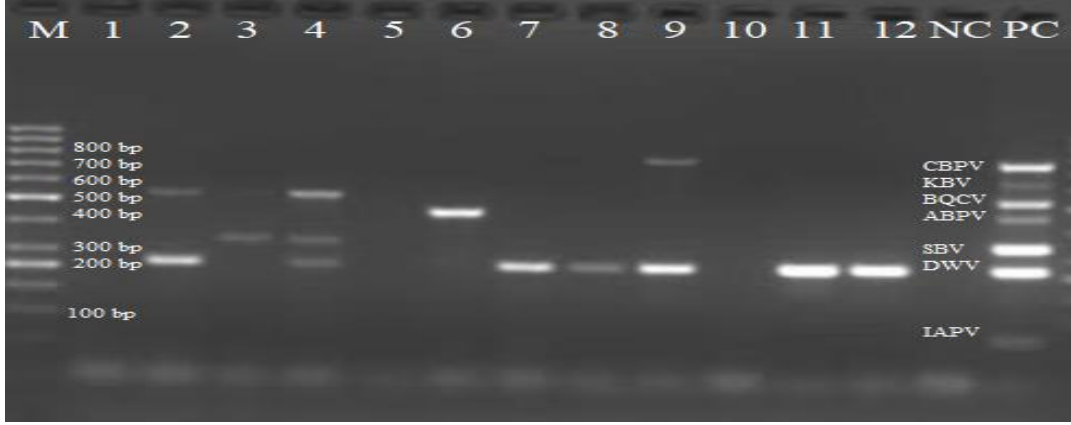
Tespit limiti çalışmasında ilk olarak pozitiflere ait kopya sayıları eşit miktarda olacak şekilde ( $2,5 \times 10^9$  kopya/ $\mu$ l) pozitif karışım hazırlandı. Elde edilen pozitif kontrol karışımının  $\log_{10}$  tabanında  $10^{-1}$ ' den başlayarak  $10^{-12}$ ' ye kadar seri dilüsyonları yapıldı. Tespit limiti çalışmaları üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve her bir etken için tespit limiti  $10^{-6}$  (2500 kopya/ $\mu$ l) olarak belirlendi.



**Şekil 17.** Multipleks RT-PCR tespit limitinin agaroz jel görüntüsü. 1. band 110 bp: IAPV, 2. band 269 bp: DWV, 3. band 342 bp: SBV, 4. band 460 bp: ABPV, 5. band 536 bp: BQCV, 6. band 641 bp: KBV, 7. band 774 bp: CBPV ve M: Marker

#### 4.3. Arı Örneklerinin Multipleks RT-PCR ile İncelenmesi

Ekstraksiyonu yapılan ve  $-80$  °C' de muhafaza edilen RNA örnekleri optimizasyonu yapılan mRT-PCR ile test edildi. Elde edilen RT-PCR ürünleri %2.5'lük agaroz jelde 85 V' de 80 dakika süre ile yürütüldü (Şekil-18).



**Şekil 18.** Multipleks RT-PCR ile saha materyallerinin agaroz jel görüntüsü. M: Marker, NC: Negatif Kontrol, PC: Pozitif Kontrol, 1: Negatif örnek, 2:DWV-BQCV pozitif, 3: SBV-BQCV pozitif, 4: DWV-SBV-BQCV pozitif, 5: Negatif örnek, 6: ABPV pozitif, 7: DWV pozitif, 8: DWV pozitif, 9: DWV-BQCV pozitif, 10: Negatif örnek, 11: DWV pozitif, 12: DWV pozitif

Ergin arı örneklerinin toplandığı 111 işletmenin sonuçları Tablo-11 içinde detaylı olarak verildi. Ergin arı örnekleri alınan 111 işletmenden 22' si DWV pozitif olarak bulunmuştur ve prevalans %19.8 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada DWV ergin arı işletmelerinde en fazla tespit edilen viral etkidir. Kontrolü yapılan işletmelerin 20' sinde BCQV tespit edilmiştir. BCQV, %18 prevalans oranı ile işletmelerde DWV ile en yüksek oranda görülen ikinci viral etken olmuştur. 111 işletmenin 4 adedinde ABPV, 3 adedinde SBV, 2 adedinde CBPV tespit edilmiştir. Bu viruslar için prevalans değerleri sırası ile %3.6, %2.7 ve %1.8 olarak tespit edilmiştir.

Ergin arı örnekleri toplanan arı işletmelerinde IAPV ve KBV tespit edilmemiştir.

**Tablo 11.** Ergin arı örneklerinden illere göre tespit edilen etkenler. P/TİS: pozitif işletme sayısı/Toplam işletme sayısı

İller	IAPV (P/TİS)	DWV (P/TİS)	SBV (P/TİS)	ABPV (P/TİS)	BQCV (P/TİS)	KBV (P/TİS)	CBPV (P/TİS)
Aydın	0/18	3/18	0/18	0/18	6/18	0/18	0/18
Denizli	0/7	0/7	1/7	0/7	0/7	0/7	0/7
İzmir	0/21	7/21	1/21	2/21	5/21	0/21	1/21
Kütahya	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Manisa	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
Muğla	0/54	12/54	1/54	2/54	9/54	0/54	1/54
Uşak	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<b>Toplam</b>	<b>0/111</b>	<b>22/111</b>	<b>3/111</b>	<b>4/111</b>	<b>20/111</b>	<b>0/111</b>	<b>2/111</b>



Yavrulu petek örneklerinin toplandığı 107 işletmeye ait sonuçlar Tablo 12 içinde verilmiştir. Yapılan çalışmada yavrulu petek örneği alınan 107 işletmede DWV ve BQCV olmak üzere iki viral etkenin varlığı tespit edilirken bu işletmelerde IAPV, SBV, ABPV, KBV ve CBPV tespit edilmemiştir. Yavrulu petek örneği alınan 107 işletmenin 11' inde DWV tespit edildi ve prevalans oranı %10.2 olarak bulundu. BCQV ise 107 işletmenin sadece 3' ünde ve %2.8 prevalans olarak belirlendi.

**Tablo 12.** Yavrulu petek örneklerinden illere göre tespit edilen hastalıklar. P/TİS: pozitif işletme sayısı/Toplam işletme sayısı

İller	IAPV (P/TİS)	DWV (P/TİS)	SBV (P/TİS)	ABPV (P/TİS)	BQCV (P/TİS)	KBV (P/TİS)	CBPV (P/TİS)
Aydın	0/18	1/18	0/18	0/18	1/18	0/18	0/18
Denizli	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
İzmir	0/18	2/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18
Kütahya	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Manisa	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
Muğla	0/53	6/53	0/53	0/53	2/53	0/54	0/54
Uşak	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<b>Toplam</b>	<b>0/107</b>	<b>11/107</b>	<b>0/107</b>	<b>0/107</b>	<b>3/107</b>	<b>0/107</b>	<b>0/107</b>

Elde edilen sonuçlara göre kontrol edilen işletmelerin bazılarında birden fazla virus aynı anda tespit edilmiştir. Yapılan değerlendirme sonucu sadece Muğla ilinden 1 işletmede SBV, DWV ve BQCV tespit edilmiştir. Muğla ilinden 4, İzmir ve Aydın illerinden 2' şer işletmede DWV ve BQCV; İzmir ilinden 1 işletmede ABPV ve BQCV; Muğla ilinden 1 işletmede ise ABPV ve CBPV' nin birlikte seyrettiği tespit edilmiştir. Ayrıca İzmir ili ile Aydın ilinde 1' er işletmede DWV hem ergin arılarda hemde yavrulu peteklerde tespit edilmiştir. Toplamda 111 işletmenin 4' ünden yavrulu petek temin edilememiştir.

Yapılan prevalans çalışmasında, bir işletmeden gelen yetişkin arı ve yavrulu peteklerin herhangi birisinde ya da her ikisinde birden etken tespiti halinde o işletme bir mihrak olarak kabul edilmiştir.

Toplanan örneklerin (111 adet ergin arı ve 107 adet yavrulu petek) hiçbirinde IAPV ve KBV etkeni bulunmamıştır. Bu nedenle mihrak sayıları ve prevalans çalışması yapılmamıştır.

DWV, toplanan ergin arı örneklerinin 17'sinde yavrulu petek örneklerinin 6'sında, ayrıca 5 işletmenin hem ergin arı hem yavrulu petek örneklerinde birlikte bulunmuş olup toplam 28 mihrak oluşturmuştur (Tablo-13). DWV' nin toplam prevalansı % 25.2 olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 13.** Deforme kanat virusu prevalansı

İller	Pozitif İşletme (Yi)	Toplam İşletme (Xi)	Prevalansı
AYDIN	4	18	0,2222
DENİZLİ	0	7	0,0000
İZMİR	7	21	0,3333
KÜTAHYA	1	2	0,5000
MANİSA	0	8	0,0000
MUĞLA	16	54	0,2963
UŞAK	0	1	0,0000
<b>Toplam</b>	<b>28</b>	<b>111</b>	<b>0,2523</b>

Ergin arı örneklerinde SBV için 3 mihrak tespit edildi (Tablo-14).

**Tablo 14.** Sacbrood virusu prevalansı

İller	Pozitif İşletme (Yi)	Toplam İşletme (Xi)	Prevalansı
AYDIN	0	18	0,0000
DENİZLİ	1	7	0,1429
İZMİR	1	21	0,0476
KÜTAHYA	0	2	0,0000
MANİSA	0	8	0,0000
MUĞLA	1	54	0,0185
UŞAK	0	1	0,0000
<b>Toplam</b>	<b>3</b>	<b>111</b>	<b>0,0270</b>

ABPV için tamamı ergin arı örneklerinden olmak üzere 4 mihrak belirlenmiştir (Tablo-15).

**Tablo 15.** Akut arı felci virusu prevalansı

İller	Pozitif İşletme (Yi)	Toplam İşletme (Xi)	Prevalansı
AYDIN	0	18	0,0000
DENİZLİ	0	7	0,0000
İZMİR	2	21	0,0952
KÜTAHYA	0	2	0,0000
MANİSA	0	8	0,0000
MUĞLA	2	54	0,0370
UŞAK	0	1	0,0000
<b>Toplam</b>	<b>4</b>	<b>111</b>	<b>0,0360</b>

BQCV için yirmi üç mihrak tespit edildi; bu mihrakların 20 adedi ergin arı 3 adedi ise yavrulu petek örneklerinden oluşmaktadır (Tablo-16). Toplam BQCV prevalansı ise % 20.7 olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 16.** Siyah kraliçe hücre virusu prevalansı

İller	Pozitif İşletme (Yi)	Toplam İşletme (Xi)	Prevalansı
AYDIN	7	18	0,3889
DENİZLİ	0	7	0,0000
İZMİR	5	21	0,2381
KÜTAHYA	0	2	0,0000
MANİSA	0	8	0,0000
MUĞLA	11	54	0,2037
UŞAK	0	1	0,0000
<b>Toplam</b>	<b>23</b>	<b>111</b>	<b>0,2072</b>

Ergin arı örneklerinde CBPV için 2 mihrak tespit edilmiştir (Tablo-17)

**Tablo 17.** Kronik arı felci virusu prevalansı

İller	Pozitif İşletme (Yi)	Toplam İşletme (Xi)	Prevalansı
AYDIN	0	18	0,0000
DENİZLİ	0	7	0,0000
İZMİR	1	21	0,0476
KÜTAHYA	0	2	0,0000
MANİSA	0	8	0,0000
MUĞLA	1	54	0,0185
UŞAK	0	1	0,0000
<b>Toplam</b>	<b>2</b>	<b>111</b>	<b>0,018</b>

#### 4.4. Filogenetik Analiz

Ergin arı ve yavrulu petek örneklerden DWV pozitif olarak tespit edilen 27 örnekten 5'ine dizi analizi gerçekleştirildi. Dizi analizi sonucunda Helikaz geninin 484 bp' lik (6129-6613bp arası) uzunluğunda bir bölgesinin dizisi elde edildi. Çalışmada elde edilen 5 DWV izolatına ait nükleotid dizisi (Ek-2) ve daha önceki çalışmalarda belirtilen, GenBank' tan elde edilen toplam 32 dizi kullanıldı. En iyi DNA/Protein modeli olarak T92+G model (Tamura-3) parametresi belirlendi (Tamura ve ark., 2013). Neighbor-Joining metodu kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç Şekil-19' da sunuldu. Elde edilen veriler ışığında, DWV Türkiye izolatları arasında % 97-98 benzerlik oranı belirlendi. Türkiye izolatlarına en benzer olan Avrupa izolatları % 97-98, Kore izolatları % 95-97, Kanada ve Amerika Birleşik Devletlerine ait izolatlar ise % 97 benzerlik göstermiştir.

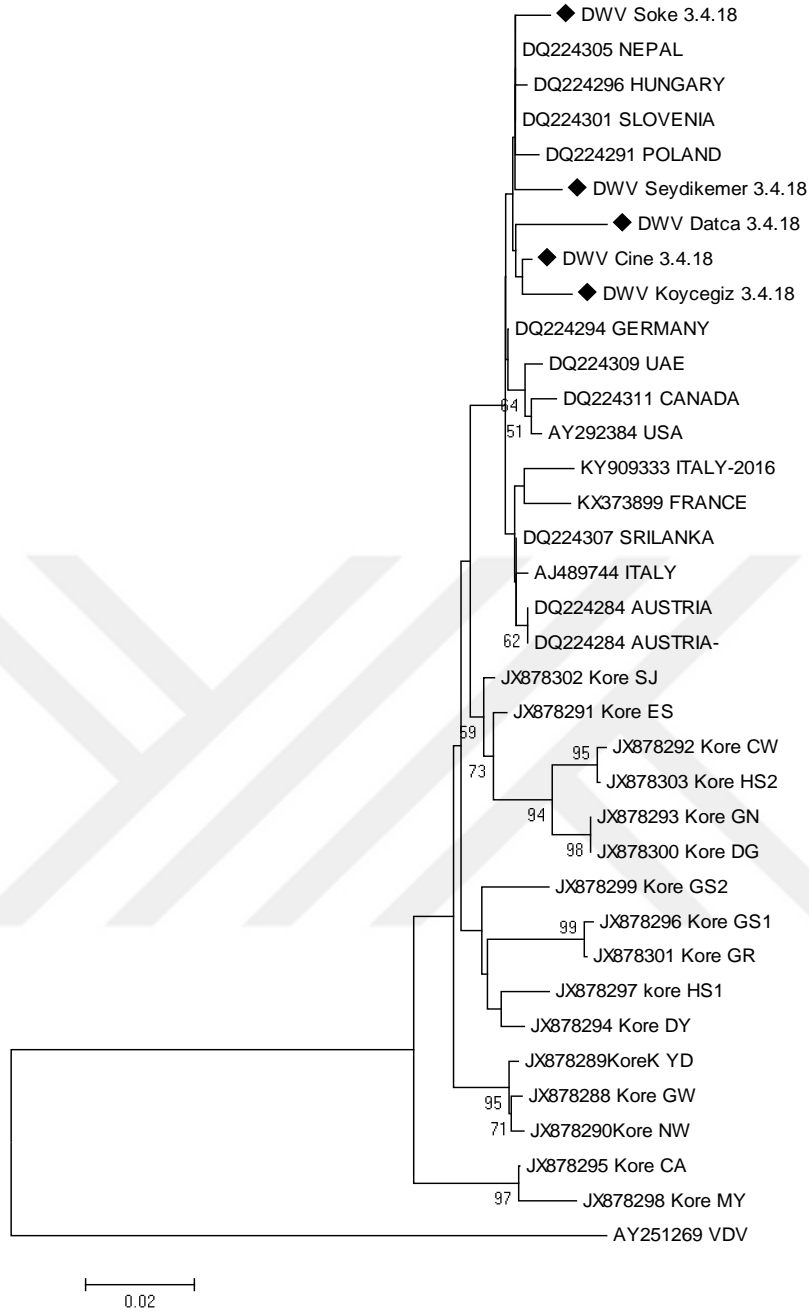
Ergin arı ve yavrulu petek örneklerinden BQCV pozitif olarak tespit edilen 23 örnekten 6'sına dizi analizi yapıldı. Dizi analizi sonucunda 383 bp' lik (6614-6996 arası) uzunluğunda bir bölgesinin dizisi elde edildi. Elde etmiş olduğumuz 6 BQCV' ye ait nükleotid dizisi (Ek-3) ve daha önceki çalışmalarda belirtilen, GenBank' tan elde edilmiş toplam 26 dizi kullanıldı. En iyi DNA/Protein modeli olarak T92+G model (Tamura-3) parametresi belirlendi (Tamura ve ark., 2013). Filogenetik yakınlıkları görebilmek amacıyla Neighbor-Joining metot kullanılarak Şekil-20' de bulunan ağaç oluşturuldu. Buna göre, BQCV' nin Türkiye izolatlarından Datça, Ödemiş, Karpuzlu, Çine ve Datça-2 izolatları birbirlerine % 97-98 benzerlik gösterirken, Köyceğiz izolatının diğer izolatlara benzerliği % 90-91 olarak tespit edildi. Diğer izolatlardan farklı olan Köyceğiz izolatı Polonya izolatlarına % 97, Macaristan ve Avusturya izolatlarına ise % 94 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi ve *A. mellifera*' dan tespit edilen Kore izolatına % 92' lik benzerlik gösterirken, diğer 5 izolatımız ise % 88 benzerlik gösterdi. Daha önce Hakkari' den elde edilen izolatın bu çalışmada tespit ettiğimiz 6 izolat ile benzerlik gösterdiği, *A. cerena*' dan elde edilen Kore izolatları ile başka bir kola ayrıldığı tespit edildi.

Ergin arı örneklerinden ABPV pozitif olarak tespit edilen 3 örnekten 2'sine dizi analizi yapıldı. Dizi analizi sonucunda kapsid proteine ait 796 bp' lik (8526-9323 arası) uzunluğunda bir gen bölgesinin dizisi elde edildi. Elde ettiğimiz 2 ABPV' ye ait nükleotid dizisi (Ek-4) ve daha önceki çalışmalarda belirtilen, GenBank' tan elde edilmiş toplam 14 dizi kullanıldı. Diziler MEGA 6 Software programı kullanılarak align edildi ve en iyi DNA/Protein modeli olarak T92+I model (Tamura-3) parametresi belirlendi (Tamura ve ark., 2013). Neighbor-Joining metod kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu (Şekil-21). Köyceğiz ve Fethiye' den tespit edilen ABPV izolatları birbirlerine % 99 benzerlik gösterirken, Avrupa izolatlarına % 97-98, Güney Afrika ve ABD izolatlarına % 94, Güney Amerika izolatları olan Şili, Brezilya ve Uruguay ise % 84-85 benzerlik göstermekte olduğu ve ayrı bir kola ayrıldığı belirlendi.

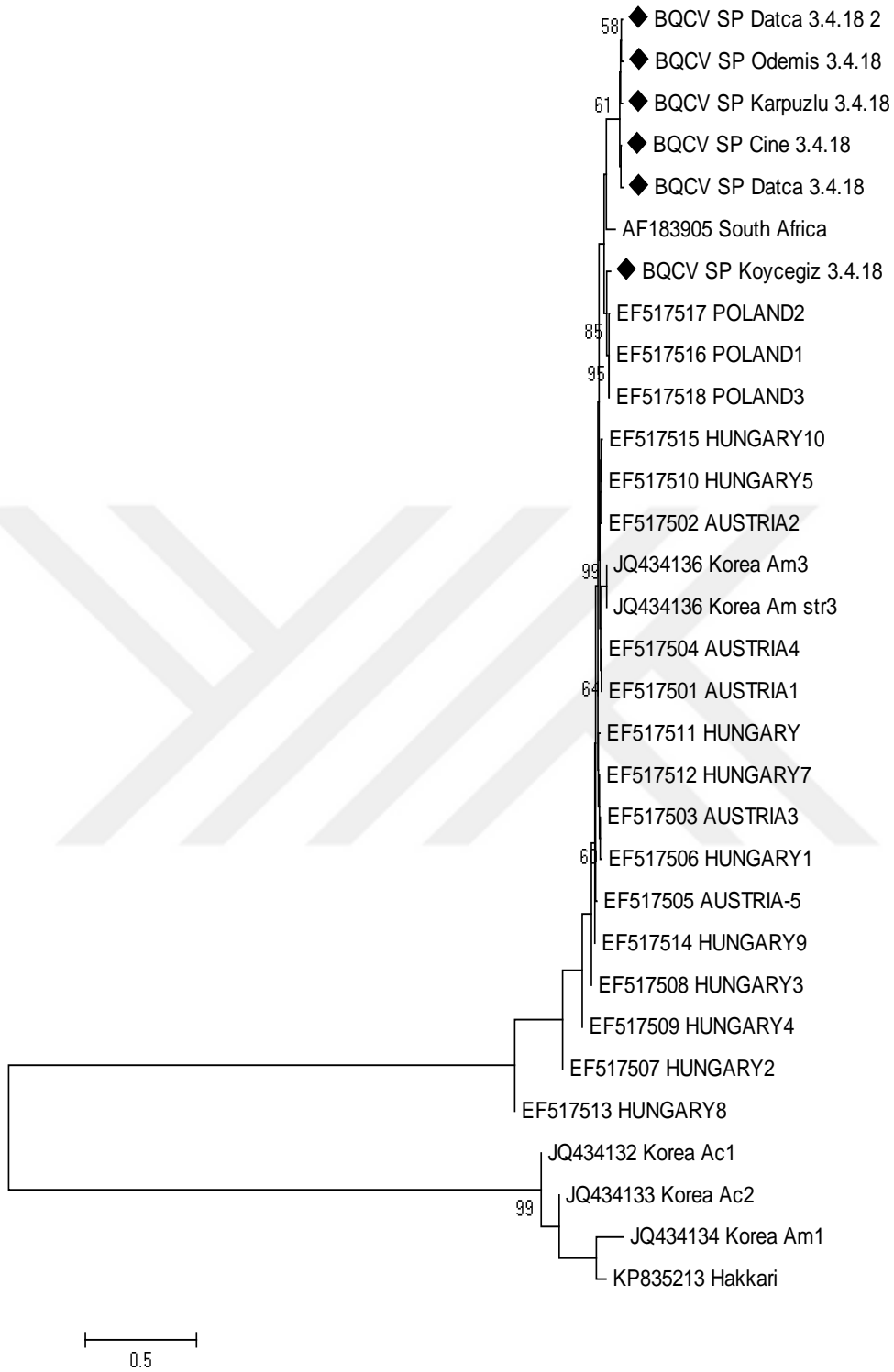
Ergin arı örneklerinden CBPV pozitif olarak tespit edilen 2 örneğe dizi analizi yapıldı. Dizi analizi sonucunda segmentli bir virus olan CBPV' nin RNA1 gen bölgesine ait 1293 bp' lik (1991-3283 arasında) uzunluğunda bir bölgesinin dizisi kullanıldı. Buna göre, 2 CBPV etkenine ait nükleotid dizileri (Ek-5) ve daha önceki çalışmalarda belirlenen, GenBank' tan elde edilmiş toplam 24 dizi kullanıldı. MEGA 6 Software programı kullanılarak bu diziler align edildi. En iyi DNA/Protein modeli olarak TN93+G

model (Tamura-3) parametresi belirlendi (Nei ve Kumar, 2000; Tamura ve ark., 2013). Neighbor-Joining metod ile oluşturulan filogenetik ağaç Şekil-22' de gösterilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz 2 CBPV izolatının birbirlerine % 97 benzerlik gösterdiği, Avrupa izolatlarına ise % 86-87 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. Güney Amerika izolatı olan Uruguay izolatı Avrupa izolatları ile yakın olmasına karşın, elde ettiğimiz 2 izolat ile % 86 oranında benzerlik gösterdi.

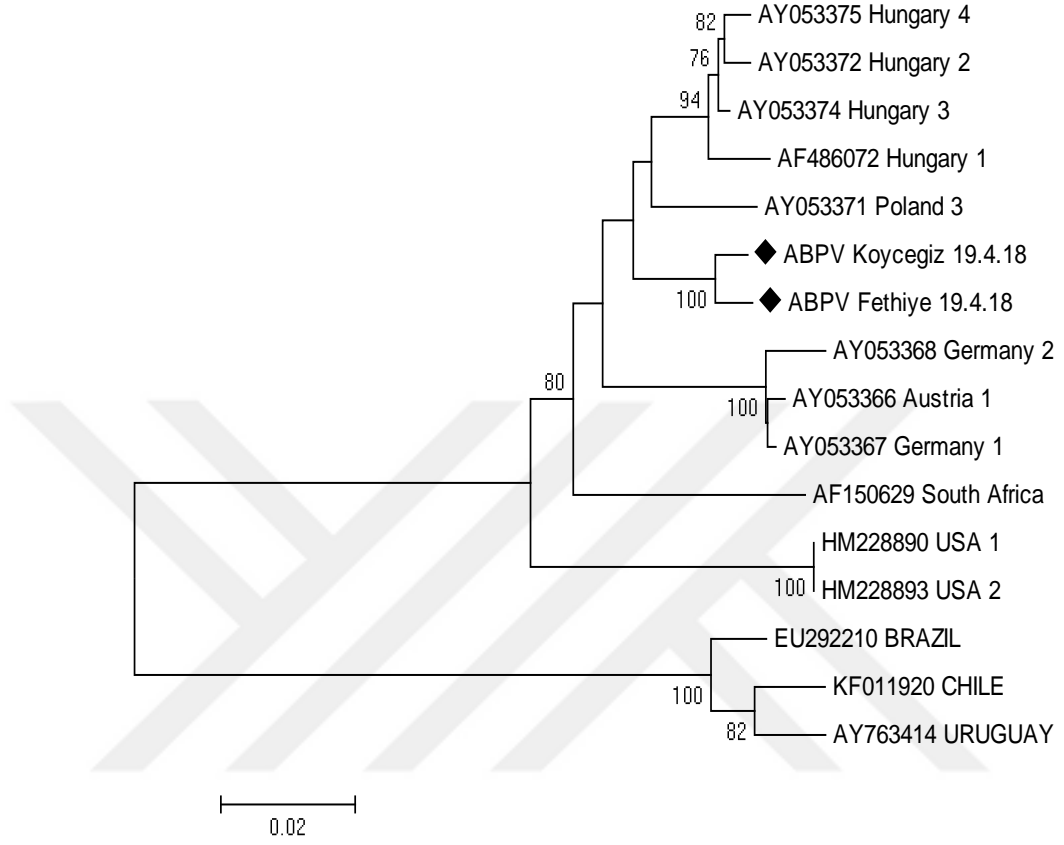
Ergin arı örneklerinden SBV pozitif olarak tespit edilen 3 örneğe dizi analizi yapıldı. Dizi analizi sonucunda 317 bp' lik (327-643 arası) uzunluğundaki bir bölgesinin dizisi elde edildi. Buna göre, 3 SBV etkenine ait nükleotid dizileri (Ek-6) ve daha önceki çalışmalarda belirtilen, GenBank' tan elde edilmiş toplam 45 dizi kullanıldı. En iyi DNA/Protein modeli olarak T92+I model, Tamura-3 parametresi belirlendi (Tamura ve ark., 2013). Filogenetik ağaç Maximum Likelihood (ML) metodu kullanılarak oluşturuldu (Şekil-23). Elde ettiğimiz 3 SBV izolatı ve daha önceki çalışmalarda elde edilen SBV izolatlarına % 98-99 benzerlik gösterdi. Türkiye SBV izolatları Avrupa izolatları ile %90-91, Kore izolatları ile %88-89 benzerlik gösterdi. Hem bu çalışmada elde ettiğimiz 3 SBV izolatı hem daha önce tespit edilen 4 Türkiye SBV izolatı farklı bir kola ayrılmıştır.



**Şekil 19.** DWV' nin helikaz gen bölgesine göre filogenetik ağacı (Neighbour-Joining metodu-Tamura 3 parametresi, 1000 tekrarlı)

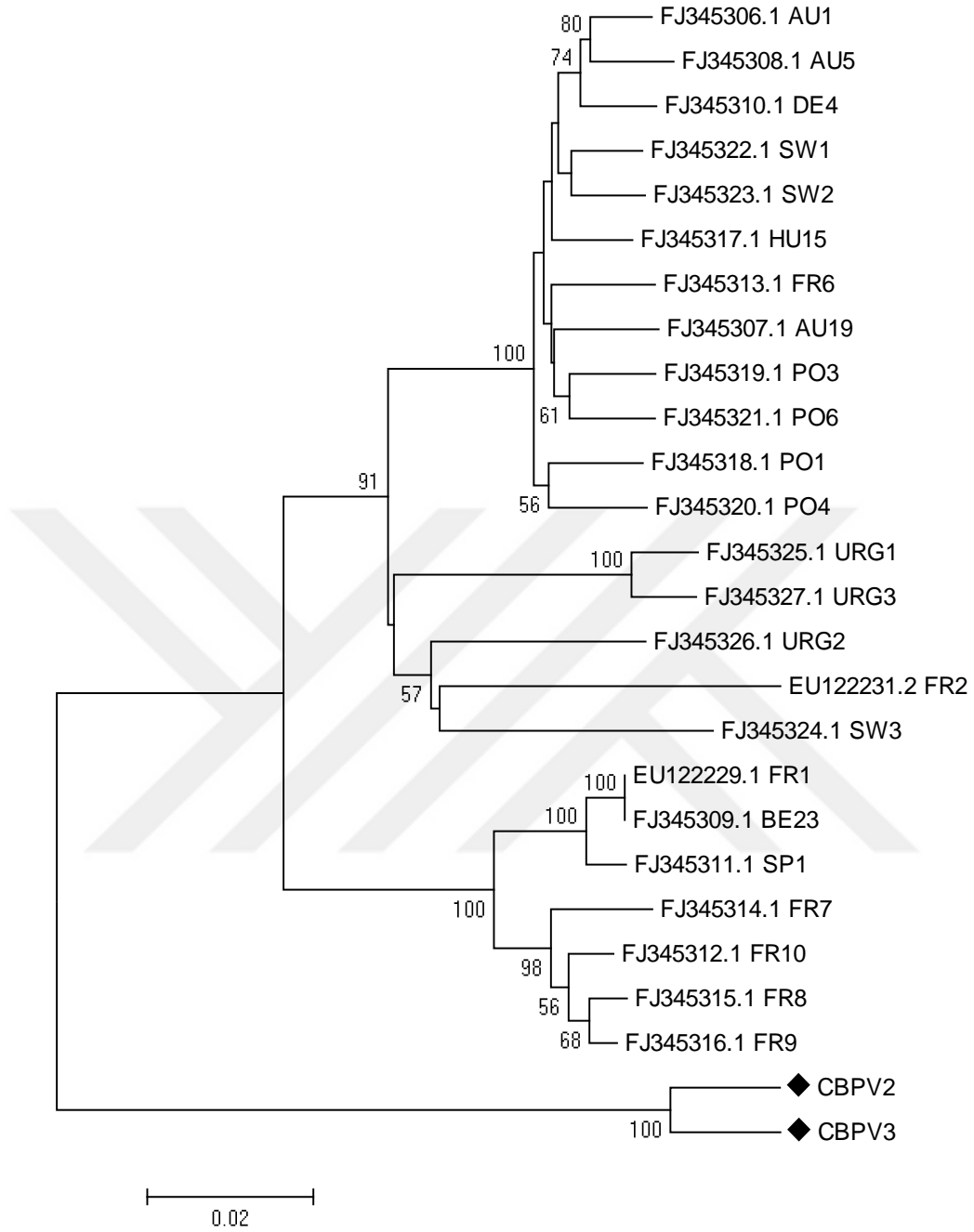


**Şekil 20.** BQCV' nin yapısal proteini sentezleyen gen bölgesine göre filogenetik ağacı (Neighbour- Joining metodu-Tamura 3 parametresi, 1000 tekrarlı)

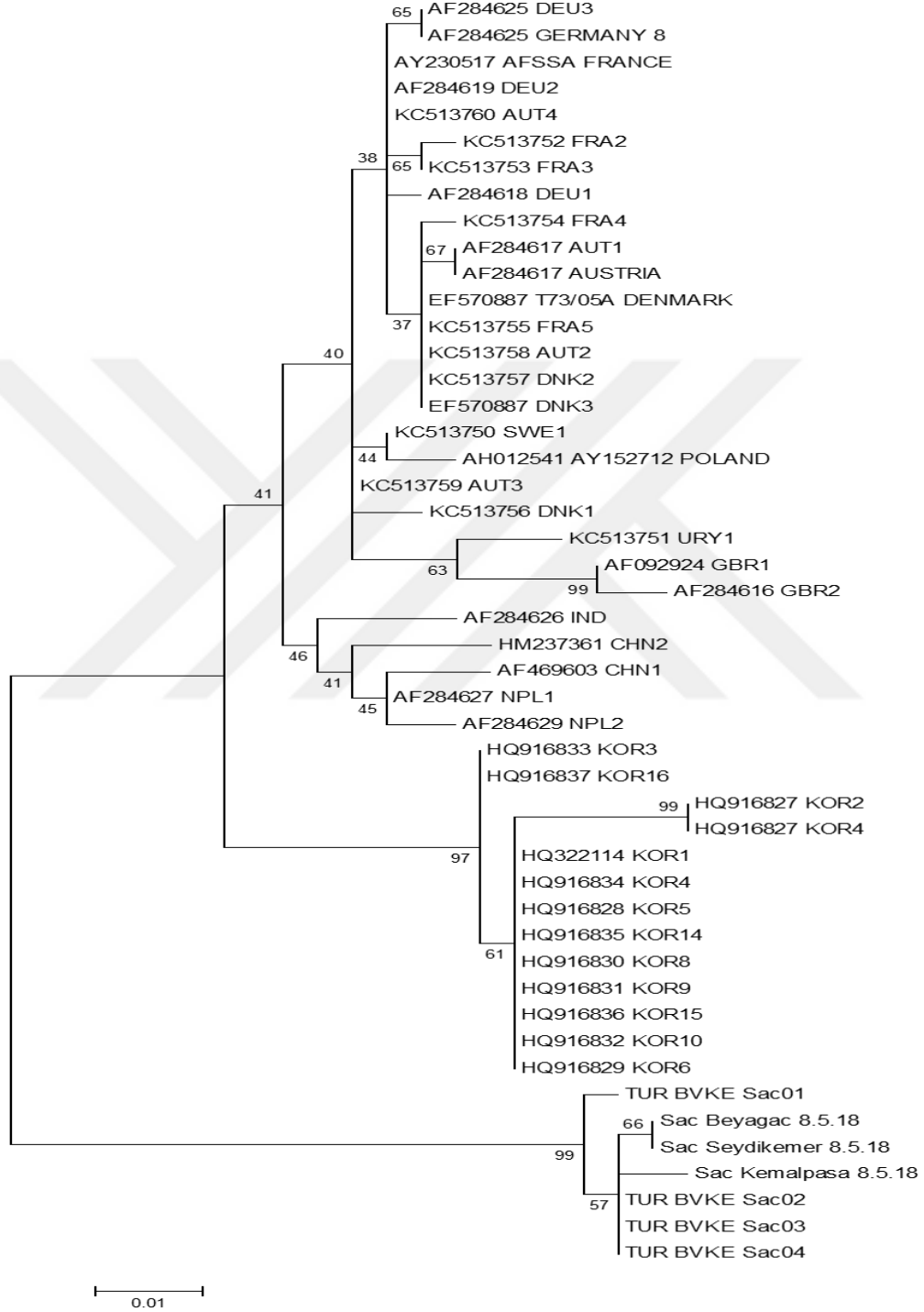


**Şekil 21.** ABPV' nin kapsid proteinini kodlayan gen bölgesine göre filogenetik ağacı (Neighbour-Joining metodu-Tamura 3 parametresi, 1000 tekrarlı)





**Şekil 22.** CBPV' nin RNA1 gen bölgesine göre filogenetik ağacı (Neighbour-Joining metodu-Tamura 3 parametresi, 1000 tekrarlı)



**Şekil 23.** SBV' nin poliprotein sentezleyen gen bölgesine göre filogenetik ağacı (Maximum-Likelihood-Tamura 3 parametresi, 1000 tekrarlı)

## 5. TARTIŞMA

Günümüzde Avrupa ülkelerinde toplam 13 milyon koloni bulunmakta ve bu kolonilerden 220 bin ton bal elde edilmektedir (Chauzat ve ark., 2013). Türkiye 7 milyon 486 bin 621 koloni ve 107 bin ton bal üretimi ile dünyada koloni sayısı bakımından üçüncü, bal üretimi açısından ise ikinci sırada yer almaktadır (Doğanay ve Girişken, 2017). Türkiye gerek arı koloni varlığı gerekse bal üretimi yönünden Avrupa ülkelerinin toplam koloni sayısı ve bal üretiminin yarısını tek başına karşılamaktadır. Bu durum ülkemizde yaygın bir arıcılık faaliyetinin olduğunu göstermektedir. Bu araştırmanın gerçekleştirildiği Ege Bölgesi ise 1 milyon 681 bin 838 koloni ve 12.108 işletme yıllık 26000 ton bal üretimi ile ülke kovan ve bal üretim miktarının ortalama 1/4' ünü karşılamaktadır; bu veriler arı ve arı ürünleri bakımından Ege bölgesinin önemini işaret etmektedir (TÜİK, 2015). Yapılan bu çalışma ile ülke arıcılık faaliyetlerinde önemli bir yer oluşturan ve Ege bölgesinde yer alan illerdeki arı kolonilerinde zararlara neden olan önemli yedi arı virusunun moleküler epidemiyolojisinin belirlenmesi amacıyla dünyada ilk olarak yedi virus için mRT-PCR yöntemi tasarlandı, optimize edildi ve bu epidemiyolojik çalışmada kullanıldı.

Günümüzde arı viral hastalıklarının teşhisinde AGID, ELISA, EM, WB ve PCR gibi farklı teşhis metotları kullanılmaktadır. Bu testlerin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. AGID, WB ile karşılaştırıldığında daha az duyarlı olmasına rağmen daha ekonomik, kolay ve hızlıdır (Ribiere ve ark., 2000). EM ve WB laboratuvar araç-gereç gerektiren ve rutin teşhis için zaman açısından dezavantaj oluşturan testlerdir. EM için deneyimli personel gereklidir. Ayrıca spesifitesi düşüktür ve bal arısı viruslarının birbirine benzemesinden dolayı EM ile ayırt edilmeleri zordur. ELISA ise moleküler teşhis yöntemlerine kıyasla daha az duyarlıdır (Sguazza ve ark., 2013).

Stoltz ve ark. (1995) Kaşmir arı virusunun tespiti için spesifik RT-PCR metodu geliştirdikten sonra moleküler temelli yöntemler daha sık kullanılmaktadır.

PCR, diğer teşhis metotları ile karşılaştırıldığında yüksek spesifite ve sensitiviteye sahip olması ve daha kolay uygulanabilir olması nedeni ile daha avantajlı bir teşhis yöntemi olarak kabul edilmektedir. sRT-PCR her etken için farklı reaksiyon gerektirdiğinden, daha fazla maliyet ve uzun sürelere ihtiyaç duyar. Son yıllarda eş zamanlı, hızlı ve ekonomik sonuçlar alabilmek amacıyla başvurulmuş önemli teşhis

yöntemlerinden birisi mRT-PCR' dır. mRT-PCR yöntemlerimin geliştirilmesi, optimize edilmesi üzerine çalışmalar devam etmektedir. Bu yöntem virolojide diğer türlere ait virusların teşhisi içinde kullanılmaktadır (Yin ve ark., 2012; Piewbang ve ark., 2016; He ve ark., 2017; Wang ve ark., 2017).

Yin ve ark. (2012) domuzların solunum yolları hastalıklarına sebep olan viruslarda yaptıkları çalışmada, log<sub>10</sub> tabanlı seri dilüsyonlarında 10<sup>-3</sup>' e kadar etkenleri tespit etmişlerdir.

Piewbang ve ark. (2016) köpeklerin solunum yolu viruslarında yaptıkları dörtlü mRT-PCR çalışmasında simpleks ve multipleks PCR sonuçlarının birbiri ile aynı tespit limitlerine sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Yine yakın zamanda ördeklerde yapılan altılı mRT-PCR çalışmasında log<sub>10</sub> tabanlı seri dilüsyonları yapılmış ve 10<sup>-6</sup>' ya kadar pozitiflik bulunmuştur (Wang ve ark., 2017).

He ve ark. (2017) küçük ruminantlarda enfeksiyon oluşturan Mavi dil virusu, Koyun-Keçi vebası virusu, Şap virusu, Keçi çiçeği virusu, Koyun çiçeği virusu ve orf virusu gibi bazı DNA ve RNA viruslarını aynı anda teşhis edebilen mRT-PCR geliştirmişlerdir. Aynı araştırmacı grubu bu yöntemi kullanarak aynı anda birden fazla etkeni 100 pg' ye kadar tespit edebildiklerini bildirmiştir.

Chen ve ark. (2004c) BQCV, DWV, KBV ve SBV teşhisinde dörtlü; Topley ve ark. (2005) ABPV, SBV ve BQCV teşhisinde üçlü; Grabensteiner ve ark. (2007) ABPV, BQCV ve SBV için üçlü; ve son olarak Sguazzo ve ark. (2013) IAPV, SBV, DWV, BQCV, ABPV ve CBPV teşhisinde altılı mRT-PCR teşhis metodu geliştirmişlerdir.

Chen ve ark. (2004c) sPCR ve üç virus için geliştirilen mRT-PCR teşhis metodları arasında fark olmadığını; ancak bant kalınlıkları arasında farklılıklar olduğunu, bunun aynı anda var olan virusların konsantrasyonlarından veya virusların rekabetinden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Topley ve ark. (2005) rastgele olarak seçilen ABPV, SBV, BQCV ve sağlıklı bireylerden oluşan 40 örneği mRT-PCR ile test etmiştir. Saha çalışmaları ile desteklenen bu çalışma mRT-PCR' ın arı viruslarını tekli, ikili veya üçlü şekilde başarı ile test ettiğini göstermiştir.

Grabensteiner ve ark. (2007) enfekte arılardan elde edilen RNA ekstraktlarının 10<sup>4</sup> katlı dilüsyonlarında etkeni tespit edebilmişlerdir. Bunu teorik olarak birkaç yüz

arıdan oluşan havuzda tek bir arının dahi enfekte olmasının teşhis için yeterli olabileceğini bildirmişlerdir.

Sguazzo ve ark. (2013) tarafından geliştirilen altılı mRT-PCR metodunda  $10^5$  katlı dilüsyonlarında viral nükleik asidi tespit etmişlerdir. Yüz yetmiş materyalle yapılan bu çalışmada sRT-PCR ile mRT-PCR arasında fark olmadığı tespit edilmiştir.

Bu doktora tez araştırmasında, IAPV, DWV, SBV, ABPV, BQCV, KBV ve CBPV olmak üzere 7 önemli bal arısı virusunun eş zamanlı olarak teşhisi hedeflenmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmasında Henegariu ve ark., (1997)'nin kullanmış olduğu yöntemlerden yararlanılmıştır.

Çalışmada yapılan  $\log_{10}$  tabanlı seri dilüsyonlarında  $10^{-6}$ 'ya kadar yedili bantlar saptanmıştır (Şekil-17). Tespit limit  $\mu\text{l}$ 'de 2500 kopya olarak belirlenmiş, sRT-PCR ile benzer sonuçlar vermiştir. Yapmış olduğumuz mRT-PCR testinin yukarıda belirtilen bazı testlerden daha duyarlı olduğu, moleküler epidemiyolojik ve rutin teşhis çalışmalarında kullanılabileceği düşünülmektedir.

Geçmişten günümüze bal arısı viruslarının moleküler teşhis ve prevalans çalışmaları üzerine bir çok araştırma yapılmıştır (Tentcheva ve ark., 2004; Berenyi ve ark., 2006; Nielsen ve ark., 2007; Baker ve ark., 2008; Forgach ve ark., 2008; Gümüsova ve ark., 2010; Ryba ve ark., 2012; Rodriguez ve ark., 2014; Gajger ve ark., 2015).

Yapılan çalışmalarda Fransa, Avusturya, Macaristan ve Hırvatistan'ın aralarında yer aldığı Batı ve Orta Avrupa ülkelerinde DWV için yüksek prevalans bildirilmiştir (Tentcheva ve ark., 2004; Berenyi ve ark., 2006; Baker ve Schroeder; 2008; Forgach ve ark., 2008; Gajyer ve ark., 2014). Shumkova ve ark (2018) Bulgaristan'da Molieri ve ark (2017) ise Arjantin'de DWV için düşük prevalans değerleri bildirmişlerdir.

Bu tez çalışmasında DWV prevalansı % 25.2 olarak tespit edilmiştir ve bu prevalans geçmişte yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında daha düşüktür. Bu sonucun en önemli nedeni, prevalansın yüksek bulunduğu çalışmalarda örneklemin hastalık belirtisi görülen veya koloni kaybının yaşandığı işletmelerden, prevalansın düşük olduğu çalışmalarda ise örneklemin tesadüfi örnekleme ile yapılmasından kaynaklandığını düşündürmektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar DWV prevalansının en yüksek % 50 oranı ile Kütahya olduğunu göstermektedir. DWV prevalansı İzmir, Muğla ve Aydın illeri için

sırasıyla % 33, % 29 ve % 22 olarak belirlenmiştir. Prevalansın Kütahya ilinde yüksek çıkma nedeni orantısal olarak hesaplanan örnek sayısının iki olarak belirlenmesi ve örneklerden birisinin pozitif olması ile açıklanabileceği belirtilmiştir. İzmir, Muğla, Aydın illeri gezginci arı faaliyetlerinin sık olarak yapıldığı ve arı koloni yoğunluğunun en fazla olduğu illerdir. İzmir ilinde diğer illere göre prevalansın daha yüksek olmasının nedenlerinden biri gezginci arı faaliyetleri olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanısıra DWV' nin Varroa ile bulaşma yolu düşünüldüğünde, örnekleme yapılan bazı işletmelerde Varroa enfestasyonları ve onunla yeterli mücadelenin yapılmaması diğer önemli bir neden olarak yorumlanabilir.

Bu çalışmada elde edilen Çine, Söke, Datça, Köyceğiz ve Seydikemer olarak isimlendirilen beş DWV izolatının helikaz genini kodlayan bölge hedeflenerek sekans ve filogenetik analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan dizi analizi sonuçlarına göre bu izolatlar kendi aralarında % 98-99; Avrupa izolatları arasında yer alan Polonya, Slovenya ve Macaristan izolatları ile % 97-99 ve Kore izolatları ile % 93-98 oranında nükleotit benzerliği göstermektedir. Bu sonuçlar Berenyi ve ark. (2007) ile Reddy ve ark. (2013) tarafından bildirilen sonuçlar ile uyumludur. Buna göre Kore izolatları ve Avrupa izolatları birbirinden ayrı kollara ayrılmıştır. DWV için yapısal protein ve RNA bağımlı RNA polimeraz enzimini kodlayan gen bölgeleri esas alınarak yapılmış olan çeşitli filogenetik analizi çalışmaları bulunmaktadır (Berenyi ve ark., 2007; Yang ve ark., 2013; Karapınar ve ark., 2018; Shumkova ve ark., 2018). Yang ve ark. (2013) ABD, Japonya ve Çin izolatları arasındaki ayrılmaları göstermişlerdir. Karapınar ve ark. (2018) Türkiye izolatlarına İngiltere, Danimarka ve İtalya izolatları ile %98-100 benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Daha önce yapılan çalışmalarda gerek Türkiye gerekse Avrupa ülkelerinde BQCV varlığı yaygın olarak tespit edilmiştir (Tentcheva ve ark., 2004; Forgach ve ark., 2008; Welch ve ark., 2008; Tozkar ve ark., 2015). Bu çalışmada BQCV, % 20,7 prevalans ile işletmelerde tespit edilen ikinci en yaygın virus olmuştur. Gümüşova ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada Karadeniz Bölgesi' nde 28 işletmeden rastgele örnekleme sonucunda BQCV prevalansını % 21.42 olarak bildirmişlerdir. Rodriguez ve ark. (2012) büyük koloni kayıplarının yaşandığı 2010 yılı ilkbahar mevsiminde 21 işletmede prevalansın % 82 olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacı grubu sonraki yıllarda rastgele örnekleme ile 60 işletmede yaptıkları araştırmada BQCV prevalansını % 10 olarak

bildirilmiştir (Rodriguez ve ark., 2014). Rastgele örnekleme sonucu gerçekleştirilen diğer bir çalışma Bulgaristan’ da gerçekleştirilmiş ve benzer sonuçlar tespit edilmiştir (Shumkova ve ark., 2018). Çalışmamızda Aydın, İzmir, Muğla illerinde bulunan arıcılık işletmelerinde BQCV prevalans oranları sırasıyla % 38, % 23, % 20 olarak belirlenmiştir. Aydın İlinde diğer iki ile göre prevalansın yüksek çıkmasının sebebi, Aydın ilinden alınan örneklerdeki Nosema varlığı ile ilişkilendirilebilir.

Bu çalışmada BCQV yapısal proteini sentezleyen gen bölgesine göre sekans ve filegenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Çine, Datça (2), Köyceğiz, Karpuzlu ve Ödemiş olarak isimlendirilen altı adet BQCV izolatı elde edilmiştir. Bu izolatlardan Köyceğiz izolatı hariç % 97-99 oranında nükleotit benzerliği belirlendi. Köyceğiz izolatı, bu çalışmada elde edilen BCQV izolatlar ile % 89, Kore izolatları ile % 88-90, Avrupa izolatları arasında yer alan Polonya izolatları ile % 97, Macaristan ve Avusturya izolatları ile % 94 benzerlik göstermektedir. Köyceğiz izolatı ile Kore ve Avrupa izolatlarının farklı grup oluşturduğu görülmektedir. BCQV ile ilgili filogenetik analiz incelediğinde, Kore Am str3 izolatı Avrupa izolatı ile aynı grupta yer alırken, Hakkari izolatı ise (GenBank Acc. No. KP835213) Kore izolatları ile aynı grupta yer almaktadır. Bunun sebebinin farklı ülkelerden ana arı temini, Şap hastalığı gibi Picornaviridae ailesinde yer alan virusların farklı genotipleri ile rekombinasyon yapabilme olasılığı düşünülmektedir (Tapastzi ve ark., 2009; Noh ve ark., 2012). Kore Am str3 ve Hakkari izolatına ek olarak Polonya izolatlarından bir tanesinin de benzer şekilde farklı kola ayrılması yine aynı şekilde açıklanmaktadır (Tapastzi ve ark., 2009). Ülkemizde Karapınar ve ark. (2018) yapmış oldukları bir çalışmada Avrupa izolatları ile Kore, Çin, Japonya ve Tayland gibi Asya izolatları arasında yukarıda bahsedilen şekilde farklılıklar tespit etmemişler, ancak Hakkari izolatı bizim çalışmamıza benzer şekilde ayrı kola ayrılmıştır.

Çalışmada SBV yalnızca 3 işletmede ve sadece ergin arılarda bulunmuştur. Geçmiş yıllarda Avrupa’ da yapılan bazı çalışmalarda SBV prevalansı yüksek tespit edilmiştir (Tenctheva ve ark., 2004; Berenyi ve ark., 2006; Nielsen ve ark., 2008; Gayger ve ark., 2014). Bu çalışmada SBV prevalansı % 2.7 olarak bulunmuştur. Forgach ve ark. (2008) 52 işletmenin % 2’ sinde, Baker ve Schroeder (2008) ise 23 işletmenin % 1.4’ ünde pozitiflik tespit etmişler ve yaptığımız bu çalışmaya benzer sonuçlar tespit etmişlerdir. Bunun sebebi olarak örneklemenin yapıldığı mevsimsel farklılıkların, arılarda SBV enfeksiyonuna karşı olan duyarlılığı artırabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda Denizli, Muğla ve İzmir' den 1' er işletme pozitif olarak tespit edilmiştir. Aydın örneklerinin Mart ayında, Denizli ve Muğla örneklerinin ise Nisan ayının son haftası ile Mayıs ayının ilk haftaları arasında temin edilmesi yani mevsimsel farklılıklar olarak düşünülebilir. Bunun yanısıra tespit edilebilecek etken miktarı, etkenin aktif olması gibi faktörlerin de önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

Çalışmada tespit ettiğimiz 3 izolat, daha önce BVKE viroloji laboratuvarında elde edilen 4 izolatın nükleotit dizileri (NCBI Access. Num.: MH251271, MH251272, MH251273, MH251274) ile % 99 oranında benzerlik göstermektedir. Bu izolatların Avrupa izolatları nükleotit dizileriyle % 89-90, Kore izolatlarıyla ise % 87-88 benzerlikleri bulunmaktadır. SBV' nin nükleotid dizilimleri ve genetik çeşitlilikleri farklı ülkelerden orijin alan izolatlarla daha önceki çalışmalarda ele alınmıştır (Grabensteiner ve ark., 2001; Kukielka and Sanchez-Vizcaino, 2009; Choe ve ark., 2012; Blanchard ve ark., 2014). Grabensteiner ve ark. (2001) Avrupa, Uzak Doğu ve Güney Afrika genotipleri olmak üzere üç farklı grubun varlığını bildirmiştir. Yine yapılan başka bir çalışmada Kukielka ve Sanchez-Vizcaino (2009) İspanya, Fransa ve Avusturya izolatlarının olduğu Avrupa genotipi; Uruguay ve Birleşik Krallığın bulunduğu farklı bir genotip ve Çin izolatlarının bulunduğu Çin genotipi olmak üzere üç farklı genotip olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında genotiplendirme Blanchard ve ark. (2014) referans alınarak yapılmıştır. Buna göre; Fransa, Almanya, İsveç, Danimarka, Britanya ve Uruguay izolatları Avrupa-Güney Amerika genotipini, Çin, Nepal ve Hindistan izolatları Asya genotipini ve Kore izolatları da Kore genotipini oluşturmaktadır. Ancak, Türkiye izolatları daha önce yapılan çalışmalardaki genotiplere uymamış, filogenetik ağaçta tamamen farklı bir kol olarak ortaya çıkmış ve ayrı bir grubu oluşturmuştur.

ABPV Türkiye' de daha öncede tespit edilmiştir (Rüstemoğlu ve ark., 2016). Avrupa' da yapılan çalışmalarda da etkene sıklıkla rastlanmaktadır (Bakonyi ve ark., 2002; Tentcheva ve ark., 2004; Berenyi ve ark., 2006; Baker ve Schroeder ve ark., 2008; Forgach ve ark., 2008; Nielsen ve ark., 2008; Gayger ve ark., 2014; Shumkova ve ark., 2018). Bu çalışmada ABPV prevalansı % 3.6 olarak bulunmuştur. Gümüşova ve ark. (2010)' nın Karadeniz Bölgesi' nde yapmış oldukları çalışmada etken tespit edilmemiştir. Bunun sebebi olarak Varroa enfestasyonları ve gezginci arıcılık faaliyetleri olarak düşünülmektedir.



Tespit ettiğimiz ABPV izolatlarının nükleotit dizileri % 99 oranında benzer tespit edilmiştir. Bakonyi ve ark., (2002) Almanya ve Avusturya izolatlarının bir grup, Macaristan izolatının bir grup oluşturduğunu belirtirken, Polonya izolatlarının değişkenlik gösterdiklerini belirtmişlerdir. Bu çalışmada filogenetik gruplandırma Rodriguez ve ark. (2014) referans alınarak yapılmıştır. Türk izolatları Avrupa izolatlarının arasında ayrı bir grup oluşturmuştur.

CBPV prevalansı daha önce ülkemizde yapılan çalışmalarda % 25 olarak tespit edilmiştir (Gümüsova ve ark., 2010). Bu çalışmada ise Ege Bölgesi prevalansı % 1,8 olarak bulunmuştur. Bunun sebebi olarak, etkenin sağlıklı kolonilerde tespit edilemeyecek düzeyde bulunabileceği düşünülmektedir. Tentcheva ve ark. (2004) ergin arılarda prevalansı % 28 olarak bulmalarına rağmen larva ve pupalarda etkeni tespit etmemişlerdir. Forgach ve ark. (2008) Macaristan’ da 52 işletmede etkeni tespit edememişlerdir. Yine Avrupa’ da yapılan çalışmalarda etkenin prevalansının düşük olduğu görülmekte (Berenyi ve ark., 2006; Nielsen ve ark., 2008; Gajger ve ark., 2014) yapmış olduğumuz çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Tespit ettiğimiz 2 CBPV izolatının nükleotit dizileri birbirlerine % 97 oranında benzerdir. Blanchard ve ark. (2009) farklı ülkelerden elde ettikleri izolatları A, B, C, D olarak gruplandırmışlardır. A grubu Fransa, İspanya ve Belçika, B grubu Polonya, Avusturya, Danimarka, Macaristan, İsviçre ve birkaç Fransa, C grubu Uruguay, D grubu ise yine Fransa, İsviçre ve Uruguay olarak sınıflandırılmıştır. Aynı ülkeden tespit edilen izolatlar arasında bile benzerlik oranının düşük olduğu bildirilmiştir. Türkiye izolatları diğer izolatlardan başka bir kola ayrılmıştır ve diğerleri ile % 83-85 benzerlik göstermektedir. Bu durum CBPV’ nin segmentli bir virus olması ve genetik değişiklikler ile açıklanabilir.

Çalışmada KBV ve IAPV tespit edilmemiştir. Türkiye’de Tozkar ve ark., (2015) daha önce yaptıkları çalışmada KBV tespit edemediklerini bildirirken, Özkırım ve Schiesser (2013) ise 71 işletmenin 10’ nunda IAPV tespit etmişlerdir. Her iki virus Amerika ve Avusturalya’ da sık olarak tespit edilmiştir (Allen ve Ball, 1996). Yapılan çalışmalarda Fransa ve Danimarka’ da KBV bildirilmiş (Tentcheva ve ark., 2004; Nielsen ve ark., 2008) Avusturya, Macaristan ve Hırvatistan’ da ise KBV varlığı tespit edilmemiştir (Berenyi ve ark., 2006; Forgach ve ark., 2008; Gajger ve ark., 2014). Bu

nedenle KBV' nin Avrupa için ekzotik olabileceği düşünülmektedir (Berenyi ve ark., 2006).

Bal arısı viruslarında miks enfeksiyonlar sıklıkla tespit edilmektedir (Tentcheva ve ark., 2004; Berenyi ve ark., 2006; Forgach ve ark., 2008; Nielsen ve ark., 2008). Çalışmamızda iki ve üç virusun aynı anda tespit edildiği arı kolonileri bulunmaktadır. En çok bir arada görülen etkenler BQCV ve DWV' dir . Muğla ilinde bulunan bir işletmede SBV, DWV ve BQCV içinde yer aldığı enfeksiyon tespit edilmiştir. İki virus ile ortak enfeksiyon Muğla ili dört, İzmir ili iki, Aydın ili iki toplam 8 işletmede DWV ve BQCV, İzmir ilinde bir işletmede ABPV ve BQCV, Muğla ilinde bir işletmede ise ABPV ve CBPV hastalıklarının birlikte seyrettiği tespit edilmiştir.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ülkemizde arıcılığın ve arı sağlığının önemi gün geçtikçe artmaktadır. Bununla birlikte arılarda gözlemlenen hızlı koloni kayıpları ve sebebi bilinmeyen ölüm oranları artış göstermektedir. Ani koloni kayıpları yaşandığında hızlı, ekonomik ve güvenilir sonucun üreticiye iletilmesi önem arz etmektedir. Bu araştırmada yedi önemli arı virusu için spesifik ve duyarlı olan mRT-PCR testinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yedi virusa karşı geliştirilen yöntemin duyarlılığı yüksektir. Özellikle rutin analizlerde ve epidemiyolojik taramalarda kullanılması maliyet, işgücü ve zaman tasarrufu sağlaması açısından avantaj oluşturmaktadır. Araştırmamızda, bu yeni moleküler yöntem ilk defa kullanılarak Ege Bölgesi arı kolonilerinde yedi viral etkenin araştırılması yapılmıştır. Araştırma sonucunda bölgede yer alan arıcılık işletmelerinde DWV(%25.2), BQCV(%20.7), SBV(%2.7), ABPV(%3.6) ve CBPV(%1.8) etkenleri identifiye edilirken, IAPV ve KBV ise tespit edilmemiştir.

Bu araştırmada identifiye edilen beş arı virusunun filogenetik analizi yapılarak benzerlikleri incelenmiştir. Arı işletmeleri ve bal üretimi açısından önemli olan Ege Bölgesi arı işletmelerinde görülen viral enfeksiyonların güncel durum bilgilerini vermesi açısından bu araştırma önemlidir. Dünyada arı koloni ve bal üretimi açısından önemli bir yere sahip olan ülkemizde IAPV ve KBV tespit edilmemesi önemli bir sonuçtur.

Yedi önemli arı virusuna karşı geliştirilen bu metodun saha taramalarında kullanılması için rutin teşhiste yer alması tez sonuçları açısından bir kazanım olacaktır. Günümüzde bal ve bal ürünlerinin insan sağlığı üzerine etkileri üzerine araştırmalar yoğun olarak devam etmektedir. Ayrıca arıların polenizasyon ile doğal bitki florasının korunmasına büyük etkiler yapmaktadır. Bu nedenle sağlıklı arı ve kolonilerin bulunması gerek insan sağlığı gerekse doğal yaşam için önemlidir. Sağlıklı arı ve arı kolonilerin elde edilmesinde önemli kriterlerinden birisi viral etkenlerden arı olmalarıdır. Bu nedenle arı viral hastalıklarından korunmanın en önemli kriterleri arasından bu viral etkenlerin süratli olarak teşhis edilmesi ve korunma tedbirlerinin alınması mutlaka olmalıdır. Yukarıda da bahsedildiği gibi, bir virus türünde genetik farklılıklar oluşabilmektedir. Bal arısı viruslarının tamamına yakınının da RNA virusu olduğu, CBPV gibi sınıflandırılmayan türlerin ve İsrail akut arı felci, Lake Sinai Virus gibi yeni türlerin ortaya çıktığı düşünüldüğünde filogenetik analizlerin değerlendirilmesindeki önem ortaya çıkmaktadır.

Bu araştırma sonucunda elde edilen bilgiler ışığında önerilerimiz aşağıda maddeler olarak sunulmuştur:

1. Bal arısı viruslarının teşhisinde mRT-PCR' ın daha ileri çalışmaları yapılarak, daha ekonomik ve hızlı mRT-PCR kit çalışmaları yapılmalıdır.
2. Bal arısı viruslarının çoğu Nosema ve Varroa gibi parazitler ile bulaştığı için kolonilerde parazit taraması ve parazit mücadelesi etkin bir şekilde yapılmalıdır.
3. Etkin tarama programları sadece viral etkenler için değil, aynı zamanda paraziter etkenler için de yapılmalıdır. Tarama programları sonucunda, etkin ve programlı anti-paraziter ilaçlama çalışmaları uygulanmalıdır. İlaçlamanın aynı anda yapılması yetkililerce sağlanmalıdır.
4. Parazitlere ve viral etkenlere dirençli arı ırkları kullanılması ve geliştirilmesi gerekmektedir.
5. Güçlü ve dirençli koloniler için beslenme koşulları iyi olmalıdır.
6. Sanitasyon kurallarına uyulmalı, kovanlar ve alet-ekipmanlar kullanılmadan önce temizlikleri yapılmalıdır.
7. Arıcılık faaliyetini yürüten kişiler düzenli eğitimlere tabi tutulmalı ve viral etkenlere karşı farkındalık oluşturulmalıdır.

Bu doktora tez projesi Ege bölgesinde yer alan arıcılık işletmelerinde önemli viral hastalıkların durumu hakkında önemli veriler sağlamıştır. Bal arıları ve kolonilerinin sağlıklı olması gerek ekolojik ve gerekse gıda üretimi açısından hayati önem taşımaktadır. Kolonilere ve arılara büyük zararlar veren viral enfeksiyonların süratli olarak teşhis edilmesi ve bu enfeksiyonlarla mücadelenin sürdürülmesi, bal arılarının korunmasını sağlayarak ekosistem ve gelecek nesillere katkı sağlayacaktır.

## KAYNAKÇA

- Akratanakul P, Burgett M. *Varroa jacobsoni*: A prospective pest of honeybees in many parts of the world. *Bee World* 1975; 56: 119-121.
- Allen MF, Ball BV. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* 1996; 77: 141–162.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215, 403-410.3.
- Amiri E, Meixner M, Büchler R, Kryger P. Chronic bee paralysis virus in honeybee queens: evaluating susceptibility and infection routes. *Viruses* 2014; 6: 1188–1201.
- Anderson DL, Gibbs AJ. Inapparent virus infections and their interactions in pupae of honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus) in Australia. *J Gen Virol* 1988; 69: 1617-1625.
- Antúnez K, D'Alessandro B, Corbella E, Ramallo G, Zunino P. Honeybee viruses in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology* 2006; 93: 67–70.
- Azzami K, Ritter W, Tautz J, Beier H. Infection of honey bees with acute bee paralysis virus does not trigger humoral or cellular immune responses. *Archives of Virology* 2012; 157, 689–702.
- Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* 1963; 21: 390–395.
- Bailey L, Gibbs AJ, Wodds RD. Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* 1964a; 23: 425-429.
- Bailey L, Gibbs AJ. Acute infection of bees with paralysis virus. *J Insect Pathol* 1964b; 6: 395-407.
- Bailey L. The incidence of virus diseases in the honey bee. *Ann Appl Biol* 1967; 60: 43–48.
- Bailey L. Honey bee pathology. *Annu Rev Entomol* 1968; 13: 191-212.
- Bailey L. The multiplication and spread of sacbrood virus of bees. *Ann Appl Biol* 1969a; 63:483–491.
- Bailey L, Milne RG. The multiplication regions and interaction of acute and chronic bee paralysis viruses in adult honeybees. *J Gen Virol* 1969b; 4: 9-14.
- Bailey L. Recent research on honey bee viruses. *Bee World* 1975; 56:55–64.
- Bailey L. Viruses attacking the honey bee. *Adv Virus Res* 1976; 20:271–304.

- Bailey L, Woods RD. Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee-paralysis viruses. *J Gen Virol* 1977; 37: 175–182.
- Bailey L., Carpenter J.M., Woods R.D. Egypt bee virus and australian isolates of kashmir bee virus, *J Gen Virol* 1979; 43: 641-647.
- Bailey L, Ball BV, Perry JN. The prevalence of viruses of honey bees in Britain. *Ann Appl Biol* 1981; 97: 109–118.
- Bailey L. Viruses of honeybees. *Bee World* 1982; 63:165–173.
- Bailey L, Ball BV, Perry JN. Honeybee paralysis: its natural spread and its diminished incidence in England and Wales. *J Apicult Res* 1983; 22: 191–195.
- Bailey L, Ball BV. Honey bee pathology, Harcourt Brace Jovanovich, Sidcup, UK. 1991.
- Baker AC, Schroeder DC. Occurrence and genetic analysis of picorna-like viruses infecting worker bees of *Apis mellifera* L. populations in Devon, South West England. *J Invertebr Pathol* 2008; 98, 239–242.
- Bakonyi T, Frakas R, Szendroi A, Dobos-Kovacs M, Rusvai M. Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries. *Apidologie* 2002; 33, 63-74.
- Ball BV. The association of *Varroa jacobsoni* with virus diseases of honey bees, Meeting of the EC Experts' Group, Wageningen, in: Wageningen. 1983:21-23.
- Ball BV. *Varroa jacobsoni* as a virus vector. Cavalloro R, Editor. Present status of varroaosis in Europe and progress in the varroa mite control, Udine, Italy. 1989; 241-244.
- Ball BV, and Bailey L. Viruses of honey bees. In atlas of invertebrate viruses. Adams JR, Bonami JR, editor, CRC press, Boca Raton, FL. 1991; 525–551.
- Ball BV. The damaging effects of *Varroa jacobsoni*. Matheson A, Editor. Living with *Varroa*, International Bee Research Association, Cardiff. 1993; 9-16.
- Ball BV, Bailey L. Viruses. Morse RA, Flottum K, Editor. Honey Bee Pest, Predators, & Diseases. The A. 1. Root Co., Medina, OH, 1997; 11-31.
- Ball LA, Johnson KL. Nodaviruses of insects. Miller LK, Ball LA, Editor. Plenum Publishing Corporation, New York NY. 1998; 225–267.
- Ball BV. Bee disease diagnosis, Options Sacbrood. Colin ME, Ball BV, and Kilani M, Editor. Mediterannéennes. 1999; 91-96.

- Benjeddou M, Leat N, Allsopp M, Davison S. Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase pcr. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(5):2384-7.
- Berényi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Köglberger H, Nowotny N. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(4): 2414–2420.
- Berenyi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Koglberger H, Topolska G, Ritter W, Pechhacker H, Nowotny N. Phylogenetic analysis of deformed wing virus genotypes from diverse geographic origins indicates recent global distribution of the virus. *Appl Environ Microbiol* 2006; 73: 3605–3611.
- Blanchard P, Ribière M, Celle O, Lallemand P, Schurr F, Olivier V, Iscache AL, Faucon JP. Evaluation of a real-time two step RT-PCR assay for quantitation of chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. *J Virol Methods* 2007; 141: 7–13.
- Blanchard P, Schurr F, Celle O, Cougoule N, Drajnudel P, Thiery R, Faucon FJ, Ribiere M. First detection of israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*), *J Invertebr Pathol* 2008; 99:348–350.
- Blanchard P, Schurr F, Olivier V, Celle O, Antúnez K, Bakonyi T, Berthoud H, Haubruge E, Higes M, Kasprzak S, Koeglberger H, Kryger P, Thiéry R, Ribière M. Phylogenetic analysis of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and a predicted structural protein (pSP) of the chronic bee paralysis virus (CBPV) isolated from various geographic regions. *Virus Res* 2009;144(1-2):334-8.
- Blanchard P, Guillot S, Antunez K, Köglberger H, Kryger P, Miranda JR, Franc S, Chauzat MP, Thiery R, Ribiere M. Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan assay for quantitation of sacbrood virus (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies. *Journal of Virological Methods* 2014;197:7-13.
- Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunn A. The transmission of deformed wing virus between honey bees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J Invertebr Pathol* 1999; 73:101–106.
- Brutscher LM, Flenniken ML. RNAi and antiviral defense in the honey bee. *Journal of Immunology Research* 2015; 10.
- Casteels-Josson K, Zhang W, Capaci T, Casteels P, Tempst P. Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *J Biol Chem* 1994; 269: 28569–28575.

- Celle O, Blanchard P, Olivier V, Schurr F, Cougoule N, Faucon JP, Ribière M. Detection of chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. *Virus Res* 2008; 133: 280–284.
- Chantawannakul P, Ward L, Boonham N, and Brown M. A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in varroa mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *J Invertebr Pathol* 2006; 91: 69–73.
- Chauzat MP, Cauguil L, Roy L, Franco S, Hendrikx P, Ribiere-Chabert M. Demographics of European apicultural industry. *PLoS ONE* 2013; 8(11), e79018.
- Chejanovsky N, Ophir R, Schwager MS, Slabezki Y, Grossman S, Cox-Foster D. Characterization of viral siRNA populations in honey bee colony collapse disorder. *Virology* 2014; 176–183.
- Chen YP, Smith B, Collins AM, Pettis JS, Feldlaufer MF. Detection of deformed wing virus infection in honey bees, *Apis mellifera* L., in the United States. *Am Bee J* 2004a; 144:557–559.
- Chen YP, Pettis JS, Evans JD, Kramer M, Feldlaufer MF. Transmission of kashmir bee virus by the ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. *Apidologie* 2004b; 35: 441–448.
- Chen YP, Zhao Y, Hammond J, Hsu HT, Evans JD, Feldlaufer MF. Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *J Invertebr Pathol* 2004c; 87:84–93.
- Chen YP, Pettis JS, Feldlaufer MF. Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. *J Invertebr Pathol* 2005a; 90, 118- 121.
- Chen YP, Higgins JA, Feldlaufer MF. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl Environ Microbiol* 2005b; 71, 436-441.
- Chen YP, Evans JD, Feldlaufer MF. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* 2006a; 92:152–159.
- Chen YP, Pettis JS, Collins A, Feldlaufer MF. Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Appl Environ Microbiol* 2006b; 72, 606-611.
- Chen YP, and Siede R. Honey bee viruses. *Adv Virus Res* 2007; 70: 33–80.
- Chen YP, Pettis JS, Corona M, Chen WP, Li CJ, Spivak M, Visscher PK, DeGrandi-Hoffman G, Boncristiani H, Zhao Y, vanEngelsdorp D, Delaplane K, Solter L, Drummond F, Kramer M, Lipkin WI, Palacios G, Hamilton MC, Smith B, Huang SK, Zheng HQ, Li JL, Zhang X, Zhou AF, Wu LY, Zhou JZ, Lee ML, Teixeira EW, Li ZG, Evans JD. Israeli acute paralysis virus: epidemiology, pathogenesis and implications for honey bee health. *PLoS Pathog* 2014; 10:e1004261.



- Chevin A, Schurr F, Blanchard P, Thiéry R, Ribière M. Experimental infection of the honeybee (*Apis mellifera* L.) with the chronic bee paralysis virus (CBPV): Infectivity of naked CBPV RNAs. *Virus Res* 2012; 167: 173–178.
- Choe SE, Nguyen TT, Noh JH, Kweon CH, Reddy KE, Koh HB, Chang KY, Kang SW. Analysis of the complete genome sequence of two Korean sacbrood viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *Virology* 2012; 432: 155-161.
- Costa C, Tanner G, Lodesani M, Maistrello L, and Neumann P. Negative correlation between *Nosema ceranae* spore loads and deformed wing virus infection levels in adult honey bee workers. *J Invertebr Pathol* 2011; 08: 224–225.
- Cox-Foster DL., Conlan , Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, vanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai JH, Cui LW, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 2007; 318 (5848), 283–287.
- Dainat B, Ken T, Berthoud H, Neumann P. The ectoparasitic mite *Tropilaelaps mercedesae* (Acari, Laelapidae) as a vector of honeybee viruses. *Insect Soc* 2008; 56: 40–43.
- Dall DJ. Inapparent infection of honey bee pupae by kashmir and sacbrood bee viruses in Australia. *Ann Appl Biol* 1985; 106: 461-468.
- Dall DJ. Multiplication of kashmir bee virus in pupae of the honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* 1987; 49: 279-290.
- Damiani N, Fernández NJ, Maldonado LM, Álvarez AR, Eguaras MJ, Marcangeli JA. Bioactivity of propolis from different geographical origins on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Parasitol Res* 2010; 107:31–37.
- de Miranda JR, Drebot M, Tylor S, Shen M, Cameron CE, Stolz DB, Camazine SM. Complete nucleotide sequence of kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. *J Gen Virol* 2004; 85:2263–2270.
- de Miranda JR. Diagnostic techniques for virus detection in honey bees. In *Virology and the Honey Bee*. Aubert MFA, Ball BV, Fries I, Morritz RFA, Milani N, and Bernardinelli I, editör. EEC Publications, Luxembourg. 2008; 121–232.
- de Miranda JR, Genersch E. Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 2010; 103: 48–61.
- de Miranda JR, Cordoni G, Budge G. The acute paralysis virus-kashmir bee virus-israel acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology* 2010; 103: 30-47.

- de Miranda JR, Gauthier L, Ribiere M, Chen YP. Honey bee colony health: challenges and sustainable solutions. Miller TA, editör. Honey bee viruses and their effect on bee and colony health. Chapter 8. E-book, Boca-Roton. 2012; 71-102.
- Di Prisco G, Pennacchio F, Caprio E, Boncristiani Jr HF, Evans JD, Chen Y. Varroa destructor is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee *Apis mellifera*. *J Gen Virol* 2011; 92 (1): 151–155.
- Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretzschmar A, Suchail S, Brunet J-L, Alaux C. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS ONE* 2013; 8:e72016.
- Ding S.W. RNA-based antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology* 2010; 10: 632–644, 2010.
- Doğanay A, Girişgin AO. Genel Arıcılık. Doğanay A, Aydın L, editör. Bal Arısı Yetiştiriciliği Ürünleri Hastalıkları. 1. Baskı, Bursa, Dora Basın Yayın Dağıtım. 2017; 21-146.
- Doğaroğlu M. Modern Arıcılık. Doğaroğlu M, editör. Bal arısının vücut yapısı. 3. Baskı, Tekirdağ, Anadolu Ofset. 2008; 9-13.
- Evans JD. Genetic evidence for coinfection of honey bees by acute bee paralysis and kashmir bee viruses. *J Invertebr Pathol* 2001; 78:189–193.
- Evans JD, Spivak M. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *J Invertebr Pathol* 2010; 103: 62–72.
- Eyer M, Chen YP, Schäfer MO, Pettis J, Neumann P. Small hive beetle, *Aethina tumida*, as a potential biological vector of honeybee viruses. *Apidologie* 2009; 40: 419–428.
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus Taxonomy, Eighth Report of The International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, London. 2005.
- Fievet J, Tentcheva D, Gauthier L, de Miranda J, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M. Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L. *Virol J* 2006; 3:16.
- Forgach P, Bakonyi T, Tapasztó S, Nowotny N, Rusvai M. Prevalence of pathogenic bee viruses in Hungarian apiaries: situation before joining the European Union. *J Invertebr Pathol* 2008; 98: 235–238.
- Formato G, Giacomelli A, Ma'ayan O, Aubin L, Glick E, Paldi N, Cardeti G, Cersini A, Ciabatti IM, Palazzetti M, Granato A, Mutinelli F. First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in Italy. *Journal of Apicultural Research* 2011; 50(2): 176–177.

- Forzan M, Sagona S, Mazzei M, Felicioli A. Detection of deformed wing virus in *Vespa crabro*. *Bulletin of Insectology* 2017; 70 (2): 261-265.
- Francis RM, Kryger P. Single assay detection of acute bee paralysis virus, kashmir bee virus and israeli acute paralysis virus. *J Apicult Sci* 2012; 56: 137–145.
- Freiberg M, De Jong, D, Message D, Cox-Foster DL. First report of sacbrood virus in honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Brazil. *Genetics and Molecular Research* 2012; 11(3): 3310-3314.
- Furgala B, Lee PE. Acute bee paralysis virus, a cytoplasmic insect virus. *Virology* 1966; 29:346–348.
- Gajger I, Kolodziejek J, Bakonyi T, Nowotny N. Prevalence and distribution patterns of seven different honeybee viruses in diseased colonies: a case study from Croatia. *Apidologie* 2014; 45:701-706.
- Gallai N, Salles JM, Settle J, Vaissiere BE. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* 2009; 68, 810-821.
- Genersch E, Aubert M. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.) *Vet Res* 2010; 41:54.
- Ghosh RC, Ball BV, Wilcocks MM, Carter MJ. The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus. *Journal of General Virology* 1999; 80, 1541-1549.
- Goblirsch MJ., Spivak MS, Kurtti TJ. A cell line resource derived from honey bee (*Apis mellifera*) embryonic tissues. *PLoS One* 8 2013; e69831.
- Govan V, Leat N, Allsopp M, Davison S. Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect infecting RNA viruses. *Virology* 2000; 277:457–463.
- Grabeinsteiner E, Ritter W, Carter MJ, Davison S, Pechhacker H, Kolodziejek J, Boecking O, Derakhshifar I, Moosbeckhofer R, Licek E, Nowotny N. Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; (Jan): 93-104.
- Grabensteiner E, Bakonyi T, Ritter W, Pechhacker H, Nowotny N. Development of a multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of three viruses of the honeybee (*Apis mellifera* L.): acute bee paralysis virus, black queen cell virus and sacbrood virus. *J Invertebr Pathol* 2007; 94: 222–225.
- Gregory PG, Evans JD, Rinderer T, de Guzman L. Conditional immunegene suppression of honeybees parasitized by varroa mites. *J Insect Sci* 2005; 5: 7.

- Gülmez Y, Bursalı A, Tekin Ş. First molecular detection and characterization of deformed wing virus (DWV) in honeybees (*Apis mellifera* L.) and mite (*Varroa destructor*) in Turkey. *African Journal of Biotechnology* 2009; 8 (16): 3698-3702.
- Gümüsova S, Albayrak H, Yazıcı Z, Kurt M. Prevalence of three honey bee viruses in Turkey. *Veterinarski Arhiv* 2010; 80(6):779-785.
- Hails RS, Ball BV, and Genersch E. Infection strategies of insect viruses. In *Virology and the Honey Bee*. Aubert MFA., Ball BV, Fries I, Morritz RFA., Milani N., and Bernardinelli I., editör. EEC Publications, Luxembourg. 2008; 255–275.
- He YP, Zhang Q, Fu MZ, Xu XG. Development of multiplex PCR for simultaneous detection and differentiation of six DNA and RNA viruses from clinical samples of sheep and goats. *J Virol Methods* 2017; 243:44-49.
- Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vog PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* 1997; 23:504-511.
- Hornitzky M. The examination of honey bee virus in New South Wales. *Australasian Beekeeper* 1981; 82: 261-262.
- Hornitzky M. Bee disease research. *Australasian Beekeeper* 1982; 84: 7-10.
- Hung ACF., Shimanuki H, Knox DA. The role of viruses in bee parasitic mite syndrome. *Am Bee J* 1996; 136: 731–732.
- ICTV. 9th Report Unassigned Viruses. [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/unassigned-viruses-2011/w/un\\_viruses/304/unassigned-viruses](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/unassigned-viruses-2011/w/un_viruses/304/unassigned-viruses). Erişim: 04.09.2018
- Jan E. Divergent IRES elements in invertebrates. *Virus Res* 2006; 119: 16–28.
- Ju H, Ghil S. Primary cell culture method for the honeybee *Apis mellifera*. *Vitro Cell Dev Biol Anim* 2015; 51(9):890–893.
- Karapınar Z, Oğuz B, Dinçer E, Öztürk C. Phylogenetic analysis of black queen cell virus and deformed wing virus in honeybee colonies infected by mites in Van, Eastern Turkey. *Med Weter* 2018; 74 (7): 460-465.
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. *Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier Academic Pres, San Diego. 2011.
- Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewente I, Cunningham SA, Kremen C., Tschardtke T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society* 2007; 274, 303–313.

- Koch W, Ritter W. Experimental examinations concerning the problem of deformed emerging bees after infestation with *Varroa jacobsoni*. *Zentralbl Veterinärmed* 1991; 38: 337-344.
- Kukielka D, Sanchez-Vizcaino J.M. One-step real-time quantitative PCR assays for the detection and field study of sacbrood honeybee and acute bee paralysis viruses. *Journal of Virological Methods* 2009; 161; 240-246.
- Kukielka D. and Sánchez-Vizcaíno JM. First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in Spanish honeybees. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2010; 8(2), 308-311.
- Le Gall O, Christian P, Fauquet CM, King AM, Knowles NJ, Nakashima N, Stanway G, Gorbalenya AE. Picornavirales, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo-T3 virion architecture. *Arch Virol* 2008; 153:715–727.
- Leat N, Ball B, Govan V, Davison S. Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *J Gen Virol* 2000; 81:2111–2119.
- Lee PE, Furgala B. Chronic bee paralysis virus in the nerve ganglia of the adult honey bee. *J Invertebr Pathol* 1965; 7:170–174.
- Lee PE, Furgala B. Electron microscopic observations on the localization and development of sacbrood virus. *J Invertebr Pathol* 1967; 9:178–187.
- Locke B, Semberg E, Forsgren E, de Miranda JR. Persistence of subclinical deformed wing virus infections in honeybees following *Varroa* mite removal and a bee population turnover. *Plus One* 2017; 12(7): e0180910.
- Mao W, Schuler MA, Berenbaum MR. Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:8842–6.
- Maori E, Lavi S, Mozes-Koch R, Gantman Y, Peretz Y, Edelbaum O, Tanne E, and Tanne S. Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra-and inter-species recombination. *J Gen Virol* 2007; 88: 3428–3438.
- Marcangeli L, Monetti L, Fernandez N. Malformations produced by *Varroa jacobsoni* on *Apis mellifera* in the province of Buenos Aires, Argentina. *Apidologie* 1992; 23: 399-402.
- Martin S, Hogarth A, van Breda J, Perrett J. A scientific note on *Varroa jacobsoni* oudemans and the collapse of *Apis mellifera* L. colonies in the United Kingdom. *Apidologie* 1998; 29:369–370.

- Martin SJ. The role of Varroa and viral pathogens in the collapse of honey bee colonies: a modelling approach. *J Appl Ecol* 2001; 38:1082–1093.
- Mayo MA. Virus Taxonomy—Houston 2002. *Arch Virol* 2002; 147:1071–1076.
- Molineri AI, Pacini A, Giacobino A, Bulacio-Cagnolo N, Aignasse A, Zago L, Fondevila N, Ferrufino C, Merke J, Orellano E, Bertozzi E, Pietronave H, Signorini M. Prevalence of honey bee (*Apis mellifera*) viruses in temperate and subtropical regions from Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2017; 49, 166–173.
- Nei M. and Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York. 2000.
- Nielsen SL, Nicolaisen M, Kryger P. Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. *Apidologie* 2008; 39: 310–314.
- Noh JH, Reddy KE, Choe SE, Yoo MS, Doan HT, Kweon CH, Ramya M, Yoon BS, Nguyen LT, Nguyen TT, Van Quyen D, Jung SC, Chang KY, Kang SW. Phylogenetic analysis of black queen cell virus genotypes in South Korea. *Virus Genes* 2013;46(2):362-8.
- Nordström S, Fries I, Aarshus A, Hansen H, Korpela S. Virus infections in Nordic honey bee colonies with no, low or severe *Varroa jacobsoni* infestations. *Apidologie* 1999; 30: 475-484.
- Olivier V, Blanchard P, Chaouch S, Lallemand P, Schurr F, Celle O, Dubois E, Tordo N, Thierry R, Houlgatte R, Ribière M. Molecular characterization and phylogenetic analysis of chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. *Virus Res* 2008a; 132: 59–68.
- Olivier V, Massou I, Celle O, Blanchard P, Schurr F, Ribière M, Gauthier M. In situ hybridization assays for localization of the chronic bee paralysis virus in the honey bee (*Apis mellifera*) brain. *J Virol Methods* 2008b; 153: 232–237.
- Ongus JR, Peters D, Bonmatin JM, Bengsch E, Vlak JM, Van Oers MM. Complete sequence of a picorna-like virus of the genus iflavirus replicating in the mite *Varroa destructor*. *J Gen Virol* 2004; 85:3747–3755.
- Ongus JR, Roode EC, Pleij CW, Vlak JM, van Oers MM. The 5' non-translated region of *Varroa destructor* virus 1 (genus Iflavirus): structure prediction and IRES activity in *lymantria dispar* cells. *J Gen Virol* 2006;87:3397–3407.
- Overton HA, Buck KW, Bailey L, Ball BV. Relationships between the RNA components of chronic bee-paralysis virus and those of chronic bee-paralysis virus associate. *J Gen Virol* 1982; 63: 171–179.

- Özkırım A, Schiessera A. Israeli acute paralysis virus (IAPV) in Turkish bees. *J Apicult Research*. 2013; 52(2): 56-57.
- Palacios G, Hui J, Quan PL, Kalkstein A, et. al. Genetic analysis of israel acute paralysis virus: distinct clusters are circulating in the United States. *J Virol* 2008; 82: 6209–6217.
- Piewbang C, Rungsipipat A, Poovorawan Y, Techangamsuwan S. Development and application of multiplex PCR assays for detection of virus-induced respiratory disease complex in dogs. *J Vet Med Sci* 2016; 78: 1847-1854.
- Popova M, Reyes M, Le Conte Y, Bankova V. Propolis chemical composition and honeybee resistance against *Varroa destructor*. *Natural Product Research* 2014; 28: 788–794.
- Reddy KE, Noh JH, Yoo MS, Kim YH, Kim NH, Doan HT, Ramya M, Jung SC, Van Quyen D, Kang SW. Molecular characterization and phylogenetic analysis of deformed wing viruses isolated from South Korea. *Vet Microbiol* 2013; 7:167(3-4):272-9.
- Reynaldi FJ, Sguazza GH, Albicoro FJ, Pecoraro MR, Galosi CM. First molecular detection of co-infection of honey bee viruses in asymptomatic *Bombus atratus* in South America. *Braz J Biol* 2013;73(4):797-800.
- Ribiere M, Triboulot C, Mathieu L, Aurieres C, Faucon JP, Pepin M. Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie* 2002; 33: 339–351.
- Ribièrè M, Lallemand P, Iscache AL, et. al. Spread of infectious chronic bee paralysis virus by honeybee (*Apis mellifera* L.) feces. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 7711–7716.
- Ribièrè M, Ball BV, Aubert MFA. In Virology and the honey bee. Aubert MFA, Ball BV, Fries I, Morritz RFA, Milani N, and Bernardinelli I, editör. Natural history and geographic distribution of honey bee viruses. EEC Publications, Luxembourg. 2008; 15–84.
- Ribièrè M, Olivier V, Blanchard P. Chronic bee paralysis virus: a disease and a virus like no other? *J Invertebr Pathol* 2010; 103: 120–131.
- Rinderer TE, Green TJ. Serological relationship between chronic bee paralysis virus and the causing hairless-black syndrome in the honeybee. *J Invertebr Pathol* 1976; 27: 403–405.
- Rodriguez M, Vargas M, Gerding M, Navarro H, Antunez K. Viral infection and *Nosema ceranae* in honey bees in Chile. *Journal of Apicultural Research* 2012; 51:285-287.
- Rodríguez M, Vargas M, Antúnez K, Gerding M, Ovídio Castro F, Zapata N. Prevalence and phylogenetic analysis of honey bee viruses in the Biobío Region of Chile and

- their association with other honey bee pathogens. *Chilean journal of agricultural research* 2014, 74:170-177.
- Runckel C, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Ganem D, Andino R, DeRisi JL. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, Nosema, and Crithidia. *PLoS ONE* 2011; 6: e20656.
- Ruttner F. Biogeography and taxonomy of honeybees. Springer-Verlag, Berlin ; New York. 1988.
- Rüstemoğlu M, Sipahioğlu HM. Occurrence and molecular characterization of acute bee paralysis virus (ABPV) in honeybee (*Apis mellifera*) colonies in Hakkari province. *YYU J AGR SCI* 2016; 26(2): 174-182.
- Ryba S, Titera D, Schodelbauerova-Traxmandlova I, Kindlmann P. Prevalence of honeybee viruses in the Czech Republic and coinfections with other honeybee disease. *Biologia* 2012; 67, 590–595.
- Schuster S, Zirkel F, Kurth A, van Cleef KWR, Drosten C, van Rij RP, Junglen SA. Unique nodavirus with novel features: mosinivirus expresses two subgenomic RNAs, a capsid gene of unknown origin, and a suppressor of the antiviral RNAi pathway. *J Virol* 2014; 88: 13447–13459.
- Sebastien A, Lester PJ, Hall RJ, Wang J, Moore NE, Gruber MAM. Invasive ants carry novel viruses in their new range and form reservoirs for a honeybee pathogen. *Biol Lett* 2015; 11: 20150610.
- Sguazza GH, Reynaldi FJ, Galosi CM, Pecoraro MR. Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. *J Virol Methods* 2013; 194 (1): 102–106.
- Shen MQ, Cui LW, Ostiguy N, Cox-Foster D. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J Gen Virol* 2005a; 86: 2281–2289.
- Shen MQ, Yang XL, Cox-Foster D, Cui LW. The role of varroa mites in infections of kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology* 2005b; 342:141–149.
- Shumkova R, Neov B, Sirakova D, Georgieva A, Gadjev D, Teofanova D, Radoslavov G, Bouga M, Hristov P. Molecular detection and phylogenetic assessment of six honeybee viruses in *Apis mellifera* L. colonies in Bulgaria. *Peer J* 2018; 20;6:e5077.
- Siede R, Derakhshifar I, Otten C, Berenyi O, Bakonyi T, Kogelberger H, Büchler R. Prevalence of kashmir bee virus in Central Europe. *J Apic Res* 2005; 44: 129.








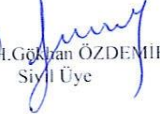

- Simone-Finstrom M, Foo B, Tarpy DR, Starks PT. Impact of food availability, pathogen exposure, and genetic diversity on thermoregulation in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Behavior* 2014; 27: 527–539.
- Simone-Finstrom M, Spivak M. Propolis and bee health: The natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* 2010; 41: 295–311.
- Spurny R, Pridal A, Palkova L, et. al. Virion Structure of black queen cell virus, a common honeybee pathogen. *J Virol* 2017; 91(6): e02100–16. pmid:28077635.
- Stoltz D, Shen X, Boggis C, Sisson G. Molecular diagnosis of kashmir bee virus infection. *J Apic Res* 1995; 34: 153–160.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 2013; 30: 2725-2729.
- Tapasztai Z, Forgách P, Kovágó C, Topolska G, Nowotny N, Rusvai M, Bakonyi T. Genetic analysis and phylogenetic comparison of black queen cell virus genotypes. *Vet Microbiol* 2009; 18;139(3-4):227-34.
- Tautz J. The buzz about bees: biology of a superorganism. Springer, Berlin; London. 2008.
- Tentcheva D, Gauthier L, Jouve S, Canabady-Rochelle L, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Ball BV, Bergoin M. Polymerase chain reaction detection of deformed wing virus (DWV) in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie* 2004a; 35, 431-439.
- Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl Environ Microbiol* 2004b; 70: 7185–7191.
- Tentcheva D, Gauthier L, Fievet J, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M. Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. 2006; *Apidologie* 37, 41-50.
- Thrusfield M. Veteriner Epidemiyoloji, 2. Baskı, Blackwell Science, Oxford, İngiltere. 2005; 183.
- Toplak I, Jamnikar Ciglencečki U, Aronstein K, Gregorc A. Chronic bee paralysis virus and *Nosema ceranae* experimental co-infection of winter honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Viruses* 2013; 5: 2282–2297.
- Topley E., Davison S., Leat N., Benjeddou, M. Detection of three honey bee viruses simultaneously by a single multiplex reverse transcriptase PCR. *Afr J Biotechnol* 2005; 4: 763–767.

- Tozkar CÖ, Kence M, Kence M, Huang Q, Evans JD. Metatranscriptomic analyses of honey bee colonies. *Frontiers in Genetics* 2015; doi: 10.3389/fgene.2015.00100.
- TÜİK. Arıcılık İstatistikleri. <http://arastirma.tarim.gov.tr/aricilik/Link/2/Aricilik-Istatistikleri>. Erişim tarihi: 09.01.2018.
- Valles SM, Chen YP, Firth AE, Guerin DMA, Hashimoto Y, Herrero S, de Miranda JR, Ryabov E and ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: iflaviridae. *Journal of General Virology* 2017; 98:527–528.
- Valles SM, Chen YP, Firth AE, Guerin DMA, Hashimoto Y, Herrero S, de Miranda JR, Ryabov E and ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: dicistroviridae. *Journal of General Virology* 2017; 98: 355–356.
- Van engelsdorp D, Meixner MD. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* 2010; 103 Suppl 1: S80-95.
- Viral Zone. [https://viralzone.expasy.org/33?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/33?outline=all_by_species). Erişim tarihi: 20.09.2018.
- Vizoli J, Salzet M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends in Pharmacological Sciences* 2002; 23.
- Wang Y, Zhu S, Hong W, Wang A, Zuo W. A multiplex PCR for detection of six viruses in ducks. *J Virol Methods* 2017; 248: 172–176.
- Welch A, Drummond F, Tewari S, Averill A, Burand JP. Presence and prevalence of viruses in local and migratory honeybees in Massachusetts. *Appl And Env Micr* 2009; 7862-7865.
- White GF. Sacbrood. *US Department of Agriculture Bulletin* 1917: 431.
- Whitfield CW, Behura SK, Berlocher SH, Clark AG, Johnston JS, Thrice Wiegiers FP. Transmission of honeybee viruses by *Varroa jacobsoni* Oud. European research on varroa control, Udine, Italy. Cavalloro R, Editör. Commission of the European Communities, Joint Research Centre, Ispra, Luxembourg. 1986.
- Wiegiers FP. Transmission of honeybee viruses by *Varroa jacobsoni* Oud. In European Research on Varroa Control. Edited by R. Cavalloro, Rotterdam. 1988; 99-104.
- Wilson-Rich N, Dres ST, Starks PT. The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* 2008; 54, 1392–1399.

- Winston ML. The biology of the honey bee. Harvard University Press, Cambridge, Mass. 1987; 4-12.
- Yan X, Liu XJ, Chen JH, Zhang Y, Han RJ. First detection of Israeli acute paralysis virus in *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) in China. *Sociobiology* 2009; 54: 95-100.
- Yang B, Peng G, Li T, Kadowaki T. Molecular and phylogenetic characterization of honey bee viruses, Nosema microsporidia, protozoan parasites and parasitic mites in China. *Ecology and Evolution* 2013; 3(2): 298-311.
- Yang XL, Cox-Foster DL. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 7470–7475.
- Yeşilbağ K. Genel Viroloji. Medyay Kitapevi, 2. Baskı, Bursa. 2017a; 125.
- Yeşilbağ K. Genel Arıcılık. Doğanay A, Aydın L, editör. Bal Arısı Hastalık ve Zararlıları. 1. Baskı, Bursa, Dora Basın Yayın Dağıtım. 2017b; 292-343.
- Yin S, Yang S, Shang Y, Cai X, Liu X. Development and optimization of multiplex-PCR for simultaneous detection of porcine pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circovirus type 2. *Intern J Appl Res Vet Med* 2012; 10:169-75.
- Yue C, Genersch E. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology* 2005; 86, 3419–3424.
- Yue C, Schröder M, Bienefeld K, Genersch E. Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): evidence for vertical transmission of viruses through drones. *J Invertebr Pathol* 2006; 92, 105-108.
- Yurtoğlu N. Cumhuriyet Türkiye'sinde Arıcılık Faaliyetleri (1923-1960). *Tarih Okulu Dergisi* 2017; Haziran, 187-219.
- Zambon R, Nandakumar M, Vakharia V, Wu L. The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:7257-7262.

## EKLER

### Ek-1: Etik Kurul Raporu

T.C. GIDA TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü		
<b>BORNOVA VETERİNER KONTROL ENSTİTÜSÜ DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU PROJE DEĞERLENDİRME RAPORU</b>		
Projenin Adı	Ege Bölgesinde Virus Nedenli Arı Hastalıklarının Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Araştırılması	
Proje Yürütücüsü	A.Anıl ÇAĞIRGAN	Viroloji Bölümü
Yardımcı Araştırmacılar	Prof. Dr. Zafer YAZICI	Doktora Tez Danışmanı
Projenin yürütüleceği yer/Bölüm	Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü	
Projenin süresi	12 ay	
Kullanılacak Deneysel hayvan türü ve sayısı	Arı	3000 adet
Yapılacak İşlemin kısa tanımı	Bu projede, Ege Bölgesinde virus kaynaklı arı hastalıklarının multipleks polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılması hedeflenmektedir. Bu amaçla, bölge sorumluluk alanına giren 7(yedi) ilden (İzmir, Manisa, Muğla, Aydın, Denizli, Uşak, Kütahya) rastgele örnekleme metodu ile 100 arı işletmesinden 30' ar canlı arı ve yavrulu petek numunesi alınacaktır.	
<b>GÖRÜŞLER</b>		
Sunulan proje " Hayvan deneyleri etik kurallarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik (6 Temmuz 2006 tarih ve 26220 sayılı Resmî Gazete) ve Enstitü Etik Kurul Yönergesine UYGUN bulunmuştur.		
<b>KARAR</b> (UYGUN DÜZELTİLMESİ GEREKİR KOŞULLU OLARAK UYGUN / UYGUN DEĞİLDİR) UYGUN		
28.09.2016		
 Dr. Nejdet ÇÖVEN Veteriner Hekim	 Dr. Seza ESKİİZMİRLİLER Veteriner Hekim	 Dr. Gülçin ERDAL Veteriner Hekim
 Bülent KAYMAKÇI Veteriner Hekim	 Z. Nejdet ERHAN Veteriner Hekim	 H. Gökhan ÖZDEMİR Siyasi Üye
 Turgut Mesut YILMAZ Siyasi Üye		
Adres: Erzene Mah. Ankara Cad. No:172-155 Bornova 35040 İZMİR Tel: +90 232 388 00 10 Faks: +90 232 388 50 52 E-posta: bornova@bornovavet.gov.tr Web: http://www.bornovavet.gov.tr/		

## Ek-2: Çalışmada elde edilen DWV nükleotid dizileri

>DWV\_Cine\_3.4.18

GAATGGATGACGTATAATGAATTTCTTGAATGGATAACTCCTGTGT  
ATATGGCTAACCGTCGTAAGGCGAATGAATCGTTTAAGATGCGTGTGGATG  
AAATGCAAATGTTACGTATGGATGAACCATTGGAAGGTGATAATATTCTCA  
ATAAGTATGTTGAAGTTAATCAGCGTTTAGTGGAGGAAATGAAGGCATTTA  
AGGAGCGTACACTATGGTCAGATTTACATCGNGTAGGTGCGGAAATTAGTG  
CGTCAGTTAAGAAAGCTTTACCAACCATTTCCATAACYGAAAACTACCAC  
ATTGGACTGTTCAATGTGGTATTGCTAAACCTGAGATGGACCATGCTTATGA  
GGTTATGAGTTCGTATGCAGCTGGAATGAATGCAGAGATTGAAGCGCATGA  
ACAAGTTCGGCGTTCATCAGWGAATGTCAATATGCAGAGCCTCAAGCTCC  
AAGAAATCCTGATGATGAAGGGCCAACCATAGATGAAGAACTTATGGGCGA  
CACTGAAT

>DWV\_Soke\_3.4.18

ATGGATGACGTATAATGAATTTCTTGAATGGATAACTCCTGTGTATA  
TGGCTACACCGTCGTAAGGCGAATGAATCGTTTAAGATGCGTGTGGATGAA  
ATGCAAATGTTACGTATGGATGAACCATTGGAAGGTGATAATATTCTCAAT  
AAGTATGTTGAGTTAATCAGCGCTTAGTGGAGGAAATGAAGGCATTTAAGG  
AGCGTACACTATGGTCAGATTTACATCGCGTAGGTGCGGAAATTAGTGCGT  
CAGTTAAGAAAGCTTTACCAACCATTTCCATAACCGAAAACTACCACATT  
GGACTGTTCAATGTGGTATTGCTAAACCTGAGATGGATCATGCTTATGAGGT  
TATGAGTTCGTATGCAGCTGGAATGAATGCAGAGATTGAAGCGCATGAACA  
AGTTCGGCGTTCATCAGTGGAAATGTCAATATGCAGAACCTCAAGCTCCAAG  
AAATCCTGATGACGAAGGGCCAACCATGATGAAGAACTTATGGGCGACAC  
TGAATTTACATCACAGGCTCTAGAACGTCTTGTGGATGAAGGTTATATAACT  
G

>DWV\_Datca\_3.4.18

AATGGATGACGTATAATGAATTTCTTGAATGGATAACTCCTGTGTAT  
ATGGCTAACCGTCGTAAGGCGAATGAATCGTTTAAGATGCGTGTGGATGAA  
ATGCAAATGTTACGTATGGATGAACCATTGGAAGGTGATAATATTCTCAAT  
AAGTATGTTGAAGTTAATCAGCGCTTAGTGGAGGAAATGAAGGCATTTAAG  
GAGCGCACACTGTGGTCAGATTTACATCGTGTAGGTGCGGAAATTAGTACG  
TCAGTTAAGAAAGCTTTACCAACCATTTCCATAACCGAAAACTACCACATT  
GGACTGTTCAATGTGGTATTGCTAAGCCTGAGATGGACCATGCTTATGAGGT  
TATGAGTTCGTATGCAGCTGGAATGAATGCAGAGATTGAAGCGCATGAACA  
AGTTCGGCGTTCATCAGTGGAAATGTCAATATGCGGAGCCTCAACTCCAAGA  
AATCTTGATGATGAAGGGCCAACCATAGATGAAGAACTTATGGGCGACACT  
GAATTTCCATCACAGGCTCTAGAACGTCTTGTGGATGAAGGTTATATAACT

>DWV\_Koycegiz\_3.4.18

TCCACATGGTCTGAATGGATGACGTATAATGAATTTCTTGAATGGAT  
AACTCCTGTGTATATGGCTAACCGTCGTAAGGCGAATGAATCGTTAAGATG  
CGTGTGGATGAAATGCAAATGTTACGTATGGATGAACCATTGGAAGGTGAT  
AATATTCTCAATAAGTATGTTGAAGTTAATCAGCGTTTAGTGGAGGAAATG  
AAGGCATTTAAGGAGCGTACACTATGGTCAGATTTACATCGCGTAGGTGCG  
GAAATTAGTGCCTCAGTTAAGAAAGCCTTACCAACCATTTCTATAACTGAG  
AACTACCACATTGGACTGTTCAATGTGGTATTGCTAAACCTGAGATGGATC  
ATGCTTATGAGGTTATGAGTTCGTATGCAGCTGGAATGAATGCAGAGATTG  
AAGCGCATGAACAAGTTCGGCGTTCATCAGTGGAAATGTCAATATGCAGAGC  
CTCAAGCTCCAAGGAATCCTGATGATGAAGGGCCAACCATAGATGAAGAAC  
TTATGGGCGACACTGAATTTACATCACAGGCTCTAGAACGTCTTGTGGATGA  
GGTTATATAACTGGAAA

>DWV\_Seydikemer\_3.4.18

GAATGGATGACGTATAATGAATTTCTTGAATGGATAACTCCTGTGT  
ATATGGCTAACCGTCGTAAGGCGAATGAATCGTTAAGATGCGTGTGGATG  
AAATGCAAATGTTACGTATGGATGAACCATTGGAGGGTGATAACATTCTCA  
ATAAGTATGTTGAAGTTAATCAGCGCTTAGTGGAGGAAATGAAAGCATTTA  
AGGAGCGTACACTATGGTCAGATTTACATCGCGTAGGTGCGGAAATTAGTG  
CGTCAGTTAAGAAAGCTTTACCAACCATTTCCATAACTGAAAACTACCAC  
ATTGGACTGTTCAATGTGGTATTGCTAAACCTGAGATGGATCATGCTTATGA  
GGTTATGAGTTCGTATGCAGCTGGAATGAATGCAGAGATTGAAGCGCATGA  
ACAAGTTCGGCGTTCATCAGGGGAATGTCAATATGCAGAGCCTCAAGCTCT  
AAGAAATCCTGATGATGAAGGGCCAACCATAGATGAAGA ACTTATGGGCGA  
CACTGAATTTGCATCACAGGCTCTAGAACGTCTTGTGGATGAAGGTTACATA  
ACTGGAAAACAGAAGAAATATATAGCTATGTGGTGTGA

### Ek-3: Çalışmada elde edilen BQCV nükleotid dizileri

>BQCV SP\_Cine\_3.4.18

ACTCTGACTCTCGACAGCGTGCCAAAGAGAGTAAGAGCAAGAAGG  
ATTACTCTAAGACAGGAGCAGCTTTTAAACAATCTGTTTCTAAGTTGGGCGA  
ACATTTACCCTTCCTCAAATCAGGAGCGAACTGGGTTAGCGAGAACATCTTG  
CAACCAGCGGATGAAATTATAGGACCCATTTTATCTCTCTTTGGGTTCTCGA  
AGCCTCTTTTGCCATTACCAATCCTACCGTTTTGCGGCCTGCGAATACCTTT  
GGTATCACTGATACTAATGATATGTCGCATAGTCTGGCGCTTTCTAACGATA  
CAAATGTACCGTTTATTAAAGCGTTGGATGGGTCAGGTCTGGACGAAATGA  
GCTTCGATTATCTAAAGAAGATACCCCAATTCATACAGTCAAAATTCTTCAC  
TACTACNACAAAACCCCAAGAGGTTTTGTTTCAA

>BQCV SP\_Datca\_3.4.18

AACTCTGACTCTCGACAGCGTGCCAAAGAGAGCAAGAGCAAGAAG  
GATTACTCCAAGACAGGAGCAGCTTTTAAACAATCTGTTTCTAAGTTGGGCG  
AACATTTACCCTTCCTCAAATCAGGAGCGAATTGGGTTAGCGAGAACATCTT  
GCAACCAGCGGATGAAATTATAGGACCCATTTTATCTCTCTTTGGGTTCTCG  
AAGCCTCTTTTGCCATTACCAATCCTACCGTTTTGCGGCCTGCGAATACCTT  
TGGTATCACTGATACTAATGATATGTCGCATAGTCTGGCGCTTTCTAACGAT  
ACGAATGTACCGTTTATTAAAGCGTTGGATGGGTCAGGTCTGGACGAAATG  
AGCTTCGATTATCTAAAGAAAATACCCCAATTCATACAGTCAAAATTCTTCA  
CTACTACGACAAAACCTCAAGAGGTT

>BQCV SP\_Koycegiz\_3.4.18

AACTCTGACTCTCGACAGCGTGCCAAAGAAGAGTAAGGGCAAGAA  
GGATTACTCGAAGACAGGAGCAGCTTTTAAACAATCTGTTTCTAAGCTGGG  
CGAACATCTTCCTTTTCCTCAAATCAGGAGCGAACTGGGTCAGTGAGAATATT  
CTGCAGCCTGCAGATGAAATCATAGGCCCTATTTTGTCTCTCTTTGGGTTCTC  
GAAGCCTCTTTTGCCATTACCAATCCTACCGTTTTGCGGCCTGCGAATACC  
TTTGCTATCACTGATACCAATGATATGTCGCATAGTCTGGCGCTTTCTAACG  
ATACTAATGTACCGTTTGTTAAGGCGCTTGATGGGTCAGGTTTGGACGAAAT  
GAGCTTCGATTACCTAAAGAAAATACCCCAATTTATACAGTCAAAATTCTTC  
ACCACATCAACTAAACCTCAAGAGATTTTGT

>BQCV SP\_Karpuzlu\_3.4.18

CGAACTCTGACTCTCGACAGCGTGCCAAAGAGAGCAAGAGCAAGA  
AGGATTACTCCAAGACAGGAGCAGCTTTTAAACAATCTGTTTCTAAGTTGGG  
CGAACATTTACCCTTTCTCAAATCAGGAGCGAATTGGGTTAGCGAGAACAT  
CTTGCAACCAGGGATGAGATTATAGGACCCATTTTATCTCTCTTTGGGTTCT  
CGAAGCCTCTTTTGCCATTACCAATCCTACCGTTTTGCGGCCTGCGAATAC  
CTTTGGTATCACTGATACTAATGATATGTCGCATAGTCTGGCGCTTTCTAAC  
GATACAAATGTACCGTTTATTAAAGCGTTGGATGGGTCAGGTCTGGACGAA  
ATGAGCTTCGATTACCTAAAGAAAATACCCCAATTCATACAGTCAAATTTT  
TCACCACTACAACAAAACCTCAAGAGGTTTTGTTTCAAACCAAAGTAATGC

>BQCV SP\_Datca\_3.4.18

GAACTCTGACTCTCGACAGCGTGCCAAAGAGAGCAAGAGCAAGAA  
GGATTACTCTAAGACAGGAGCAGCTTTTAAACAATCTGTTTCTAAGTTGGGC  
GAACATTTACCTTTCCTCAAGTCAGGAGCGAATTGGGTTAGCGAGAACATCT  
TGCAACCAGCGGATGAAATTATAGGACCCATTCTATCTCTCTTTGGGTTCTC  
GAAGCCTCTTTTGCCATTACCAATCCTACCGTTTTGCGGCCTGCGAATACC  
TTTGGTATCACTGATACTAATGATATGTCGCACAGTCTGGCGCTTTCTAACG  
ATACAAATGTACCGTTTATTAAAGCGTTGGATGGGTCAGGTCTGGACGAAA  
TGAGCTTCGATTACCTAAAGAAAATACCCCAATTCATACAGTCAAATTTTT  
CACCACTACAACAAAACCTCAAGAGGTTTTGTTTCAAACCAAAGTAATGCC

>BQCV SP\_Odemis\_3.4.18

TACGAACTCTGACTCTCGACAGCGTGCCAAAGAGAGCAAGAGCAA  
GAAGGATTACTCTAAGACAGGAGCAGCTTTTAAACAATCTGTTTCTAAGTTG  
GGCGAACATTTACCTTTCCTTAAGTCAGGAGCGAATTGGGTTAGCGAGAAC  
ATCTTGCAACCAGCGGATGAAATTATAGGACCCATTTTATCTCTTTTCGGGT  
TCTCGAAGCCTCTTTTGCCATTACCAATCCTACCGTTTTGCGGCCTGCGAAT  
ACCTTTGGTATCACTGATACTAATGATATGTCGCATAGTCTGGCGCTTTCTA  
ACGATACAAATGTACCGTTTATTAAAGCGTTGGATGGGTCAGGTCTGGACG  
AAATGAGCTTCGATTACCTAAAGAAAATACCCCAATTCATACAGTCAAAT  
TTTTACCACTACAACAAAACCTCAAGAGGTTTTGTTTCAAACCAAAGTAAT  
GC



#### Ek-4: Çalışmada elde edilen ABPV nükleotid dizileri

>ABPV\_Koycegiz\_19.4.18

ATAGTTGTGTGGAAGTGGGCTGAAGATGTAGTTGTAGTAGAACCTA  
AGCCTTTGCTTGCAGGACCAACGCAAGTGTTCACCACCTGTAACCTCCGC  
AGATTCTATAAATATTATAGATGCTTCAATGCAAATTAACCTAGCGAATAAA  
GCTGATGAGAATGTAATTACATTCTTTGATTCTGATGACGCTGAGGAAAGG  
AACATGGAAGCATTATTGAAAGGAAGCGGCGAGCAAATCATGAATTTGAGA  
TCCTTATTAAGAACATTTAGGACTATATCAGAAAATTGGAACCTACCACCTA  
ACACAAAACAGCAAAACAGATTTGACTGATGTTGCGGATAAGGAAGGTA  
GAGATTATATGTCTTATTTATCATACTATAGATTCTATAGAGGTGGAAG  
AAGATATAAATTTTTCAATACAACAGCTTTGAAACAATCTCAAACCTTGCTAT  
ATTCGCAGCTTCTTAGTACCACGATATTATACTACTGATAACACAAACAATG  
ATGGACCTTCACATATAACATATCCAGTACTTAATCCAGTTCATGAAGTAGA  
AGTACCATATTATTGTCAATATAGAAAATTACCAGTAGCATCTACAACCGAC  
AAAGGATATGATGCATCTTTGATGTACTATTCTAATGTTGGTACCAATCAAA  
TTGTTGCTCGAGCCGGCAATGATGATTTTACCTTTGGATGGCTCATAGGAAC  
ACCGCAAACCTCAAGGAATAACGAGAACGGAAACTAAATAAATAAATAAAG  
ATGTACTTTAGAGGACAGACATACCCTCTTTTGTATGGCTATAGTCTAAATT

>ABPV\_Odemis\_19.4.18

TGTGGAAATGGGCTGAAGATGTAGTTGTAGTAGAACCTAAGCCTTT  
GCTTGCAGGACCAACGCAAGTGTTCACCACCTGTAACCTCCGCAGATTCT  
ATAAATATTATAGATGCTTCAATGCAAATTAACCTAGCGAATAAAGCTGAT  
GAGAATGTAATTACATTCTTTGATTCTGATGACGCTGAGGAAAGGAACATG  
GAAGCATTATTGAAAGGAAGTGGCGAACAAATCATGAATTTGAGATCCTTA  
TTAAGAACATTTAGGACTATATCAGAAAATTGGAACCTACCACCTAACACA  
AAAACAGCAATAACAGATTTGACTGATGTTGCGGATAAGGAAGGTAGAGAT  
TATATGTCTTATTTATCATACTATAGATTCTATAGAGGAGGAAGAAGAT  
ACAAATTTTTCAATACAACAGCTTTGAAACAATCTCAAACCTTGCTATATTCG  
CAGCTTCTTAGTACCACGATATTATACTACTGATAACACAAACAATGACGG  
ACCTTCACATATAACATATCCAGTACTTAATCCAGTTCATGAAGTAGAAGTA  
CCATATTATTGTCAATATAGAAAATTACCAGTAGCATCTACAACCGACAAA  
GGATATGATGCATCTTTGATGTATTATTCTAATGTTGGTACCAATCAAATTG  
TTGCTCGAGCCGGCAATGATGATTTTACCTTTGGATGGCTCATAGGAACACC  
GCAAACCTCAAGGAATAACGAGAACGGAAACTAAATAAATAAATAAAGATGT  
ACTTTAGAGGACAGACATACCCTCTTTTGTATGGCTATAGTCTAA

>ABPV\_Fethiye\_19.4.18

ATAGTTGTTTGGAAATGGGCTGAAGATGTAGTTGTAGTAGAACCTA  
AGCCTTTGCTTGCAGGACCAACGCAAGTGTTTCAACCACCTGTAACCTCCGC  
AGATTCTATAAATATTATAGATGCTTCAATGCAAATTAACCTTAGCGAATAAA  
GCTGATGAGAATGTAATTACATTCTTTGATTCTGATGACGCTGAGGAAAGG  
AACATGGAAGCATTATTGAAAGGAAGTGCGAACAATCATGAATTTGAGA  
TCCTTATTAAGAACATTTAGGACTATATCAGAAAATTGGAACCTACCACCTA  
ACACAAAACAGCAATAACAGATTTGACTGATGTTGCGGATAAGGAAGGTA  
GAGATTATATGTCTTATTTATCATAACATCTATAGATTCTATAGAGGAGGAAG  
AAGATACAAATTTTTCAATACAACAGCTTTGAAACAATCTCAAACCTTGCTAT  
ATTCGCAGCTTCTTAGTACCGCGATATTATACTACTGATAACACAAACAATG  
ACGGACCTTCACATATAACATATCCAGTACTTAATCCAGTTCATGAAGTAGA  
AGTACCATATTATTGTCAATATAGAAAATTACCAGTAGCATCTACAACCTGAC  
AAAGGATATGATGCATCTTTGATGTATTATTCTAATGTTGGTACCAATCAAA  
TTGTTGCTCGAGCCGGCAATGATGATTTTACCTTTGGATGGCTCATAGGAAC  
ACCGCAAACCTCAAGGAATAACGAGAACGGAAACTAAATAAATAAATAAAG  
ATGTACTTTAGAGGACAGACATACCCTCTTTTGTATGGCTATAGTCTAAATT  
TT

**Ek-5: Çalışmada elde edilen CBPV nükleotid dizileri**

>CBPV2 (İzmir)

TTTGCGAGTCCTCTATCGTATTGGAGACGAGGGAGGACGGGACCAA  
ACTCATCCACTTACCAGTACAACATACCCCTCTCGCAGTCCCGGTCAACCTT  
GCCAGATTTATTACCACCGAAGCGGTTCAAGAAATCTCAGACCAACTCCTCC  
GCGTCCCACCCGATAACATCGAAAGGTGCAGGCACATACTTCACTCTCAT  
CAAACGGGAATCCGGATCCCCGCGACACTCCGTTACGCCAGTGCGTAGAAG  
AATTCTTAATGACACCTCAGATGAGCTGGTTGAAGAGAGTTCACTCCCCTGT  
CGATTTCTCGATTTGGGTCAAACGCTACCCAGAATGGCGGCAGCGTCAACTT  
ATCGCCGCCCGGGCGCGCTCCTCAGCGATCCGGAACCCCGTCACAAGTAC  
GCACTCATAAAGAATTTTCGTCAAGAACGAGACCACCGCCAAGTTCGTGCGAC  
CCAAGAAACATCAGCCCGCGAAGCGACGAGTTCCTAGTGGTGGTGGGTCCG  
TACATCAGCGCCATCGAACACGCCGAGTTCGTTGCCCTTCCTTATCAAGG  
GGCTGACACCGAAGAAGAGATGTGAAAACTAGCATGGCTCACAGAGTAC  
GAGCGTTTTTCTTGAGATCGACTTCGCTCGTTTCGATCAGACTCTGATGAAAG  
ATCTCCTTCGTATTGTAGAACTGCGTTTCTTACTCGACCCTTACACCCCAAAC  
CCTCATAATGATGATAGTAACCAGCGTGCCAACCAATTATTTATCGCCTTTA  
TGTTGTACACTCTCACCAACATCGGATTGAGTCGGTATGGCACCCGTTACAA  
GCGCGAAGGCACACGTTGCTCAGGAGACCCTCACACCTCCATCGGCAATGG  
ATTTATCAACGCCTTTATCATCTGGCTTTGTCTTCGCAAGTTGCCTGAAAAC  
AGTTGGCAATCAGCTCATGAGGGTGATGACGGCATAAGTAGGCTTGCGTGCC  
AATATTGTTTATCAAGTCGAGTATAACCTCAAGTTTCTATCCTGTCTTGGTTT  
CCGTGCCAAGATTCGGGTAGTTTCTGAGTTATCCCAAGCCACCTTTTGTGGT  
AGGCGATTCATCGAGACCTCATCTGGGCTAAGCGACATGTGTGATCTTACTC  
GGACCCTTGGCAAATTTAACACCACCATGTCCCAGGGTCCCCTTAGATCTCCT  
TCTCCTTGCCAAGTCGTTGTCTTATCACCATACCGATGCCAACACCCCGTTG  
ATCGGTGCTCTGACATACGCGTTGGTGAACAACACTTCGACCTGTCATGCAGA  
AGTAT

>CBPV3 (Muğla)

TTTGCGAGTCCTCTATCGTATTGGAGACGAGGGAGGACGGGACCAA  
ACTCATCCACCTACCAGTACAACATACCCCTCTCGCAGTCCCGGTCAACCTT  
GCCAGATTTATTACCACCGAAGCGGTTCAAGAAATCTCAGACCAACTCCTCC  
GCGTCCCACCCGATAACATCGAAAGGTGCAGGCACATACTTCACTCTCAT  
CAAACGGGAATCCGGATCCCCGCGACACTCCGTTACGCCAGTGCGTAGAAG  
AATTCTTAATGACACCTCAGATGAGCTGGTTGAAGAGAGTTCACTCCCCTGT  
CGATTTCTCGATTTGGGTCAAACGTTACCCAGAATGGCGGCAGCGTCAACTT  
ATCGCCGCCAGGGCGCGCTCCTCAGCGATCCGGAACCCCGTCACAAATAC  
GCGCTCATAAAGA ACTTCGTCAAGAACGAGACCACCGCAAGTTCGTCGAC  
CCAAGAAACATCAGCCC GCGAAGCGACGAGTTCCTAGTGGTGGTGGTCCG  
TACATCAGCGCCATCGAACACGCCGCAGTTCGTTGCCCTTCCTTATCAAGG  
GGCTGACACCGAAGAAGAGATGTGAAAAATTAGCATGGCTCACAGAGTATG  
AGCGTTTTCTCGAGATCGATTTGCTCGCTTCGACCAGACTCTGATGAAAGA  
TCTCCTTCGTATTGTTGAACTGCGTTTCTTACTCGACCCTTACACCCCAAACC  
CTCATAATGATAATAGTAACCAGCGTGCCAACCAATTATTTATCGCTTTCAT  
GTTGTACTCTCTACTAACATCGGATTAAGTCGGTATGGCACCCGTTACAAG  
CGCGAAGGCACACGTTGCTCAGGAGACCCTCACACCTCCATCGGCAACGGA  
TTTATCAACGCCTTTATCATATGGCTTTGCCTTCGCAAATTGCCTGAAAACA  
GCTGGCAATCAGCTCATGAGGGTGATGACGGCATAGTAGGCTTGCGTGCCA  
ATATTGTTTCATCAGGTTGAGTATAACCTCAAGTTTCTATCCTGCCTTGGTTTT  
CGTGCCAAGATTCGGGTAGTTTCTGAGTTATCCCAAGCCACCTTTTGTGGTA  
GGCGATTCATCGAGACCTCCTCCGGGCTAAGCGACATGTGTGATCTTACTCG  
GACCCTTGGCAAATTTAACACCACCATGTCCCAGGGTCCCTTGGATCTCCTT  
CTGCTTGCCAAGTCATTGTCTTATCACCATAACCGATGCCAACACCCCGTTGA  
TCGGTGCTCTGACATATGCGTTGGTGAAAACACTTCGACCTGTCATGCAGAA  
GTAT

**Ek-6: Çalışmada elde edilen SBV nükleotid dizileri**

>Sac\_Kemalpasa\_8.5.18

GAAGACATTTGATACAGTGGGCTCTTATACCGATTTGTTTAATGGTT  
GGGTTTCTGGTATGTACGTGGATAAAAATGTCCACTACACCGAAATGTCCA  
GTGATGAAAGTGGACGAAGAATCTGGAATGTTAGGCGCGCAGTGTCAATTA  
AGACCGCAGAAGGAACTTTAGTGTGGCGAAAAGTAATATCCTCTTATAGTT  
GTAAAGTGGCTTCCGAGCTAGCAGCTAAGAGTATCTTAGTACAGTTTACAGT

>Sac\_Beyagac\_8.5.18

CAATCCTTGCCTCTTGTAAGAAGACATTTGATACAGTGGGCTCTTAT  
ACCGATTTGTTTAATGGTTGGGTTTCTGGTATGTACGTGGATAAAAATGTCC  
ACTACACCGAAATGTCCAGTGATGAAAGTGGACGAAGAATCTGGAATGTTA  
GGCGCGCAGTGTCAATTAAGACCGCAGAAGGAACTTTAGTGTGGCGAAAAG  
TAATATCCTCTTACAGTTGTAAAGTGGCTTCCGAGCTAGCAGCTAAGAGTAT  
TTTAGTACAGTTTACAGGTCCGATAAGGACTCA

>Sac\_Seydikemer\_8.5.18

ATTTGTTTAATGGTTGGGTTTCTGGTATGTACGTGGATAAAAATGTC  
CACTACACCGAAATGTCCAGTGATGAAAGTGGACGAAGAATCTGGAATGTT  
AGGCGCGCAGTGTCAATTAAGACCGCAGAAGGAACTTTAGTGTGGCGAAAA  
GTAATATCCTCTTACAGTTGTAAAGTGGCTTCCGAGCTAGCAGCTAAGAGTA  
TTTTAGTACAGTTTACAG

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

**Ad- Soyad** : Abdurrahman Anıl ÇAĞIRGAN

**Doğum Yeri/Tarihi:** Acıpayam/DENİZLİ- 1985

**Medeni Hali** : Bekar

**E-Posta** : anil.cagirgan@tarim.gov.tr

### Eğitim Bilgileri

**İlk Öğretim** : Osman Manisalı İlkokulu-1996

**Orta Öğretim** : Acıpayam Anadolu Lisesi-2000

**Lise** : Acıpayam Anadolu Lisesi-2003

**Yüksek Öğretim** : Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi-2009

**Yabancı Dil** : İngilizce

### Mesleki Deneyim

Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü 2011-2016

Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü-2016-Halen