



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SAMSUN VE HATAY İLLERİNDEKİ  
GÖÇMEN KUŞLARDA  
ÖNEMLİ BAZI ZONOTİK VİRUSLARIN ARAŞTIRILMASI**

**Sabri HACIOĞLU**

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Aykut ÖZKUL**

**ANKARA  
2019**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SAMSUN VE HATAY İLLERİNDEKİ  
GÖÇMEN KUŞLARDA  
ÖNEMLİ BAZI ZONOTİK VİRUSLARIN  
ARAŞTIRILMASI**

**Sabri HACIOĞLU**

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Aykut ÖZKUL**

**ANKARA**

**2019**

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Samsun ve Hatay İllerindeki Göçmen Kuşlarda Önemli Bazı Zoonotik Virusların Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Sabri HACIOĞLU

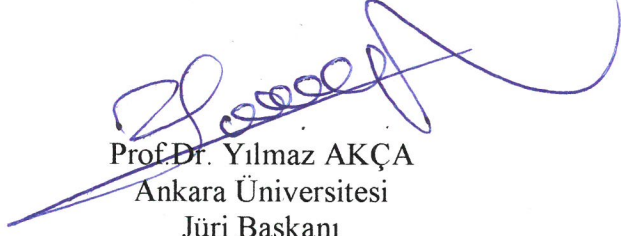
Tarih:


İmza:


## KABUL VE ONAY


Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Viroloji Anabilim Dalında  
Sabri HACIOĞLU tarafından hazırlanan  
“Samsun ve Hatay İllerindeki Göçmen Kuşlarda  
Önemli Bazı Zoonotik Virusların Araştırılması”  
adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak  
OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile kabul / ~~red~~ edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05.07.2019

  
Prof. Dr. Yılmaz AKÇA  
Ankara Üniversitesi  
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. Yakup YILDIRIM  
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi  
Raportör

  
Prof. Dr. Hakan YARDIMCI  
Ankara Üniversitesi  
Üye

  
Prof. Dr. Sibel YAVRU  
Selçuk Üniversitesi  
Üye

  
Prof. Dr. Aykut ÖZKUL  
Ankara Üniversitesi  
Üye

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

Prof. Dr. Mehmet AKAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
<b>1.GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Arboviruslar	1
1.1.1. Arbovirusların Genetik Özellikleri	4
1.1.1.1. Flavivirus'ların Özellikleri	4
1.1.1.1.1. Flavivirusların Replikasyonu	8
1.1.1.1.2. BNV'nin Filogenetik Dağılımı	8
1.1.1.2. Nairovirusların Özellikleri	10
1.1.1.2.1. KKKAV'nün Genotipik ve Coğrafik Yayılımı	11
1.1.1.3. Phlebovirusların Özellikleri	14
1.1.1.3.1. Phlebovirusların Sınıflandırması ve Replikasyon	16
1.1.2. Vektör Kaynaklı Virusların Canlılığını Koruma Yolları	16
1.1.3. Arbovirusların Bulaşma Mekanizmaları	19
1.1.3.1. Flavivirusların Bulaşma Mekanizmaları	19
1.1.3.2. Nairovirus Bulaşma Mekanizmaları	21
1.1.3.3. Phlebovirus Bulaşma Mekanizmaları	23
1.1.4. Arbovirusların Bulaşmasında Kuşların Rollerini	25
1.1.4.1. Kuşların Flavivirus Bulaşmasındaki Rolü	26
1.1.4.2. Kuşların Nairovirus Bulaşmasındaki Rolü	32
1.1.5. Arbovirusların Dünyadaki Dağılımı	36
1.1.5.1. Flavivirusların Dünyadaki Dağılımı	36
1.1.5.2. Nairovirusların Dünyadaki Dağılımı	37
1.1.5.3. Phlebovirusların Dünyadaki Dağılımı	40
1.1.6. Türkiye'de Arbovirusların Dağılımı	42
1.1.6.1. Flavivirusların Dağılımı	42
1.1.6.2. Nairovirusların Dağılımı	43
1.1.6.3. Phlebovirusların Dağılımı	45
<b>2.GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>47</b>
2.1. Gereç	47
2.1.1. Araştırmada Kullanılan Hayvanlar ve Örnekler	47
2.1.2. Kontrol Amacıyla Kullanılan Viruslar ve Hücre Kültürü	49
2.2. Yöntem	50
2.2.1. Dokuların İşlenmesi	50
2.2.2. Viral Nükleik Asit İzolasyonu	50
2.2.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	51
2.2.4. Hedef DNA'ların Çoğaltılması	52

2.2.5. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Filogenetik Analizler	56
2.2.6. Virus İzolasyonu	57
<b>3. BULGULAR</b>	<b>59</b>
3.1. Araştırmada Kullanılan Kuşlar	59
3.2. Viral Genom Tespiti Çalışmaları	61
3.2.1. Hedef DNA'ların Flavivirus Yönünden Değerlendirilmesi	65
3.2.2. Hedef DNA'ların Nairovirus Yönünden Değerlendirilmesi	65
3.2.3. Hedef DNA'ların Phlebovirus Yönünden Değerlendirilmesi	65
3.3. Virus İzolasyon Çalışmaları	67
3.3.1. Flavivirus İzolasyon Sonuçları	67
3.3.2. Phlebovirus İzolasyon Sonuçları	67
3.4. Nükleotid Dizini ve Filogenetik Analizler	74
3.4.1. Phlebovirus Pozitif tespit edilen Dizinlerin Değerlendirilmesi	75
3.4.1.1. Phlebovirus S segmenti yönünden sonuçların değerlendirilmesi	75
3.4.1.2. Phlebovirus L segmenti yönünden sonuçların değerlendirilmesi	79
3.4.2. Flavivirus yönünden sonuçların değerlendirilmesi	83
3.4.2.1. BNV NS5 gen bölgesi yönünden sonuçların değerlendirilmesi	83
<b>4.TARTIŞMA</b>	<b>87</b>
<b>5.SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>95</b>
<b>ÖZET</b>	<b>97</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>98</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>99</b>
<b>EKLER</b>	<b>120</b>
EK-1 Etik Kurul Kararı	120
EK-2 Bakanlık İzini	121
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>122</b>

## ÖNSÖZ

Dünya Sağlık Örgütü ve Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü'nün paylaşımlarına göre artropod kaynaklı viruslar (Arboviruslar) insan ve hayvanların yaşamını ciddi oranda tehdit etmektedir. Bu virusların bazıları dünyada gündem oluşturan önemli salgınlara kaynağı olmakla birlikte yüksek oranda ölümler ile de seyredilmektedir. Virusların nasıl yayıldığı konusunda ortaya atılan birçok hipotezde göçmen kuşlardan bahsedilmektedir ve virusların kıtalar arası taşınmasında göçmen kuşların ciddi rolleri bulunabildiği belirtilmektedir. Emerging and re-emerging diseases (Yeni ve yeniden çıkan hastalıklar) canlıları tehdit etmektedir. Bu kapsamda ülkelere gelebilecek bu hastalıklar için göçmen kuşların düzenli bir şekilde araştırılması ile erken tespit durumunda gerekli önlemler alınabilir. Bu amaçla bazı ülkeler kuşlardan numune toplama/bildirme sürecine halkı da katarak daha fazla veri elde etmeye çalışmaktadır. Bazı viral hastalıkların bulaşma siklusunda boşluklar bulunmakta ve nasıl yayıldığı teoriler ile açıklanmaktadır.

Bu tez çalışmasında Samsun ve Hatay illerindeki göçmen ve/veya göçmen kuşlar ile ortak alanı paylaşan kuşlardan numune toplanarak bazı zoonotik virusların araştırılması hedeflenmiştir. Toplanan kuş numunelerine Flaviviruslar, Nairoviruslar ve Phleboviruslar yönünden analizler yapılmıştır. Flaviviruslar içinde ülkemizde görülen Batı Nil Virusu kuş-sivrisinek siklusunu kullanarak at ve insanlarda hastalık oluşturmaktadır. Nairoviruslar içinde bulunan Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virusu kene kaynaklı bir virus olup kuşların virus yayılımındaki rolleri tam olarak aydınlatılmamıştır. Phleboviruslar içinde bulunan Toscana virus özellikle Akdeniz bölgesindeki ülkelerde tatarcık kaynaklı olup bu virusların bulaşmasında kuşların rolü bilinmemektedir. Bu çalışma ile kuşların bahsi geçen virusların yayılımındaki rolü ve araştırma yapılan illerdeki durum ortaya konulmuş olacaktır.

Doktora eğitimim süresince, hiçbir konuda yardım ve desteğini esirgemeyen, bilgisi ve deneyimi ile bana yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a, bu süre içinde her konuda yardımlarını aldığım Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yılmaz AKÇA ve Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof.

Dr. Feray ALKAN, Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP, Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU, Prof. Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU ve tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. Hakan YARDIMCI 'ya teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince aynı laboratuvarı paylaştığım ve yardımlarını gördüğüm tüm araştırma görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Numune toplama sürecinde yardımlarından dolayı Antakya Avcılar Derneği ile Samsun Bafra Avcılar Derneği üyelerine ve diğer avcılar ile bu bölgelerden numune gönderen veteriner hekimlere teşekkürü borç bilirim. Bu süreç içinde her çeşit yardımlarını aldığım Veteriner Hekim Ufuk EROL ve Dr. Erdem DANYER'e de ayrıca teşekkür ederim.

Doktora eğitimi süresince her türlü destek ve sevgileri ile yanımda olan, hiçbir zaman sabırlarını esirgemeyen annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu süre boyunca her konuda yardımını ve bilgisini aktaran, sabrını esirgemeyen yol arkadaşım ve eşim İlke'ye her şey için teşekkür ederim.



## SİMGELER VE KISALTMALAR

µL	Mikrolitre
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BNV	Batı Nil virus
bp	Baz çift, Base Pair
CDC	Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi
cDNA	Complementary DNA
CHIKV	Chikungunya virus
cm	Santimetre
DENV	Dengue virus
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotit Tri Phosphate
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ECDC	Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi
EEA	Avrupa Çevre Ajansı
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ICTV	Uluslararası Virus Taksonomisi Komitesi
kb	Kilo baz
KKKAV	Kırım Kongo Kanamalı Ateşi orthonairovirus
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
ml	Mililitre
mRNA	Messenger RNA
N	Nükleokapsid
NCBI	National Center Biotechnology Information
nm	Nanometre
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRNT	Plaque Reduction Neutralization Test
RNA	Ribo Nükleik asit
RT	Reverse transcription
SFNV	Sandfly fever Naples phlebovirus

SFSV	Sandfly fever Sicilian phlebovirus
TOSV	Toscana virus
USUV	Usutu virus
YFV	Yellow Fever virus
ZIKV	Zika virus



## ŞEKİLLER

Şekil.1.1.	BNV'nun virion ve genom organizasyonu	7
Şekil.1.2.	KKKA hastalığının dünyadaki durumu	14
Şekil.1.3.	BNV bulaşma döngüsü	20
Şekil.1.4.	<i>Hyalomma</i> cinsi kenelerinin yaşam döngüsü	22
Şekil.1.5.	<i>P. papatasi</i> 'nin Avrupa'da dağılımı	24
Şekil.1.6.	Bazı göçmen kuşların kullandığı göç rotaları	29
Şekil.3.1.	NPLEbo Primerleri ile yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	62
Şekil.3.2.	HRTGL primerleri ile yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	63
Şekil.3.3.	Nairovirus primerleri ile yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	63
Şekil.3.4.	SFNV primerleri ile yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	64
Şekil.3.5.	Flavivirus primerleri ile yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	64
Şekil.3.6.	PhIP2 primerleri ile yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	64
Şekil.3.7.	TBPVL primerleri ile yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	65
Şekil.3.8.	Organ inokulasyonlarına ait CPE görüntüleri	69
Şekil.3.9.	TOSV S segmentine ait filogenetik ağaç	76
Şekil.3.10.	TOSV S segmentine ait nükleik asit benzerlik tablosu	77
Şekil.3.11.	TOSV S segmentine ait aminoasit benzerlik tablosu	78
Şekil.3.12.	TOSV L segmentine ait filogenetik ağaç	80
Şekil.3.13.	TOSV L segmentine ait nükleotit benzerlik tablosu	81
Şekil.3.14.	TOSV L segmentine ait aminoasit benzerlik tablosu	82
Şekil.3.15.	BNV NS5 gen bölgesine ait filogenetik ağaç	84
Şekil.3.16.	BNV NS5 gen bölgesine ait nükleotit benzerlik tablosu	85
Şekil.3.17.	BNV NS5 gen bölgesine ait aminoasit benzerlik tablosu	86
Şekil.4.1.	2017 yılında takip cihazı takılmış kuşların hareketleri	89

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge.1.1.</b>	Bazı önemli Arbovirusların Sınıflandırılması	2
<b>Çizelge.1.2.</b>	Bazı Önemli Arboviruslar	5
<b>Çizelge.1.3.</b>	KKKAV S segmenti için tanımlanmış Genetik Hat ve gruplar	12
<b>Çizelge.2.1.</b>	Araştırma kapsamında kullanılan kuşların Tür/Cins dağılımı	47
<b>Çizelge.2.2.</b>	Hatay bölgesinde çalışmaya dahil edilen 61 kuşa ait örneklerin dağılımı	48
<b>Çizelge.2.3.</b>	Samsun bölgesinde çalışmaya dahil edilen 56 kuşa ait örneklerin dağılımı	49
<b>Çizelge.2.4.</b>	Araştırma kapsamında tanısal amaçla yapılan in vitro amplifikasyon uygulamalarında kullanılan primer/prob özellikleri	53
<b>Çizelge.2.5.</b>	PCR uygulamaları için kullanılan amplifikasyon protokolleri	55
<b>Çizelge.3.1.</b>	Çalışma kapsamında kullanılan kuş/organ dağılımı	60
<b>Çizelge.3.2.</b>	Çalışmada toplanan ve virolojik yönden pozitif olarak tespit edilen kuşların dağılımı	61
<b>Çizelge.3.3.</b>	Çalışmada virolojik yönden pozitif olarak tespit edilen kuşların dağılımı	62
<b>Çizelge.3.4.</b>	Farklı primerler ile TOSV pozitif tespit edilen kuş/organ/primer dağılımı	66
<b>Çizelge.3.5.</b>	Hücre kültürü CPE takip Listesi	73
<b>Çizelge.3.6.</b>	Genbank'tan alınan kayıt numaraları	74

# 1.GİRİŞ

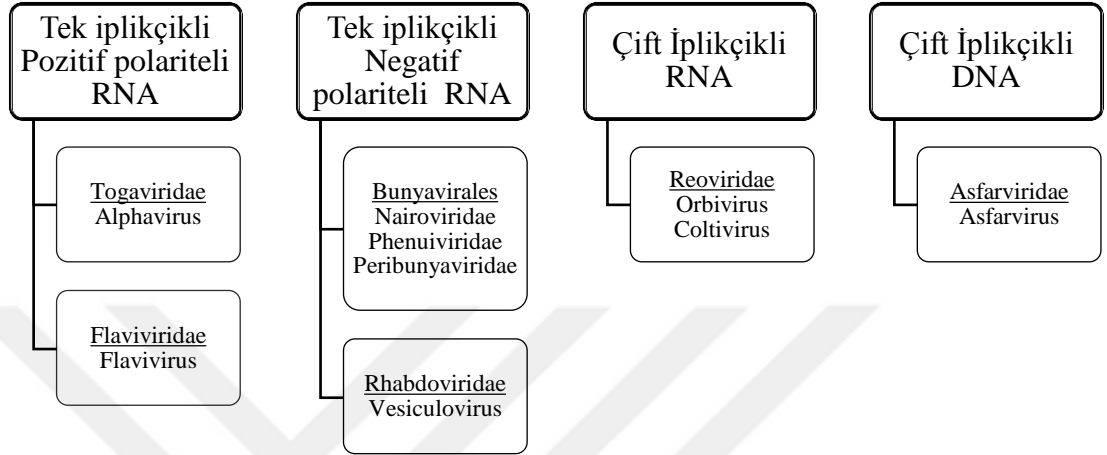
## 1.1. Arboviruslar

Son yıllarda yeni enfeksiyöz ajanların oluşturduğu hastalıkların tespitinde bir artış yaşanmakta ve tespit edilen yeni ajanların çoğunluğunu zoonoz viruslar oluşturmaktadır. Tüm bu gelişmeler, yeni ve yeniden çıkan patojenler adı altında bir kategorinin oluşturulmasını sağlamıştır. Bu kategorinin içinde Arboviruslar (arthropod kaynaklı viruslar), oldukça önemli yer tutmaktadır. Arboviruslar, enfekte vertebralı bir konaktan diğer konağa kan emen sivrisinek, kene, tatarcık gibi arthropod vektörler aracılığı ile nakledilmektedir. Biyolojik vektörler arbovirusların bulaşında rol oynayarak, viremik konakçıdan beslendikten sonra virusun kendi vücudunda çoğalmasını desteklemekte ve bir başka vertebralı konakçıdan beslenirken virüsü konakçıya bulaştırabilmektedir. Büyük çoğunluğu zoonoz olan arbovirusların doğal konakçıları arasında yabani hayvanlar ağırlıktadır (Pfeffer ve Dobler, 2010 ve Webster ve Stapleford, 2017). Gelişen teknoloji ile birlikte ulaşım olanaklarının da gelişmesi sayesinde de viruslar kısa sürede uzun mesafeler kat edebilmektedir. Silvatik (ormansal) bulaşma döngüsünde insanlar vücutlarında yeni bir bulaşmaya yetecek miktarda viremi oluşturamadıklarından son konakçı olarak yer almaktadır. Epidemik (şehirsel) bulaşma döngüsünde ise, arboviruslar insan konakçılarına üst düzeyde adaptasyon sağladıklarından, hayvan rezervuara ihtiyaç duymadan vektörler aracılığı ile insanlar arası bulaşma gerçekleştirebilmektedirler (Pfeffer ve Dobler, 2010 ve Webster ve Stapleford, 2017).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC)'nin yayınladığı Arbovirus Katoloğu'nda toplam 537 virus tanımlanmakta ve bu virusları içinde barındıran birçok virus ailesi bulunmaktadır (CDC, 2019). Bunların arasında *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Rhabdoviridae*, *Asfarviridae* ve *Reoviridae* ailesi ile *Bunyavirales* takımı içerisinde yer alan viruslar çoğunlukla zoonoz karakterde olmaları nedeniyle öne çıkmaktadır. *Asfarviridae* ailesinde bulunan çift zincirli DNA virüsü olan

African swine fever virus dışındaki arboviruslar RNA genomuna sahip virustardır (Webster ve Stapleford, 2017) (Çizelge 1.1).

Çizelge.1.1. Bazı önemli Arbovirusların sınıflandırılması



RNA viruslarının enfeksiyon sırasında viral çeşitliliğini sürdürmesi biyolojileri açısından önemlidir. Bu viral çeşitliliğin oluşması, hızlı replikasyon döngüsü ve tashih (proofreading) olarak da adlandırılan hata-düzeltilme mekanizması olmayan polimeraz aktivitesi sayesinde olmaktadır. Viruslar, bu mekanizmalar ile kısa bir süre içinde bireyde geniş yelpazede çeşitliliğe ulaşmakta ve hızlı mutasyona uğrayarak, buldukları ortama da hızla bir şekilde adapte olmaktadır. Birçok olguda bu hata düzeltici olmayan replikasyon mekanizması ile önemli genetik çeşitlilikler meydana gelmektedir. Bu çeşitlilik sayesinde de konakçı, vektör, iklim şartları ve diğer şartlarda çoğalmasını devam ettiren virus suşu üremeye devam ederek en güçlü olan suş bulaşmaya devam etmektedir (Coffey ve ark., 2013 ve Weaver, 2006).

Arbovirusların en önemli özelliği, başarılı bir şekilde hem insekt vektörlerde (sivrisinek, kene, tatarcık vb.), hem de hayvan konaklarda çoğalabilmeleridir. Bu çoğalma döngüleri sırasında, çok kısa süre içerisinde çok değişik konakçıları kullanmaları sebebiyle farklı çevre koşullarına adaptasyonları da hızlı olmaktadır. Bu adaptasyon özellikleri, en fazla yeni bir coğrafyaya virus girdiği zaman karşısına çıkan yeni konakçı, yeni vektör ve yeni değişkenlere uyum sağlayarak salgınlara neden oldukları zaman dikkat çekmektedir (Weaver ve Barrett, 2006).

Arbovirusların içindeki bazı önemli viruslar arasında Yellow Fever virus (YFV, Sarı Humma), Dengue virus (DENV), Zika virus (ZIKV), Batı Nil virus, Usutu virus (USUV), Chikungunya virus (CHIKV), Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Orthonairovirus (KKKAV) ve Phleboviruslar bulunmaktadır (Çizelge 1.2).

Sarı Humma virusu, sivrisinek kaynaklı bir flavivirus enfeksiyonudur. Afrika'nın ekvatorial bölgelerinde, Güney Amerika'da ve Kuzey Amerika'nın bazı bölgelerinde virus sirküle olmaktadır. Genellikle *Aedes aegypti* sivrisineklerinin dahil olduğu silvatic ve kentsel bulaşma siklusu vardır. Sivrisinekler aracılığı ile kişiden kişiye bulaşma gerçekleşmektedir. Riskli bölgelere gitmeden önce yapılan aşı ile ömür boyu koruma sağlanmaktadır. Hastalık semptomları arasında bulunan sarılık hastalığa ismini vermiştir (DSÖ, 2018).

Chikungunya virus (CHIKV) Togaviridae ailesinde bulunan ve sivrisinekler ile bulaşan bir Alphavirus'tur. Ülkemizde de bulunan *Aedes albopictus* türü sivrisinek ana vektörü olarak tanımlanmıştır. İlk olarak 1952 yılında Tanzanya'da bildirildikten sonra günümüzde Afrika, Asya, Avrupa ve Amerika'ya yayılmış önemli insan patojenleri arasında bulunmaktadır (Arias-Goeta ve ark., 2014 ve Powers ve ark., 2000).

'Dandy Fever' (Dandy Ateşi) ve kemik kıran ateşi olarak 1700'lü yıllarda tanımlanan DENV, birçok pandemiye neden olmuştur. Bu hastalık ile Chikungunya virusunun oluşturduğu klinik tabloların, insanlar tarafından karıştırıldığı düşünülmektedir. DENV enfeksiyonunda arthritislerin görülmeyip CHIKV'de tespit edildiği bildirilmiştir (Halstead, 2015 ve Pettersson ve Fiz-Palacios, 2014). DENV'un dört farklı serotipi bulunmaktadır (Sweet ve Sabin, 1954). İnsan nüfusunun, yaklaşık %40'ı tropikal ve subtropikal bölgelerde yaşamakta ve Dengue hastalığı açısından da risk altında bulunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre senelik ortalama 390 milyon vaka görülmektedir (DSÖ, 2018). Dengue hastalığının şiddetli seyretmesinin nedenleri arasında, antikor bağımlı yükselme (ADE) mekanizmasının rolü olduğu düşünülmektedir. Bu hipoteze göre, ilk DENV enfeksiyonundan (bir serotip için) kalan düşük affiniteli, çapraz reaktif, nötralize

edemeyen antikorlar, aynı insanda ikinci serotip ile oluşan enfeksiyonu güçlendirmektedir. Son zamanlarda, DENV spesifik antikorların, diğer ilişkili virüslerde da (ZIKV gibi) hastalığı ağırlaştığı düşünülmektedir (Castanha ve ark., 2017; Paul ve ark., 2016; Pettersson ve Fiz-Palacios, 2014 ve Sreaton ve ark., 2015).

Zika virus (ZIKV) *Aedes aegypti* ile bulaşarak özellikle fötuslarda nörolojik hastalıklara neden olan sivrisinek kaynaklı bir flavivirustur (Pettersson ve Fiz-Palacios, 2014). İlk olarak 1947 yılında Uganda'da maymunlarda tespit edilmiştir. Günümüzde ise Afrika, Amerika, Asya ve Pasifikler'de halen salgınlara neden olmaktadır. Son olarak 2015 yılında Brezilya'da büyük bir salgına neden olmuştur (DSÖ, 2018).

Usutu virus (USUV), ötücü kuşlar ve baykuşları rezervuar olarak; *Culex* sivrisineklerini de vektör olarak kullanan, sivrisinek kaynaklı bir flavivirustur (Ashraf ve ark., 2015). USUV, Avrupa'da görülen bazı kuş ölümlerinde tespit edilmiştir (Weissenböck ve ark., 2013). Kuşlarda neden olduğu postmortem bulgular arasında hepatomegali, splenomegali, zayıflık ve böbreklerde hemoraji yer almaktadır (Lecollinet ve ark., 2016).

### **1.1.1.Arbovirusların Genetik Özellikleri**

#### **1.1.1.1.Flavivirus'ların Özellikleri**

Yapılan çalışmalar, flavivirusların kökeninin yaklaşık 100.000 yıl öncesine uzandığını, sivrisinek ve kene kaynaklı flavivirusların ise yaklaşık 40.000 yıl önce birbirlerinden farklılaşmaya başladığını ortaya koymaktadır (Pettersson ve Fiz-Palacios, 2014). Flaviviruslar, daha önceleri Togaviruslar içinde sınıflandırılırken, 1984 yılında yapısal farklılıklar, gen sekansları ve replikasyon stratejilerine dayanılarak yapılan analizler sonucunda *Flaviviridae* ailesi olarak ayrılmışlardır (Westaway ve ark., 1985).

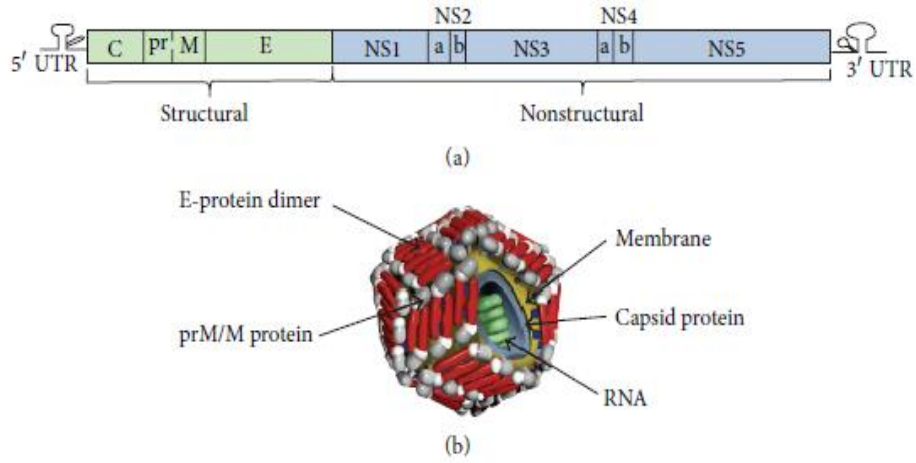


**Çizelge.1.2.** Bazı önemli Arboviruslar.

<b>Aile</b>	<b>Virus</b>	<b>Vektör</b>	<b>Rezervuar</b>
Togaviridae	<b>Alphavirus</b>		
	Chikungunya virus (CHIKV)	Sivrisinek	Insan, primat
	Ross River virus (RRV)	Sivrisinek	Insan, keseliler
	Mayaro virus (MAYV)	Sivrisinek	Kuş
	Sinbis virus (SINV)	Sivrisinek	Kuş
	Eastern equine encephalitis virus (EEV)	Sivrisinek	Kuş
	Western equine encephalitis virus (WEEV)	Sivrisinek	Kuş, tavşan
	Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV)	Sivrisinek	Rodent
Flaviviridae	<b>Flavivirus</b>		
	Dengue virus (DENV)	Sivrisinek	Insan, primat
	Yellow Fever virus (YFV)	Sivrisinek	Insan, primat
	Japanese encephalitis virus (JEV)	Sivrisinek	Kuş, domuz
	Zika virus (ZIKV)	Sivrisinek	
	Murray Valley encephalitis virus (MVE)	Sivrisinek	Kuş
	St. Louis encephalitis virus (SLE)	Sivrisinek	Kuş
	Batı Nil virus (BNV)	Sivrisinek	Kuş
	Tick-borne encephalitis virus (TBEV)	Kene	Kuş, rodent
	Alkhumra hemorrhagic fever virus (AHFV)	Kene	
Phenuiviridae	<b>Phlebovirus</b>		
	Sandfly fever Naples phlebovirus (SFNV)	Tatarcık	
	Rift Valley fever phlebovirus (RVFV)	Sivrisinek	
	Toscana virus (TOSV)	Tatarcık	
	severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV)	Kene	
Peribunyaviridae	<b>Orthobunyavirus</b>		
	La Crosse orthobunyavirus (LACV)	Sivrisinek	Rodent
	Oropouche virus orthobunyavirus (OROV)	Tatarcık, Sivrisinek	
Nairoviridae	<b>Orthonairovirus</b>		
	Kırım Kongo Kanamalı Ateşi orthonairovirus (KKKAV)	Kene	Rodent, koyun
Reoviridae	<b>Coltivirus</b>		
	Colorado tick fever virus (CTFV)	Kene	
	<b>Orbivirus</b>		
	Mavidil virus (BTV)	Sokucu Sinek	
Rhabdoviridae	<b>Vesiculovirus</b>		
	Indiana vesiculovirus	Sivrisinek,Tatarcık	
Asfarviridae	<b>Asfarvirus</b>		
	African swine fever virus	Kene	Yaban domuzu

Flaviviruslar, Flaviviridae ailesindeki en büyük genustur. Uluslararası Virus Taksonomisi Komitesi'ne (ICTV, 2018) göre Flavivirus genusunda 53 virus türü bulunmaktadır. Yellow fever virus (YFV), Japanese Encephalitis virus (JEV), Batı Nil virus (BNV), Zika virus (ZIKV) ve Dengue virus (DENV) bu genusta en çok bilinen sivrisinek kaynaklı virustlardır ve dünya nüfusunun üçte birini etkilemektedirler (Lazear ve Diamond, 2016).

BNV, Flaviviridae ailesinde Flavivirus genusunda yer alan ve Japon encephalitis virus serokompleksinde sınıflandırılan bir RNA virusudur. Virion, 40-60 nm çapında zarflı ikosahedral yapıya sahiptir (Castle ve ark., 1986). Genom yaklaşık 11 kb büyüklüğünde, pozitif polariteli, lineer tek iplikçikli ssRNA'dan oluşmaktadır. Genomun 5' ucunda tip 1 cap bulunurken, 3' ucu ise poliadenile (polyA) değildir (Bisaillon ve Lemay, 1997 ve Cleaves ve Dubin, 1979). Viral ve konakçıya ait proteazlar ile poliproteinden 10 farklı protein elde edilmektedir (Apte-Sengupta ve ark., 2014; Brecher ve ark., 2013 ve Zhang ve ark., 2016). Bunlardan üçü yapısal [kapsid proteini (C), membran proteini (M) ve zarf proteini (E)], yedisi ise yapısal olmayan (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B ve NS5) proteinlerdir (Mukhopadhyay ve ark., 2005; Romero-Breyand Bartenschlager, 2016 ve Welsch ve ark., 2009). C proteininin çok sayıdaki kopyası RNA'yı çevreleyerek viral nükleokapsidi oluşturmaktadır (Jones ve ark., 2003). Nükleokapsid, M ve E proteinlerinin çok sayıdaki kopyası olan konakçı-hücre kökenli lipid yapılı zarf tarafından sarılmaktadır (Şekil 1.1). M proteini, proteolitik bir fragmenttir ve öncül formu prM'dir. Virion zarfının ana proteini olan E proteini, konakçı-hücre reseptörlerini tanımada rol oynamaktadır ve nötralizan antikörlerin ana hedefidir. Bu proteindeki mutasyonlar nedeniyle virion virülens kaybına uğramaktadır (Contigiani ve ark., 2017, s:74).



Şekil.1.1. BNV'nun virion ve genom organizasyonu (Chancey ve ark., 2015).

NS1, viral RNA replikasyon sürecine katılmaktadır ve salgılanan ilk viral proteindir. Ayrıca, güçlü bir sıvısal bağışık yanıt indükleyicisidir. NS2A proteininin viral polimeraz ilişkili RNA kalıplarının geri dönüşümünde, konakçı antiviral yanıtının modülasyonunda, NS1-NS2A birleşiminin translyasyondan sonra ayrılmasında ve viral replikaz kompleksinde fonksiyonel rollerinin olduğu düşünülmektedir (Contigiani ve ark., 2017, s:74). NS2B ise membran ilişkili küçük bir proteindir ve NS2B-NS3 kompleksinde serin-proteaz aktivitesinde kofaktör olarak görev yapmaktadır. NS3 büyük bir sitoplazmik proteindir, poliprotein işleminde ve viral RNA replikasyonunda birçok enzimatik aktivitede (proteaz, helikaz) rolü bulunmaktadır. NS4A ve NS4B, membran ilişkili küçük hidrofobik proteinlerdir ve viral RNA replikasyonunda görev almaktadırlar. Flavivirus genusundaki virusların en büyük ve en korunaklı proteini NS5 proteindir. N-terminal bölgesinde metiltransferaz ve C-terminal motiflerinde RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRp) aktivitesi bulunmaktadır (Contigiani ve ark., 2017, s:74; Khromykh ve ark., 1999; Koonin, 1993 ve Lu ve Gong, 2013) (Şekil 1.1).

#### **1.1.1.1.1.Flavivirusların Replikasyonu**

Virusun hücreye girişi reseptör aracılı endositozis ile olmaktadır. Bu aşamada, E proteini tanınma ve hücre adsorbsiyonu için viral reseptör olarak rol oynamaktadır. Endositik vezikül şekillendiğinde, içerisindeki asidik pH nedeniyle, E proteininde yapısal değişimler meydana gelmektedir. Sonrasında ise, endozom-virion membranında füzyon şekillenir ve nükleokapsid sitoplazmaya geçer. Bunun yanında, viral zarf ile hücresel membranda da direkt füzyon gelişebilir. Bu viral soyulma işlemi tamamlandıktan sonra, replikasyon aşaması başlamaktadır. Viral RNA replikasyonu, perinükleolar bölgede gerçekleşir ve negatif polariteli tamamlayıcı tek iplikçik sentezi başlar. Bu iplikçik, pozitif iplikçik sentezinde kalıp olarak görev almaktadır. Genomik viral RNA, direkt olarak messenger RNA olarak kullanılır. Endoplazmik retikulumda, yeni viral partiküller oluşur ve bunlar sonrasında hücre dışına taşınır. Trans-Golgi ağındaki asidik pH'nın, prM-E kompleksindeki partikül olgunlaşması için gerekli değişimleri oluşturduğu tespit edilmiştir (Contigiani ve ark., 2017, s:75).

#### **1.1.1.1.2. BNV'nin Filogenetik Dağılımı**

Elde edilen genetik sekanslara ve filogenetik analizlere dayanılarak yapılan çalışmalar sonucunda BNV 7 genetik hatta incelenmektedir. Bunlardan Genetik Hat 1 ve 2 en çok yayılım gösteren genetik hatlardır (Bakonyi ve ark., 2005; Berthet, 1997; Lanciotti ve ark., 2002; Scherret ve ark., 2001 ve Vazquez ve ark., 2010).

- Genetik Hat 1: Tüm dünyada yaygın viruslar
- Genetik Hat 2: Sınırlı bölgelerde yayılmış viruslar
- Genetik Hat 3: Rabensburg suşu (Bakonyi ve ark., 2005)
- Genetik Hat 4: LEIV-Krmd88-190 (Lvov ve ark., 2004)

- Genetik Hat 5: Hindistan izolatu (Bondre ve ark., 2007)
- Genetik Hat 6: Malezya izolatu (Scherret ve ark., 2001)
- Genetik Hat 7: İspanya izolatu (Vazquez ve ark., 2010)

Genetik Hat 1 kendi içinde 1a, 1b ve 1c olmak üzere 3 alt gruba (clade) ayrılmaktadır (Bakonyi ve ark., 2005). Afrika, Avrupa, Orta Doğu, Rusya ve Amerika'daki salgınlardan 1a izole edilmiştir. Avustralya'da bulunan BNV'nin alt tipi olan Kunjin virusun (KUNV) izolatları 1b olarak tanımlanırken, 1c ise sadece Hindistan izolatlarını içermektedir.

Genetik Hat 1 alt grup 1a, 1990'ların ortalarından bu yana birçok BNV epidemilerinin etkeni olarak Afrika, Avrupa, Orta Doğu ve Amerika'da tespit edilmektedir. Bu alt grupta altı küme tanımlanmaktadır. Küme 1'deki izolatlar Afrika ile Avrupa'dan; Küme 2 ve 4'deki izolatların çoğu Avrupa ve Amerika'daki salgınlardan; küme 3'te yer alan izolatlar ise, Rusya'da Volga deltasında Astrakhan'da izole edilmiştir. Küme 5 ve 6'nın da Merkez ve Batı Afrika'dan elde edilen sekansları mevcuttur (Fiona ve ark., 2011).

2004 yılına kadar Genetik Hat 2'nin Madagaskar ve Güney Afrika'daki salgınlardan sorumlu olduğu düşünülürken, sonraki yıllarda Macaristan'daki kuşlarda, Rusya'da, Yunanistan ve Türkiye gibi farklı ülkelerde de sirküle olduğu tespit edilmiştir (Bakonyi ve ark., 2005; Bakonyi ve ark., 2006; Erdelyi ve ark., 2007; Monaco ve ark., 2016 ve Papa ve ark., 2010). Genetik Hat 3, 1997 yılında Avusturya'da sivrisinekten elde edilmiştir (Bakonyi ve ark., 2005). Genetik Hat 4'e ait ilk virus 1988 yılında Rusya'nın Kafkasya bölgesinde bir kenede tespit edilmiştir (Lvov ve ark., 2004). Genetik Hat 5 ise, önceleri alt grup 1c'de değerlendirilmesine karşın, elde edilen veriler sonucunda ayrı bir genetik hat olarak sınıflandırılmıştır (Bondre ve ark., 2007 ve Erdelyi ve ark., 2007).

### 1.1.1.2.Nairovirusların Özellikleri

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virusu (KKKAV, Crimean Congo hemorrhagic fever) ile ilgili ilk bilgiler, 12. yüzyılda Tacikistan'a kadar uzanmaktadır. Bu tarihlerdeki verilerde, kanamalı hastalığın klinik bulguları arasında idrarda, rektumda, diş etlerinde, salyada ve abdominal boşlukta kanamaların dikkat çektiği kaydedilmiştir. Aynı zamanda, *Hyalomma* cinsi kene larvalarının, karatavuklarda sıklıkla tespit edilmesi nedeniyle de karatavuk kuşlarındaki kene veya bit kaynaklı bir hastalık olduğu da vurgulanmıştır (Hoogstraal, 1979). KKKA hastalığı yüzyıllardır farklı ülkelerde farklı isimler ile anılmıştır. Özbekistan'da “*kan alıcı*” veya “*kara ölüm*” gibi isimler verilmiştir (Chumakov, 1974 ve Hoogstraal, 1979).

KKKAV, 1944-1945 yıllarında Kırım bölgesinde bulunan çiftliklerde görevli askerlerde görülen semptomlar ile kendini göstermiştir (Grashchenkov, 1945). Bu semptomların kaynağına yönelik yapılan çalışmada, keneler parçalandıktan sonra filtrelerden geçirilmiş, deneysel çalışmalarda filtre edilmiş bu homojenatın inokulasyonu yapılmış ve elde edilen bulgular ile bu hastalığın nedeninin viral bir ajan olduğu gösterilmiştir (Bilibin, 1950 ve Neklyudov, 1952). Kırım'da görülen KKKAV'un dahil olduğu salgın, sadece tarım ile uğraşan insanlar ile sınırlı kalmıştır. Ayrıca salgının görüldüğü dönemde, sahada çok fazla sayıda kene olduğu tespit edilmiş ve vakaların büyük çoğunluğunun kene tutunmaları ile bağlantılı olduğu görülmüştür. Bu dönemdeki kayıtlarda insan-insan bulaşması ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. Salgının görüldüğü bölgede hastalık kaynağı için yapılan araştırmalar sırasında, birçok kan emen artropod toplanmış ve en fazla tespit edilen artropod türü, günümüzde de KKKAV'nün ana vektörü olarak bilinen, *Hyalomma marginatum* olmuştur (Grashchenkov, 1945).

Kongo'da 1956 yılında hasta bir çocukta tespit edilen Kongo virusun, 1969 yılında Kırım'daki virus ile aynı olduğu tespit edilmiş ve bu virusların isimleri birleştirilerek günümüzdeki “Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virusu” adını almıştır (Chumakov ve ark., 1969).

KKKAV, Bunyavirales takımında, Nairoviridae ailesinde Orthonairovirus genusunda yer almaktadır (ICTV, 2018). KKKAV 90-100 nm çapında zarflı, helikal simetriye sahip bir virustur ve virion negatif polariteli, tek iplikçikli, small (S), medium (M) ve large (L) olmak üzere üç segmentli RNA sahiptir. Bu üç segmentin her biri tek bir açık okuma bölgesi (ORF) içermektedir (Schmaljohn ve Nichol, 2007). S segmenti, nükleoproteini kodlamaktadır (Wang ve ark., 2012). M segmenti, tip 1 transmembran glikoproteinler olan Gn ve Gc'nin endoplazmik retikulum ve Golgi cisimciğinden oluşma mekanizmasına katılan bir poliprotein kodlamaktadır (Altamura ve ark., 2007). Enfeksiyon sırasında bu Gn ve Gc proteinlerine karşı nötralizan antikorlar oluşmaktadır (Bente ve ark., 2013). Beklenildiği gibi en fazla mutasyon yüzey glikoproteinlerinin sentezlendiği M segmentinde olmaktadır (Deyde ve ark., 2006). L segmenti ise, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), olarak görev yapmaktadır.

KKKAV, segmentlere göre genotiplere ayrılmaktadır. S, M ve L segmentlerine göre genetik çeşitlilik sırasıyla %20, %31 ve %22 olarak tespit edilmiştir. S segmentine göre sınıflandırma daha fazla tercih edilmektedir (Deyde ve ark., 2006). Buna karşın, dünyada KKKAV'nin genotiplere ayrılmasında farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin; Carrol ve ark. (2010), Bayesian metodu kullanarak yaptığı sınıflandırmada bu virusu 6 genotipe (genotip I-VI) ayırırken, Atkinson ve ark. (2012) yaptıkları sınıflandırmayı coğrafik dağılıma göre yaparak 7 genotipe (Asya 1-2, Avrupa 1-2, Afrika 1-2-3) ayırmakta, Mild ve ark. (2010) ise, farklı analizler kullanarak bu virusu 7 genotipe (genotip 1-7) ayırmışlardır (Çizelge 1.3).

#### **1.1.1.2.1. KKKAV'nün Genotipik ve Coğrafik Yayılımı**

Avrupa 1'de yer alan izolatların çoğunlukla Doğu Avrupa'da salgınlara neden olduğu, Avrupa 2'deki izolatların da oldukça yaygın olduğu (Yunanistan'da kenelerden izole edilen AP92 suşu) fakat subklinik seyrettiği veya ağır klinik tablo oluşturmadığı tahmin edilmektedir (Zehender ve ark., 2013).

**Çizelge.1.3.** KKKAV S segmenti için tanımlanmış Genetik Hat ve gruplar (Dreshaj ve ark., 2016).

Ülkeler	Carrol ve ark., 2010'a göre	Atkinson ve ark., 2012'a göre
İran, Güney Afrika, Senegal, Mauritanya	I	Afrika 3
Güney Afrika, Namibia, Kongo, Uganda	II	Afrika 2
Güney Afrika, Namibia, BAE, Senegal, Mauritanya, Nijerya, Burkina Faso, Merkez Afrika	III	Afrika 1
İran, Pakistan, BAE, Madagaskar, Oman, Irak, Çin, Özbekistan, Kazakistan, Tacikistan	IV	Asya 1, Asya 2
İran, Türkiye, Yunanistan, Rusya, Bulgaristan, Kosova, Arnavutluk	V	Avrupa 1
Türkiye, Yunanistan	VI	Avrupa 2

Yapılan filodinamik ve filocoğrafik analizler ile bilinen KKKAV izolatlarının yaklaşık bin yıl önceki ortak bir atadan köken aldığını ve bu ortak atanın da Afrika orjinli olabileceğini önermektedir (Zehender ve ark., 2013). Daha sonra 17.yüzyılın ortalarında, KKKAV'u Afrika'dan Orta Doğu'ya ulaşılarak iki farklı kola ayrılmaktadır. 19.yüzyılın başlarında da iki Asya genotipi oluşmuştur: İran ve Pakistan ile Çin ve Orta Asya (Özbekistan, Tacikistan) genotipleri (Zehender ve ark., 2013). Virus, Orta Doğu ve güneydoğu Asya'dan doğuya doğru bir yön izleyerek Himalaya dağlarının oluşturduğu doğal bariyerlere ulaşmıştır. Virusun, bu yayılım hareketleri incelendiğinde Avrasya ruminant göç rotasına uygun olduğu, Şap ve Sığır Vebası hastalıklarının dağılımı ile de uyduğu görülmektedir (Zehender ve ark., 2013). Avrupa'da bulunan iki farklı KKKAV suşunun bu coğrafyaya ulaşmasında iki olasılık üzerinde durulmaktadır. Bunlardan birincisi, 1800 yıllarında düşük patojen veya apatojen virus, hayvan/vektör hareketleri ile doğudan Yunanistan ve Türkiye'ye ulaşmıştır. İkincisi ise, 20. yüzyılın başlarında daha patojen olan suş bu bölgelere ulaşarak insanlarda salgınlara neden olmuştur (Zehender ve ark., 2013).

Yapılan filocoğrafik analizler sonucunda Avrupa 1'in olası kökeninin Rusya olması ağır basmaktadır. Bu duruma göre, KKKAV Avrupa 1, Avrupa'ya 1900'lü yıllarda Rusya'dan gelmiştir. Bu tespit önceden Avrupa'ya giriş noktasının Türkiye olduğu bildirilen raporlar ile örtüşmemektedir. Literatürde sunulan bilgiler birbirleri

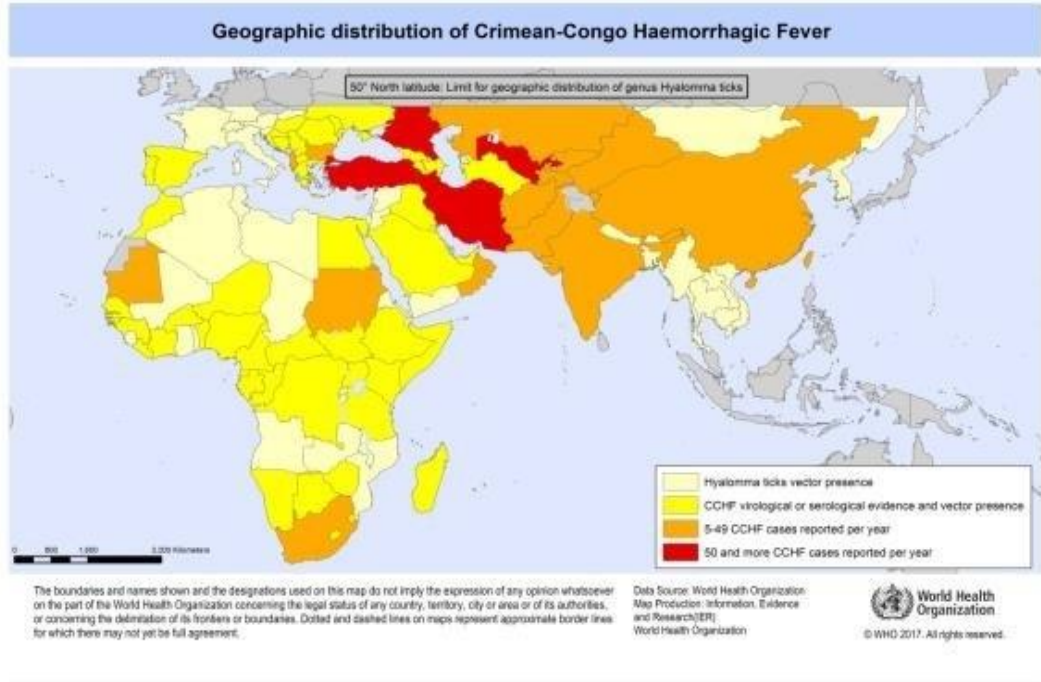


ile çelişse de virusun yayılımında Türkiye'nin Avrupa açısından merkezi bir rolü olduğu yapılan analizler ile desteklenmektedir (Zehender ve ark., 2013).

Trans-Sibirya tren yolu ve bu bölgede gerçekleşen savaşların (2. Dünya Savaşı, Kırım Savaşı vb.) da virus yayılımında çok büyük etkisi olduğu bildirilmiştir. Bu sırada da virusun Türkiye'ye ulaşarak öncelikle yaban hayatında sirküle olduğu ve daha sonra insan vakaları gerçekleştiği düşünülmektedir (Zehender ve ark., 2013). Türkiye'den de Balkanlara, Kosova ve Arnavutluk'a sıçramıştır. Bu sıçramanın nedeni olarak evcil ve yabani ruminantların hareketi ile bunların taşıdığı enfekte kenelerin de yeni bölgelere gelerek yayılması hipotezi bulunmaktadır. Aynı şekilde, Güney Afrika'da da KKKK hastalığının yayılımında enfekte kenelerin kuşlar aracılığı ile taşınmasının rolü olduğu belirtilmektedir (Zehender ve ark., 2013).

Bulgaristan'daki KKKAV genetik sekansları ile yapılan çalışmalar, bu ülkenin çok önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Aslında bu önemli rol Trakya bölgesinde bulunan üç ülkenin (Türkiye-Yunanistan-Bulgaristan) ortak sınırları olmasından kaynaklanmaktadır. Bu sınırlar da enfeksiyöz hastalıkların yayılmasında yüksek risk teşkil etmektedir (Zehender ve ark., 2013).

KKKK hastalığı, konakçı hayvanlarda tespit edilebilir klinik semptomla neden olmadığından dolayı, o bölgede bulunan insanlarda vakalar ortaya çıktığı zaman hastalığın varlığı anlaşılmaktadır. Hastalık görülme sıklığı, nüfusun tarım ve hayvancılık ile uğraşma oranına, avcılık faaliyetlerinin sıklığına ve doğal afet olaylarına bağlı olarak değişmektedir (Bente ve ark., 2013). Bulgaristan'da da 1950'li yıllarda ormanlık ve sulak alanlar tarıma açıldığında KKKAV insidensi yüksek oranda artmıştır. Kırım'da da 1944 yılında askerler terk edilmiş çiftlikleri aktif hale getirmek için o bölgelere gittiklerinde yüksek oranda kene ile temas etmişler ve enfekte olmuşlardır (Bente ve ark., 2013).



Şekil.1.2. KKKHA hastalığının dünyadaki durumu (DSÖ, 2018).

1944 yılında KKKAV tespit edildikten sonra Rusya'nın güney kısımları, batı Çin bölgesi, Güney Asya, Orta Doğu, Balkanlar, Afrika'nın büyük bir bölümü dahil dünyanın birçok yerine yayılmıştır (Şekil 1.2.). Bununla birlikte bazı ülkelerde insan vakası tespit edilmemişken, evcil ve yabani hayvanlarda veya kenelerde virus veya antikor tespitleri bulunmaktadır (DSÖ, 2018)

### 1.1.1.3. Phlebovirusların Özellikleri

Phleboviruslara dair ilk bulgular, 1937 yılında Yunanistan'da (Atina) büyük bir phlebovirus salgınına dayanmaktadır. İkinci Dünya Savaşı sırasında da Akdeniz bölgesindeki ve Orta Doğu'daki askerler arasında salgınların gerçekleştiğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Tesh ve Papaevangelou, 1977). İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra çıkan salgında ise, Belgrad'da binlerce insanın hasta olduğu raporlara geçmiştir (Karakashević ve ark., 1947).

Toscanavirus (TOSV), *Phlebovirus* genusunda en fazla klinik semptomu neden olan virustur. Bu virus diğerlerinde olduğu gibi "Sandfly" ateşinin yanı sıra

meningitis ve ensefalitis gibi merkezi sinir sistemi bulgularına da neden olmaktadır. TOSV'ün bu merkezi sinir sistemi bulguları, İtalya ve Portekiz gibi ülkelerden dönen turistlerde fazla miktarda tespit edilmektedir (Calisher ve ark., 1987).

ICTV'nin 2018'de yayımlanan onuncu raporuna göre TOSV, Sandfly Fever Naples Phlebovirus türünde, *Phlebovirus* genusunda, *Phenuiviridae* ailesi *Bunyavirales* takımında yer almaktadır. Phleboviruslar, yaklaşık 80-120 nm çapında, ikozahedral simetriye sahip zarflı viruslardır. Zarfın yüzeyindeki glikoproteinler, T = 12 simetri ile bir ikozahedral kafes üzerinde yerleşmiştir.

Genom, negatif polariteli, doğrusal üç RNA segmentinden oluşmaktadır. Large (L) segmenti yaklaşık 6.4 kb, medium (M) segmenti yaklaşık 3.2 kb ve Small (S) segmenti ise yaklaşık 1.7 kb'dir. L segmenti viral RNA-bağımlı RNA polimeraz kodlanmasından, M segmenti poliprotein prekürsor kodlanmasından (ayrılma sonrası zarf glikoproteinleri Gn ve Gc sentezi) ve S segmenti de nükleoprotein (N) ve yapısal olmayan proteinlerin (NS) kodlanmasından sorumludur (Walter ve Barr, 2011). M ve L segmentleri, proteinleri negatif polariteli kodlarken, S segmenti ambisens kodlamaktadır (Simons ve ark., 1990). Diğer segmentli viruslarda olduğu gibi bu ailede de genetik reassortment görülebilmektedir (Henderson ve ark., 1995 ve Li ve ark., 1995).

Phleboviruslar çoğunlukla tatarcıklar (sandfly) ile bulaşırken bazıları sivrisinek (Rift Valley fever virus) ve keneler (Uukuniemi virus) ile de bulaşmaktadır.

Sandfly fever Naples phlebovirus türü içerisinde (Maes ve ark., 2018) :

Balkan virus (BALKV),

Gordil virus (GORV),

Massilia virus (MASV),

Sandfly fever Turkey virus (SFTV)

Fermo virus (FERV),

Granada virus (GRV = GRAV),

Punique virus (PUNV),

Sandfly fever Naples virus (SFNV)

Sandfly fever Sicilian virus (SFSV)

Zerdali virus (ZERV)

Toscana virus (TOSV)

bulunmaktadır.

#### **1.1.1.3.1. Phlebovirusların Sınıflandırılması ve Replikasyon**

Phleboviruslar, sitoplazmada replike olup golgiden tomurcuklanarak olgunlaşmaktadır. Virionlar yaklaşık 100 nm çapında ve dört proteinden oluşur. Bunlar, Gn ve Gc olmak üzere iki glikoprotein, golgiden köken alarak viral membranı şekillendirir ve iki internal protein, üç genom segmentinin ribonükleoprotein kompleksi formunda enkapsidasyonunda görevli nükleokapsid (N) proteini ve L proteindir (RNA bağımlı RNA polimeraz). Tüm Phleboviruslarda karakteristik olarak S genom segmentinde ambisens kodlama stratejisi görülmektedir. Bu durumda, N proteini negatif polariteli kodlanırken, NS proteini pozitif polariteli kodlanmaktadır (Elliott ve Brennan, 2014).

Yapılan genetik analizler, TOSV'nin S segmentinin korunmuş olduğunu, L segmentinin M segmentine göre daha az korunmuş olduğunu ve M segmentinin ise nükleotid farklılığının en fazla olduğunu ortaya koymaktadır. Elde edilen sekans verilerine göre, TOSV A, B ve C olmak üzere 3 genotipe ayrılmaktadır. TOSV A ve B arasında yapılan karşılaştırmaya göre, L segmentleri arasında %85,2; M segmentleri arasında %81,8 ve S segmentinin N gen bölgesinde %87,9 oranında benzerlikler olduğu ortaya konulmuştur (Callao ve ark., 2009).

#### **1.1.2. Vektör Kaynaklı Virusların Canlılığını Koruma Yolları**

Vektör kaynaklı patojenlerin mevsim geçişlerinde veya salgınlar arasında canlılığını koruma yolları önemlidir. Bu hastalıkların, vektör aktivitesinin yoğun olduğu uygun hava koşullarında konakçı-vektör temasının fazla olması nedeniyle görülme sıklığı da yüksek olmaktadır. Hava sıcaklıkları azalmaya başladığında ise,

vektör aktivitesi azalır, omurgalı konakçı göç eder veya kış uykusuna yatar. Ortam şartları uygun olmasa da patojenlerin canlılığını sürdürmelerinin değişik yolları bulunmaktadır: (Reisen, 2017, s:26)

- *Sürekli bulaşma*: Uygun olmayan hava koşullarında, vektörler tam olarak aktif olmadan da kısa aralıklar ile aktif olabilmekte ve düşük oranlarda olsa da patojenleri bulaştırmaya devam edebilmektedir. Tropikal bölgelerde ise kuru geçen zamanlarda, su kaynaklarının kenarında bazı vektörler, aktivitelerine düşük olsa da devam edebilmektedir (Reisen, 2017, s:27).
- *Aktif olmayan enfekte vektörler*: Birçok ergin veya olgunlaşmamış vektör, kan emmeden, aktif olmadığı bir dönem geçirmektedir. Vertikal olarak enfekte olmuş vektörler hayat boyu enfektelidir. BNV, erişkin dişi *Culex* sivrisineklerinde kış süresini geçirebilmektedir. *Aedes* ile bulaşan ve transovarial yol ile geçen başka bir viral enfeksiyonda yumurtalar da enfekte olmaktadır. Bu yumurtalar birçok farklı oluklara bırakılmakta ve uzun yıllar boyunca hava koşulları uygun oluncaya kadar buralarda canlılıklarını koruyabilmektedir (Reisen, 2017, s:27).
- *Enfekte Omurgalı konakçı*: Rezervuar konakçılar, patojenlerin canlılığını devam ettirme yollarından bir diğeridir. Vektörlerin aktif olduğu dönemde veya uygun olmayan mevsimlerde bu rezervuar konakçılar, patojenlerin yayılmasında önemli rol oynamaktadır (Brunetti ve ark., 1954).

*Bölgesel Tükenme*: Uygun olmayan hava koşullarında patojenler bölgesel olarak tükenebilir. Böyle durumlarda, o bölgeye patojenin tekrar gelmesinde 2 farklı mekanizmanın rol oynadığı düşünülmektedir: (Reisen, 2017, s:27).

- *Göç eden vertebralı konakçı*: Birçok kuş türü, kış aylarında sıcak bölgelere göç etmekte ve sonra tekrar geri dönmektedir. Bu sırada, vücutlarında patojenler taşıyabilmektedir. Kuşların taşıdığı patojenlerin, uzun süren yolculukların neden olduğu stres ve göç sonrası üreme dönemleri sayesinde yayılması kolaylaşmaktadır. Ticaret nedeniyle, uzun mesafeli yapılan

taşımalar da, vektör ve patojenlerin farklı bölgelere taşınmasında rol oynayabilmektedir (Tatem, 2009).

- *Hava aracılı taşınma*: Enfekte vektörler güçlü hava akımları ile uzun mesafeler taşınabilmektedir. Örneğin, Muson akımları ile bazı vektörler Hindistan'dan yüzlerce kilometre uzaklara götürülebilmektedir. Japon ensefalitis virus'un Kuzey Avustralya'ya gelmesinin ve ABD ile Kanada'da Batı At Ensefalit virus hastalığının başlangıcının, güçlü fırtınalar ile vektörlerin taşınmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Kay ve Farrow, 2000).

*Enzootik Bulaşma*: Özellikle zoonoz hastalıklarda, vektörlerin veya vertebralıların düzenli bir şekilde taranması ile aktif şekilde sirküle olan patojenler tespit edilebilmektedir. Enzootik bulaşma seviyesi, insanları veya evcil hayvanları etkileyecek riskleri öngörmektedir. Enzootik bulaşma aktivitesi için, enfekte vektör oranı, vertebralı konakçılarda enfeksiyon oranı, nöbetçi sürülerdeki serokonversiyon oranları ve klinik vakalar takip edilmektedir (Reisen, 2017, s:31).

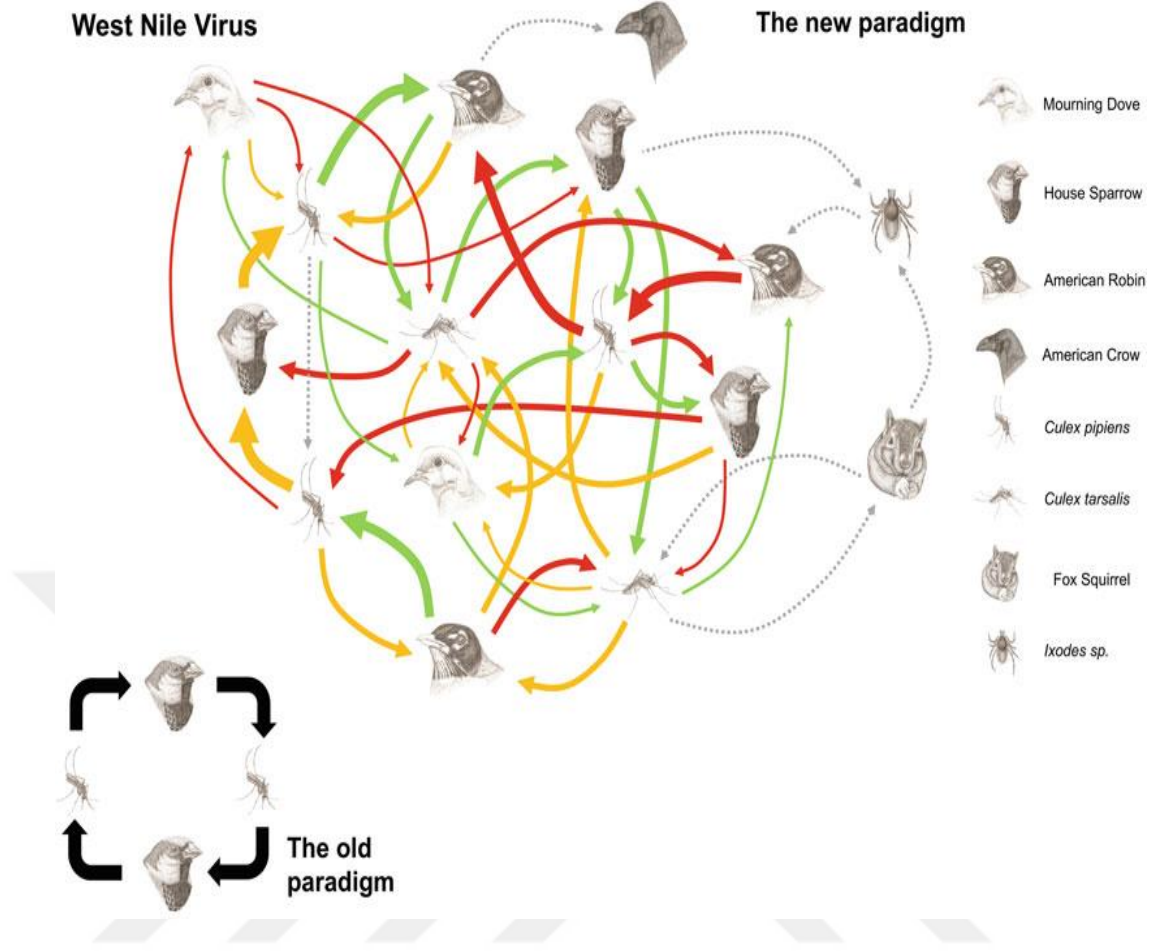
Virusların çoğaldığı konakçılardan veya rezervuarlardan alınan numunelerin test edilmesi, enzootik bulaşma seviyelerinin tespiti için gereklidir (Reisen, 2017, s:31). Popülasyonlarda zamanla enfekte olan yeni bireyleri tespit etmek, virusun bulaşma aktivitesini açıklamak için önemli bir veridir. Birçok patojen, popülasyonlarda belirli dönemlerde bulunduğundan, popülasyonun büyüklüğüne göre sadece seropozitiflik veya seroprevelans tespiti yapılmasıyla virus sirkülasyonu ortaya konulabilmektedir. Yabani hayvanlardan yapılan örneklemeler ile patojenlerin sirkülasyon zamanı ve yeri hakkında çok kullanışlı bilgiler toplanmaktadır (Reisen, 2017, s:31).

### 1.1.3. Arbovirusların Bulaşma Mekanizmaları

#### 1.1.3.1. Flavivirusların Bulaşma Mekanizmaları

Flaviviruslar içinde, biri sivrisinekler diğeri ise keneler ile bulaşan iki ana virus grubu bulunmaktadır. Keneler ile bulaşan viruslarda genellikle tek serokompleks bulunurken, sivrisinekler ile bulaşan viruslarda birden fazla serokompleks bulunmaktadır (Pettersson ve ark., 2014). *Culex spp.* sivrisinekleri ile bulaşan Japanese Encephalitis (JE) serokompleksindeki viruslar çoğunlukla nörotropik karakterdeyken, *Aedes spp.* sivrisinekleri ile bulaşan viruslar çoğunlukla visserotropik karaktere sahiptir veya hemorajik hastalıklara neden olmaktadır. Ancak, Zika virus (ZIKV) da *Aedes aegypti* ile bulaşmasına rağmen, fötuslarda nörolojik hastalıklara neden olmaktadır (Pettersson ve ark., 2014).

BNV için kuşlar, birincil vertebralı konakçı olarak kabul edilmektedir. Sivrisinekler ise, virus için baskın olan artropod vektörlerdir. BNV'nin hücreye girişi ve replikasyonu için sivrisineğin orta bağırsaklarında uygun endotelial hücre yapısının bulunması gerekmektedir. Daha sonra, virusun orta bağırsaktan çıkıp tükürük bezlerine tutunarak replike olmaktadır. En uygun sivrisinek vektörleri *Culex* genusunda bulunmaktadır (*Culex pipiens*, *Cx. nigrapalpus*, *Cx. quinquefasciatus* ve *Cx. restuans*) (Turell ve ark., 2001a; Turell ve ark., 2001b ve Nasci ve ark., 2002).



**Şekil.1.3.** BNV bulaşma döngüsü (Diaz ve ark., 2013). Amerika Birleşik Devletleri'ndeki veriler kullanılarak oluşturulmuştur. Okların kalınlığı konakçı-vektör arasındaki virus miktarı ile bağlantılıdır. Noktalı oklar; alternatif bulaşma yollarını; renkli oklar ise mevsimsel bulaşmaları göstermektedir (Yeşil: İlkbahar, Kırmızı: Yaz; Turuncu: Sonbahar).

BNV, genellikle kuş-sivrisinek döngüsü içinde varlığını devam ettirirken, insan ve atların enfeksiyonu tesadüfen olmaktadır. Birçok kuş türünün BNV konakçısı olduğu bilinmektedir. Avrupa ve Amerika'da *Passeriformes* ailesi, kuş konakçılar açısından önem arz etmektedir. Avrupa'da, genellikle sulak alanlardaki yabani kuşlar ve ornitophilik sivrisinekler ile olan kırsal döngü ve evcil kuşlar, insan ve kuşlardan beslenen sivrisinekler ile olan şehirsal döngü olmak üzere iki tip BNV bulaşma döngüsü ve ekosistem tanımlanmaktadır (Hubálek ve Halouzka, 1999).

BNV enfeksiyonları, sivrisineklerin olmadığı ılık veya kurak habitatlarda, argasid ve amblyomma keneleri de kuş-kene döngüsü için uygun vektörler olarak değerlendirilmektedir. Kenelerin de bulaşmada rollerinin olduğu yapılan izolasyonlar

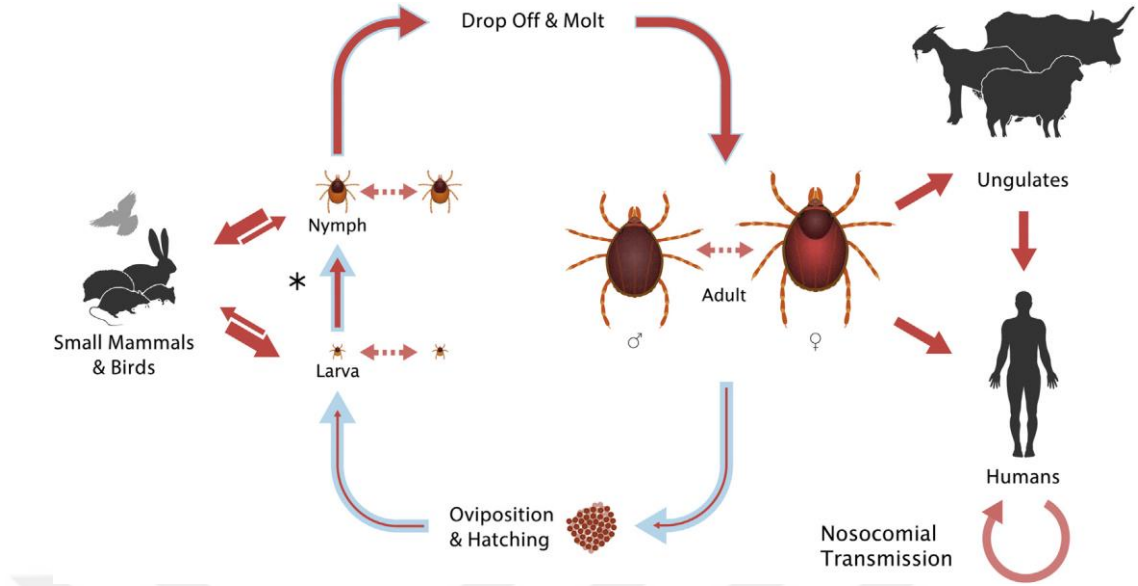


sonucunda anlaşılmıştır (Lvov ve ark., 2004). BNV'nin yumuşak kenelerde çoğalması hakkında bilgi edinmek için yapılan başka bir deneysel çalışmada, bir deniz kuşu yumuşak kenesi olan, *Carios capensis* (*Ixodida: Argasidae*) BNV enfekte ördeğin kanı ile beslenmiştir. Beslenme sonrası 35 gün dışsal (ekstrinsik) inkubasyona bırakılan kenenin, yeni ve enfekte olmayan bir ördeğin üzerine tutunması sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra keneden ve ördekten alınan örneklerde BNV virusu tespit edilirken, ördekten 7 gün sonra alınan serumdan da antikor tespiti yapılmıştır (Hutcheson ve ark., 2005).

### 1.1.3.2. Nairovirus Bulaşma Mekanizmaları

KKKAV, kene-vertebrali-kene enzootik döngüsünde sirküle olmaktadır. Kenelerde de transstadial, transovarial ve daha az olarak da venereal bulaşma olduğu bildirilmiştir (Gonzalez ve ark., 1992).

*Transovarial bulaşma:* Kan emen kenede gerçekleşen sindirimden sonra, eritrositlerin içerisinde bulunan virus, kenenin orta bağırsağında replike olmakta ve buradan birçok farklı organa sıçramaktadır. Virus, özellikle tükürük bezi ve üreme organlarında yüksek titrede bulunur (Dickson ve Turell, 1992). KKKAV'de, kenelerde viral replikasyon gerçekleşmekte ve bu viruslar yetişkin dişiden yumurtalara vertikal olarak bulaşmaktadır. Enfekte yumurtalardan çıkan larvalar da virusun yayılmasında oldukça önemlidir (Dohm ve ark., 1996 ve Gordon ve ark., 1993). Bir dişi kenenin binlerce yumurta bırakması ve transovarial bulaşma gerçekleşmesi nedeniyle, üreme organlarındaki bu yüksek titre önemlidir (Nuttall ve ark., 1994).



Şekil.1.4. *Hyalomma* cinsi kenelerinin yaşam döngüsü (Bente ve ark., 2013).

*Transstadial bulaşma*: Kene ile memeliler arasında KKKAV'nun yayılması, genellikle bahar ve yaz aylarında larva ve nimflerin kan emmesiyle gerçekleşen başkalaşım sonrası, ergin dişinin yumurta üretimi dönemlerinde görülmektedir (Şekil 1.4). Bazı vertebrali türlerinde, enfekte kene konağa tutunmasından sonra bazı dokularda virus replikasyonu gerçekleşir ve viremi oluşur. Beslenen bir kene, konakçısında haftalarca tutunabilir ve bir canlıda aynı anda birden fazla kene bulunabilmektedir. Viremi dönemindeki bir canlı, üzerinde enfekte olmayan keneleri barındırıyorsa, bu dönemde bu keneler de enfekte hale gelebilmektedir. Ayrıca, kene türleri arasında orta bağırsakta enfeksiyonu başlatacak virus miktarı değişiklik göstermektedir (Shepherd ve ark., 1991). Bir diğer bulaşma yolu ise "co-feeding" olarak adlandırılmaktadır ve bu bulaşma yolunda canlıda viremi görülmesine gerek yoktur. Aynı canlıda enfekte olmayan kene ile yakın pozisyonda beslenen ve salyasında virus barındıran kene, enfekte olmayan keneye de virus bulaştırabilmektedir. Bu bulaşma "viremik olmayan" bulaşma olarak da bilinmektedir (Shepherd ve ark.,1989).

Keneler, yaşam döngülerinde kan ile beslendikten sonra konakçıdan ayrılır, yumurtlar ve larva, nimf ve ergin olarak gelişme basamaklarını izlerler. Bu sırada kullandıkları konakçı sayılarına göre tek konakçılı, iki konakçılı, üç konakçılı

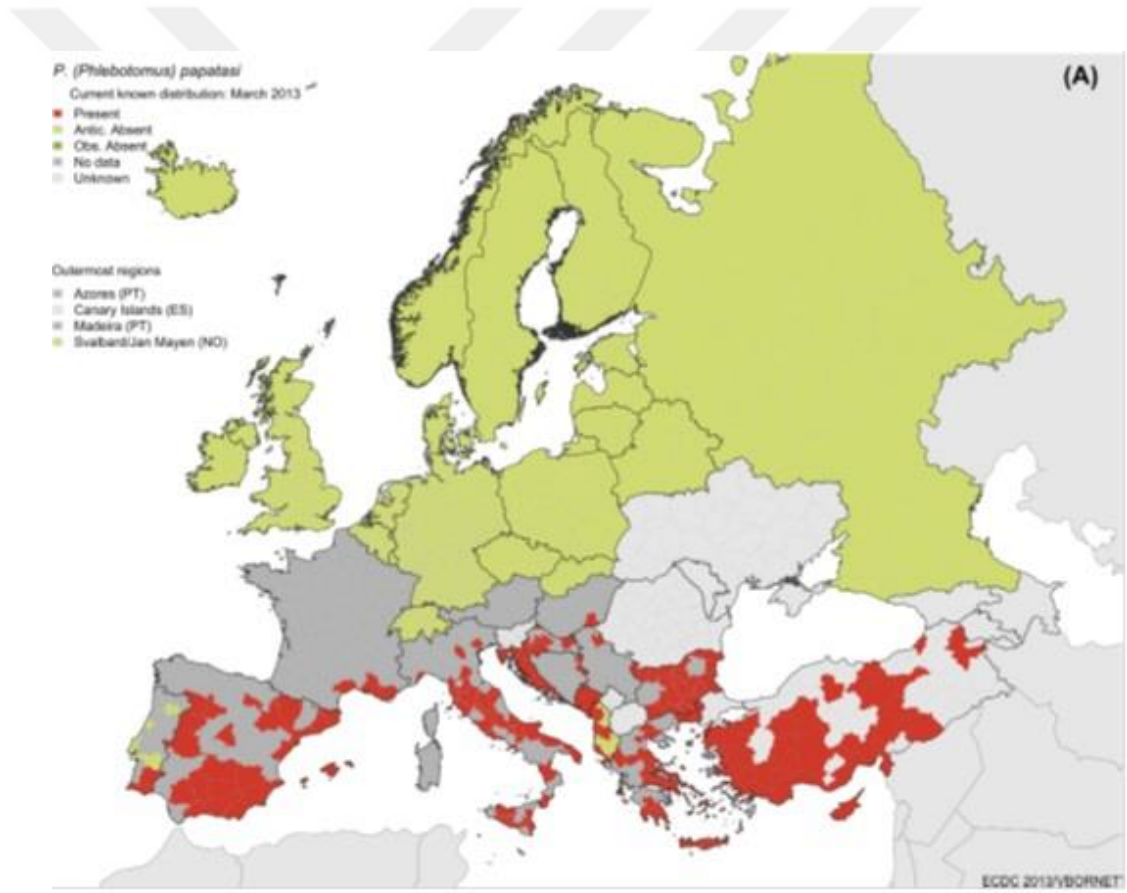
keneler olarak adlandırılırlar. Örneğin; iki konakçılı olan *Hyalomma marginatum* larva ve nimfleri rodent, kuş veya diğer küçük memelilerden beslenmektedir. *Hyalomma* cinsi keneler, insanın da dahil olduğu uygun konakçıyı bulmak için 400 metreye kadar çevrede araştırma yapabilmektedir (Bente ve ark., 2013).

Her ne kadar KKKAV'nün ana vektörü *H.marginatum* olsa da, *Rhipicephalus*, *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma lusitanicum* gibi kene türlerinde de virus tespitleri bulunmaktadır (Dinçer ve ark., 2017; Yeşilbağ ve ark., 2013). Farklı kene türlerinde KKKAV'nin tespit edilmesinin nedenleri arasında, enfekte hayvandan yeni beslenmenin (mekanik vektör) de bulunduğu unutulmamalıdır. Keneler olgunlaşma sürecine tabi tutularak, vektör olup olmadıkları konusunda çalışma da bulunmaktadır (Hoogstraal, 1979).

### **1.1.3.3. Phlebovirus Bulaşma Mekanizmaları**

TOSV, özellikle *Phlebotomus perniciosus* ve *P. perfiliewi* olmak üzere *Phlebotomus*, *Sergentomyia* ve *Lutzomya* cinsleri tarafından insanlara bulaşan artropod kaynaklı bir virustur (Cusi ve ark., 2010). Vektörlerinin bir türü olan *P. papatasi*'nin Avrupa'daki dağılımı Şekil 1.5'de görülmektedir. TOSV'nin prototipi olan ISS Phl.3, ilk olarak 1971 yılında İtalya'da *P.perniciosus*'dan izole edilmiştir. Bunun dışında *P. perfiliewi*'den de izolasyon yapılmıştır. Tatarcık tuzaklarının bulunduğu bir bölgede de *Pipistrellus kuhli* türü bir yarasanın beyninden de TOSV izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Verani ve ark., 1982 ve Verani ve ark., 1988). Ayrıca, transovarial bulaşmayı göstermek için yapılan bir çalışmada erkek *Phlebotomus spp.*'lerden virus izole edilmiştir. Yapılan deneysel enfeksiyonlar ile enfekte erklerden enfekte olmayan dişilere venereal bulaşma da kanıtlanmıştır (Charrel ve ark., 2005). Virus, vektörlerde transovarial olarak bulaşmasına rağmen, herhangi bir hayvan rezervuarı tespit edilememiştir TOSV'ün rezervuarı ile vektörünün aynı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, memeliler üzerinde sınırlı sayıda çalışma olması ve kuşlarda yapılan bir çalışma bulunmaması sebebiyle yakın zamana kadar yapılan çalışmalarda memeliler veya kuşlar potansiyel rezervuar olarak

görülmemektedir. Buna karşın, birçok phlebovirus hasta insanlardan ve yabancı hayvanlardan da tespit edildiğinden, bu virusların bulaşma döngüsünde vertebralı canlıların bir rolü olabileceğini düşünen araştırmacılar bulunmaktadır (Bartelloni ve ark., 1976; Cusi ve ark., 2005 ve Tesh ve ark., 1987). Güney Afrika'da, 1978 yılında *Turdus libonyanus* türü ötücü kuştan bir phlebovirus olan Arumowot virus (AMTV) izole edilmiştir. AMTV tespiti, sivrisineklerden ve rodentlerden de yapılmıştır. Bu virus, ICTV tarafından 1998 yılında Salehabad virus grubu içine dahil edilmiştir. AMTV ile ilgili insan vakası bulunmamakla beraber, evcil hayvanlarda ve Afrika'daki insanlarda antikor varlığı tespit edilmiş ve 2016 yılında da genom analizi yapılmıştır (Akakpo ve ark., 1991; Berthet ve ark., 2016 ve Tesh ve ark., 1976).



Şekil.1.5. *P. papatasi*'nin Avrupa'da dağılımı (Alkan ve ark., 2013).

#### 1.1.4. Arbovirusların Bulaşmasında Kuşların Rollerini

Kuşlar, memelilere oranla daha az zoonotik ajan taşımaktadır. Kuşlar ile karnivorlar, taşıdıkları zoonoz ajanlar yönünden karşılaştırıldığında, karnivorlar bu ajanların %43'ü yönünden şüpheliyken kuşlar %18,4'ünden sorumlu tutulmaktadır (Cleaveland ve ark., 2001). Kuşların, zoonoz ajanlar yönünden taşıyıcılık oranlarının karnivora göre düşük olmasının nedenleri arasında, yüksek vücut sıcaklığı, ajanların spesifitesi ve sahip oldukları güçlü immun sistem sayılabilmektedir (Cleaveland ve ark., 2001). Kuşların önemleri, zoonozları uzak mesafelere taşıyarak bulaştırma ve yayma, doğal konakçı veya rezervuar olma ve konakçı-vektör ilişkilerine aktif olarak katılma gibi rollerinden kaynaklanmaktadır. 1997 yılında, Çin'de insanlarda görülen yeni bir varyant olan yüksek patojenik avian influenza virus (H5N1) salgını, özellikle göç eden su kuşlarının epidemiyolojik açıdan önemini vurgulayan ve yeni ve/veya yeniden ortaya çıkan zoonozlar ile kuşların bağlantısını gösteren güzel bir örnektir (DSÖ, 2018).

Göç eden kuşların periyodik hareketleri, onları halk sağlığını ilgilendiren bazı patojenler için potansiyel bir bulaştırıcı yapmaktadır. Mevsimsel kuş göçleri sırasında, milyonlarca kuş her sene sonbaharda Avrupa'da, kuzeyden güneye Afrika'ya ve Amerika'da ise Kuzey Amerika'dan Orta ve Güney Amerika'ya seyahat etmektedir. Kuşların göç sırasında oluşan stres nedeniyle immun sistemleri baskılandığı için hastalıklara açık hale gelebilmekte ve latent enfeksiyonlar reaktif olabilmektedir (Reed ve ark., 2003). Göçmen kuşlar, göç yolculuğunun bittiği bölgede veya konaklama alanlarında yaşayan yerleşik kuşlar ile etkileşime girerek onları da etkilemektedirler. Bu nedenle, göç koridorları epidemiyolojik anlamda önem taşımaktadır. Yabani kuşlar, şehirlerde insanlar ile de çeşitli şekillerde etkileşime girmektedir. Bu kuşların bazıları pet hayvanı olarak beslenirken, bazıları da park ve bahçe gibi alanlarda yerel kuşlar ve insanlar ile yakın etkileşimdedir. Leylek ve martı gibi bazı kuşlar da çöp alanlarında beslenmeye alıştıklarından sulak alanlar (yüzmek için de kullanılabilen) ile çöp alanları arasında hareket etmekte ve bu davranış şekilleri ile toplum sağlığı açısından risk oluşturmaktadırlar (Contreras ve ark., 2016).

#### 1.1.4.1. Kuşların Flavivirus Bulaşmasındaki Rolü

Kuşlar, sivrisinek tarafından ısırılıp enfekte olduktan sonra viremi gelişmektedir. Vireminin şiddeti enfekte olan kuşun türüne göre değişmektedir. Kargalar ve saksaganlar (*Corvidae* ailesi), serçeler (*Passer domesticus*), ev sakaları (*Carpodacus mexicanus*) ve diğer serçegiller en uzun viremi süresine ve kanda en yüksek titrede virusa sahip kuş türleri arasında bildirilmiştir (Malkinson ve Banet, 2002 ve Meulen ve ark., 2005). Viremi bittikten sonra, bazı viruslar (BNV) sivrisinek enfeksiyonuna neden olabilecek düzeyde ve belirsiz bir süre daha, kuşların derisinde persiste kalabilmektedir (Komar ve ark., 2003; Malkinson ve Banet, 2002 ve Meulen ve ark., 2005).

Enfekte kuş sayısı, uygun koşullarda (çevre, vektör, rezervuar) virusu, insanlara ve diğer vertebralılara bulaşmasına yetecek miktara ulaştıran en önemli faktördür. Bulaşma, vektör olan sivrisineklerin (*Aedes vexans* ve *Ochlerotatus* spp.) kuş ve memelilerden beslenmesi ile oluşmaktadır. İnsanlar, atlar ve diğer memeliler BNV için son konaktır ve bu canlılarda, yeni bir sivrisinek enfeksiyonuna neden olabilecek düzeyde bir viremi gelişmemektedir (Turell ve ark., 2001a ve Turell ve ark., 2001b).

Kuşlarda, bulaşma sadece sivrisinekler aracılığı ile olmamaktadır. Kuşların kendi arasında da bulaşma gerçekleşebilmektedir. BNV ile enfekte olup ölen kuşları veya memelileri tüketen vahşi kargalar ve diğer kuşlar enfeksiyonu bu yolla da alabilmektedir. Ayrıca, yüksek viremi dönemindeki kuşlar arasında kloakal kontakt veya oral sıvılar ile de bulaşma gerçekleşebilmektedir (Meulen ve ark., 2005). Yapılan deneysel çalışmalarda, enfekte sivrisineklerin yenmesi, enfekte fare ve kontamine suların da kuşlarda enfeksiyona neden olduğu gösterilmiştir (Komar ve ark., 2003).

Kuşlarda, BNV ani ölümlere, spesifik olmayan veya ilerleyen sinirsel semptomlar gibi değişen belirtilere sebep olabilmekte ve bu semptomlar bazen haftalarca devam etmektedir. Bazı papağanlarda ise, iyileştikten sonra nörolojik

semptomlar persiste olarak kalabilmektedir (Malkinson ve Banet, 2002). ABD’de çıkan ilk salgında kuşlarda ataksi, tremorlar, anormal kafa duruşu, dönme ve çırpınmalar gözlenmiştir. Ayrıca, görme bozuklukları oluştuğuna dair de bildirim bulunmaktadır (Malkinson ve Banet, 2002). Yırtıcı kuşlarda iştahsızlık, vücut ağırlığının azalması ve sabit bir pozisyonda durma gözlenmiştir. Hastalığa yakalanan kuşlar gözlendiğinde, klinik semptomların başlamasından 72 - 120 saat içinde ölümlerle sonuçlandığı bildirilmiştir (Meulen ve ark., 2005).

*Corvidae* ailesindeki kuşlarda (Amerikan kargası, mavi alakarga) BNV nedeniyle ölümlere rastlanılmaktadır. Fakat diğer kuşlarda (sığırcık- *Sturnus vulgaris* ve serçe- *P. domesticus*) *Corvidae* ailesindeki kuşlara oranla yüksek viremi gelişmesine rağmen mortalitesi daha düşüktür (Komar ve ark., 2003). Kuşlara ek olarak reptiller, amfibianlar ve memeliler gibi 30 vertebralı türü BNV enfeksiyonu yönünden şüphelidir (Gomez ve ark., 2008; Meulen ve ark., 2005 ve Rodhain ve ark., 1985). Ancak kuş olmayan birkaç vertebralı türü (lemur, kurbağa, hamster, sincap, tavşan) viremi geliştirip vektör bulaşımına neden olabilmektedir (Gomez ve ark., 2008; Meulen ve ark., 2005 ve Rodhain ve ark., 1985).

BNV’nin çoğalması için kuşlar kusursuz konakçılardır ve kuşlarda viremi uzun sürdüğünden, göç eden kuşlar virüsü farklı bölgelere taşıyabilmektedir. Bazı kuş türlerinde doğal veya deneysel enfeksiyon sonucunda %100 ölüm gözlenirken, bazı kuş türlerinde de antikor yanıt oluşmadan çok uzun süre virüsü taşıyabildikleri tespit edilmiştir (Clark ve ark., 2006; Komar ve ark., 2003; McKenzie ve Goulet, 2010 ve Steele ve ark., 2000).

Mavi-gri güvercinlerde, BNV persistensliği gözlenmiş olup, enfeksiyon sonrası 100 güne kadar virus izole edilmiş ve 180. güne kadar da karaciğerde viral antijen tespiti yapılabilmektedir (Ruiz ve ark., 2010). Amerika Nar bülbülü, BNV enfeksiyonu için sürekli rezervuar konumundadır. Serçelerde ve ispinozlarda doğal enfeksiyon sonrası, kanlarında antikor tespit edildikten sonra 36. haftaya kadar dalaklarından viral RNA tespiti yapılabilmektedir (Wheeler ve ark., 2012).

2004 yılına kadar BNV Genetik Hat 2'nin sadece Afrika'nın Sahra altı bölgesi, Madagaskar ve Güney Afrika'daki salgınlar ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Erde ve ark., 2007). 2004 ve 2005 yıllarında ise Macaristan'daki kuşlardan toplanan örneklerden Genetik Hat 2 izolasyonu yanı sıra Genetik Hat 1'e ait viruslar da izole edilmiştir (Bakonyi ve ark., 2005 ve Bakonyi ve ark., 2006). Ayrıca, 2007 yılında Rusya'da insanlarda görülen salgında da BNV Genetik Hat 2 izolasyonu yapılmıştır (Bakonyi ve ark., 2005). Yunanistan'da, 2010 yılında insanlarda görülen BNV salgınında Genetik Hat 2 tespit edilmiştir (Papa ve ark., 2010). Genetik Hat 2'nin Yunanistan'daki sirkülasyonu, göçebe olmayan yabani kuşlardan ve tavuklardan tespit edilerek doğrulanmıştır (Chaskopoulou ve ark., 2011 ve Valiakos ve ark., 2011). Türkiye'de de bir atta Genetik Hat 2 varlığına dair bildirim bulunmaktadır (Monaco ve ark., 2016).

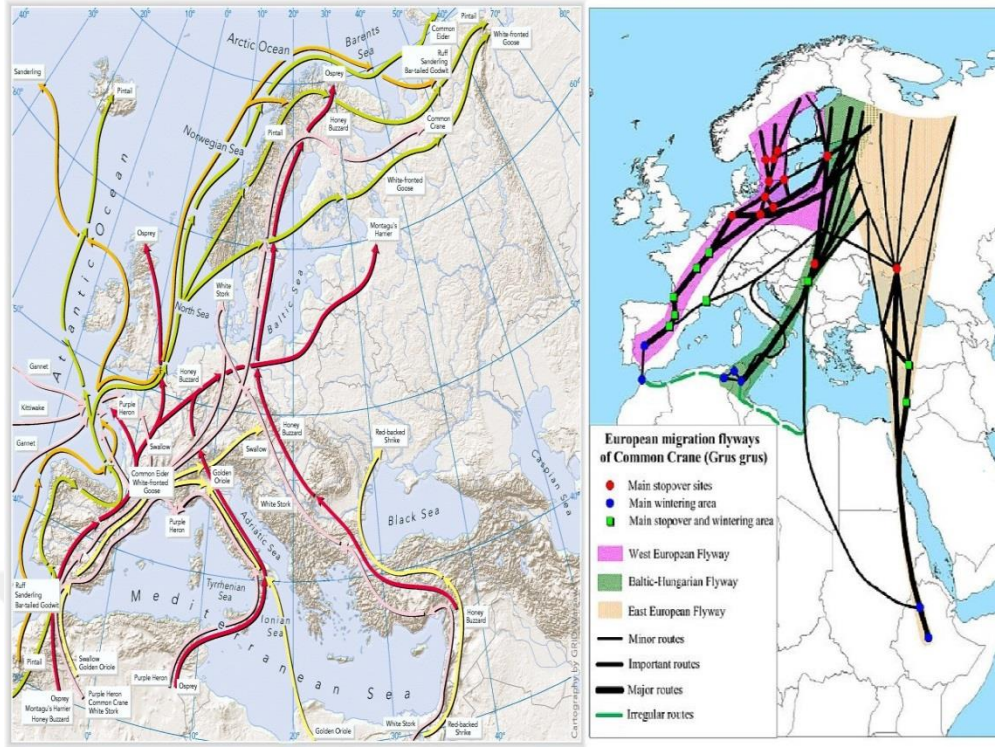
Afrika'da BNV seropozitifliğinin Avrupa'ya göre yüksek olmasının nedenleri arasında, Avrupa'da virus sirkülasyonunun mevsimsel ve kısa süreli olması bulunmaktadır. BNV ile ilgili elde edilen genetik sekanslar incelendiğinde, virusun muhtemel kökeninin Afrika olduğu ortaya konulmuştur. Virusun, bu kıtadan göçmen kuşlar ile diğer kıtalara yayıldığına dair bir teori bulunmaktadır. İncelenen Afrika izolatlarının sekans verileri de, bu teoriyi doğrulamaktadır (Fiona ve ark., 2011).

Orta Afrika'dan göç eden kuşların, BNV Genetik Hat 2'nin Macaristan'a taşınmasında sorumlu olduğu ile ilgili de teoriler bulunmaktadır. İlkbahar göçü sırasında Orta Afrika'dan Avrupa'ya göç eden kuşlar iki ana yol izlemektedir (Ciccozzi ve ark., 2013) (Şekil 1.6):

- Doğu yolu; Mısır ve İsrail rotasını takip eden kuşlar, bu bölgelerdeki sulak alanlarda bir süre konaklayıp oradan merkez Avrupa'ya doğru ilerlerler.

- Batı yolu; Fas'tan ayrıldıktan sonra İtalya, Fransa veya İspanya rotasından uçarlar (Şekil 1.6).





**Şekil.1.6.** Bazı göçmen kuşların kullandığı göç rotaları (EEA, 2019; Leito ve ark., 2015).

Doğu uçuş yolu içindeki bir diğer rota da İsrail'den sonra Karadeniz ve Rusya steplerine doğrudur. Elde edilen veriler incelendiğinde, 2000 yılında Rusya'da görülen Genetik Hat 2 ile ilişkili salgının nedeninin bu rota ile bağlantılı olabileceği ortaya konulmuş ve Rusya ile Madagaskar'da görülen BNV sekanslarının kökeninin ortak olduğu bildirilmiştir (Ciccozzi ve ark., 2013). Egzotik kuşların ticareti, amfibiyan ve sürüngen gibi diğer konakçıların legal veya illegal satışları; enfekte sivrisineklerin pasif taşınması (uçak, gemi yolculukları) gibi Genetik Hat 2'nin yayılımı ile ilgili başka hipotezler de bulunmaktadır (Ciccozzi ve ark., 2013).

Fransa'da karatavuklarda (*Turdus merula*) meydana gelen ölümlerden hemen sonra yapılan bir surveyans çalışmasında 3 kuşta USUV tespit edilmiştir. Tespit edilen USUV suşunun, kuşlarda patojen olduğu ancak yaban hayatında kuşlarda ölümlerin tespit edilmesinin zor olduğu belirtilmiştir (Lecollinet ve ark., 2016).

İngiltere, Polonya ve Çekya’da yapılan çalışmalarda kuşlarda USUV’a karşı nötralizan antikorlar tespit edilmiştir (Buckley ve ark., 2003, Hubalek ve ark., 2008a ve Hubalek ve ark., 2008b).

2009 ve 2010 yıllarında yapılan araştırmalarda, kuşlarda herhangi bir mortalite artışı tespit edilmezken; 2011-2013 yılları arasında 600’den fazla ölü kuş numunesi ve yabancı kuş serumu toplanmıştır. Tüm örnekler BNV negatif bulunurken, 209 kuşta USUV RNA’sı tespit edilmiştir. Serumlara yapılan virus nötralizasyon testleri sonucunda 45 kuş BNV ve 8 kuş USUV yönünden seropozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu salgında, yabancı kuşların yanında kümeslerde beslenen kuşlar da etkilenmiştir (Becker ve ark., 2012 ve Ziegler ve ark., 2015).

Hollanda’da, 2016 yılında USUV’un yabancı kuşlarda yayılımını araştırmak için yapılan çalışmada kara tavuklarda (*Turdus merula*) ve baykuşlarda (*Strigiformes*) USUV RNA pozitiflikleri tespit edilmiştir (Rijks ve ark., 2016).

New York’da (ABD), 2000 yılında kuşlardan toplanan serumlara yapılan Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT) testi sonucunda bazı bölgelerde %33 BNV seropozitiflikleri tespit edilmiştir. Aynı zamanda sivrisinek tuzakları da kurulmuş olan bu çalışmada, oluşturulan sivrisinek havuzlarının 36 tanesi BNV yönünden pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada virus yerel olarak sirküle olduğundan kuşlarda bu pozitifliğin tespit edildiği ve surveyans programlarının yapılmasının önemine değinilmiştir (Nasci ve ark., 2002).

New York’daki 1999 yılındaki salgınından sonra, 2002 yılında Dominik Cumhuriyeti’nde toplanan yerel kuş örneklerinde seropozitiflik tespit edilmiş ve ülkede virus sirkülasyonu olduğu belirtilmiştir (Birds ve ark., 2003).

Venezüella’da 2007 yılında yapılan çalışmada ise, 576 yerel kuş ve 791 at serumu toplanarak BNV taraması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar PRNT ile

doğrulanmış ve atların 141 tanesi ile kuşların 5 tanesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Bosch ve ark., 2007).

Macaristan'da, 2003 yılında evcil kazlarda ve yabani kuşlarda BNV kaynaklı ölümler tespit edilmiştir (Bakonyi ve ark., 2006 ve Erdelyi ve ark., 2007). Evcil kazlardaki ölümlerden sorumlu BNV, genetik hat 1 iken, yabani kuşların ölümlerinin genetik hat 2 ile bağlantılı olduğu ve bir atmacada tespit edildiği bildirilmiştir (Bakonyi ve ark., 2006). Avusturya'da ölü bulunan 5 atmaca ve 1 akdoğanında BNV genetik hat 2 tespiti yapılmış ve 71 kuşa ait serumlara yapılan antikor ELISA testi sonucunda da %43,7 seropozitiflik bulunmuştur (Wodak ve ark., 2011).

İspanya'da 2011-2012 yılları arasında kuşlarda Flavivirus araştırılması için yapılan çalışma sonucunda, kuş serumlarının %23'ünde BNV, %15'inde Bagaza virus ve %10'unda USUV'a karşı antikor tespiti yapılırken, organlarından da Flavivirus tespiti amacıyla moleküler testler yapılmış ancak negatif bulunmuştur. Devam eden araştırmalar sonucunda, BNV'nin İspanya'da yerel bir döngü ile bulaşmakta olabileceğini belirtilmiştir (Ferraguti ve ark., 2016 ve Llorente ve ark., 2013).

İtalya'da yaklaşık 5 yıl boyunca yerel kuş numuneleri toplanmış ve bunlar BNV yönünden kontrol edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda 6 kuş için BNV seropozitifliği bildirilmiş ve Afrika'dan gelen göçmen kuşların, virüsü yerel kuşlara bulaştırabilme ihtimali üzerinde durulmuştur (Lelli ve ark., 2012).

Polonya'da 1995-1996 yıllarında 179 serçeden toplanan serumların %2,8'i BNV antikorları yönünden pozitif tespit edilirken, 2007-2010 yıllarında arasında toplanan 2140 yabani kuş beyninden BNV tespiti yapılamamıştır (Juricova ve ark., 1998 ve Niczyporuk ve ark., 2011). İngiltere'de de 2002-2009 yılları arasında toplanan 2072 ölü kuş örneğinde BNV yönünden pozitiflik tespit edilememiştir (Brugman ve ark., 2013).

2010 yılında Yunanistan'da insanlarda devam eden BNV salgını sırasında, vurulan bir saksağanda BNV tespit edilmiştir. Tespit edilen bu virus da Macaristan ve Avusturya'da avlanan kuşlar ile aynı şekilde BNV genetik hat 2 olarak tiplendirilmiştir. Halk sağlığı açısından yabancı kuşların, viruslar için rezervuar olabilecekleri vurgulanmıştır (Valiakos ve ark., 2011).

Avrupa'da yapılan BNV bildirimlerinin ardından 2010 yılında Almanya'da 2700 civarı kuştan kan serumları toplanmıştır. Yapılan serolojik testler sonucunda 11 göçmen kuştan antikor pozitifliği tespit edilirken, örneklenen yerel kuşlarda antikor tespiti yapılamamıştır (Seidowski ve ark., 2010). 2018 yılında yayınlanan bir araştırmada, 2014-2016 yılları arasında Almanya'da 1900 kuş örneği toplandığı ve ülkedeki ölü kuş sürveyans ağında yapılan teşhisler ile 77 tanesinin USUV RNA'sı için pozitif olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak, Almanya'da kuşlarda BNV antijen tespiti olmadığından ülkede BNV'nin olmadığı yorumu yapılmıştır (Michel ve ark., 2018). Ancak, 2018 yılında 31 Ağustos'ta bir baykuştan BNV antijen pozitifliğinin ardından 1 ay içinde 6 tane daha yabancı kuştan BNV antijen pozitifliği bildirilmiştir. Aynı zamanda, iki at vakasında da BNV tespit edilmiştir (ECDC, 2018 ve OIE, 2018). Almanya'da bu BNV vakaları ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda BNV genetik hat 2 olarak sınıflandırılmakla birlikte, tespit edilen virusun yeni bir tip olabileceği de belirtilmiştir. Ayrıca, üç pozitif baykuşun nekropsisini yapan veteriner hekimde de hafif klinik semptomlar gözlenmiş ve sonrasında BNV IgM pozitif tespit edilmiştir. Almanya'da aniden ortaya çıkan bu salgının nedeninin iklimsel değişimlerden kaynaklı olabileceği belirtilmiştir (Lühken ve ark., 2019).

#### **1.1.4.2. Kuşların Nairovirus Bulaşmasındaki Rolü**

KKKAV bulaşması ve yayılımında, kuşların rolü tam olarak anlaşılmamıştır. Kuşlarda yapılan birçok çalışma olmasına rağmen, KKKAV spesifik antikorlarının araştırıldığı çalışmaların eksikliği bulunmaktadır. Kırım'da 1944 yılındaki salgın sürecinde yabancı kuşlardan ve kümes hayvanlarından yetişkin olmayan *H.marginatum* keneleri toplanmış ve elde edilen bulgular ile bu enfeksiyonun

rezervuarı olarak değerlendirilmiştir (Grobov, 1946 ve Spengler ve ark., 2016). Kuşlar, yüksek kene enfestasyonu ve indeksi nedeniyle virusların devamlılığının sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Enfekte bölgede yapılan bir çalışmada yüzlerce *H.marginatum*'un sadece bir kargada bulunduğu bildirilmiştir (Zimina ve ark., 1965). Kuşların yerde bulunduğu sürelerde larva veya nimfler onlardan beslenebilmekte veya onlara yapışık kalabilmektedir (Hoogstraal, 1979). Bu nedenle, kuşların KKKAV epidemiyolojisindeki önemi, taşıdıkları enfekte kenelerden gelmektedir. Kenelerin, virusu transovarial yolla bulaştırabildiği bilinmektedir. Keneler, kuşlara tutunarak onlarla birlikte kısa ve uzun mesafeli seyahat ederler ve kuşların yeni gittikleri bölgeye götürdükleri keneler nedeniyle, patojen taşıyan kene sayısı artabilmektedir. Aynı zamanda, kuşun üzerinde beslenen enfekte bir kene bulunuyorsa, kısa süreli de olsa oluşan viremi nedeniyle kuşun üzerinde bulunan diğer keneler de enfekte olabilmektedir (Gonzalez ve ark., 1992 ve Labuda ve ark., 1993a).

KKKAV, 30'dan fazla kene türünde tespit edilmiştir. Ayrıca kuşlar bazı kene türlerinin gelişme aşamaları (olgun olmayan aşamalar) için ana konakçısıdır (Hoogstraal ve ark., 1961). KKKAV ile enfekte olan serçelerin büyük çoğunluğunda virusu keneye geçirebilecek viremi oluşmamaktadır (Shepherd ve ark., 1987 ve Zeller ve ark., 1994).

Kuşların KKKAV replikasyonunda önemli bir konakçı olduğu düşünülse de, devekuşları dışındaki kuşların viremi süreleri konusunda deneysel enfeksiyonlar dışında net bilgiler bulunmamaktadır (Hoogstraal, 1979). Devekuşlarında vireminin gelişip insan enfeksiyonlarına neden olduğu bildirilmiştir (Zeller ve ark., 1994). Güney Afrika'da, devekuşu mezbahanesinde çalışan insanlarda ortaya çıkan KKKAV enfeksiyonundan sonra bu hayvanlarda yapılan çalışmada enfeksiyon sonrası 4. güne kadar viremi tespit edilmiştir. İnokulasyon sonrası 5. günde karaciğer, dalak ve böbrek gibi organlarda virus tespit edilmiştir. İnokulasyonu izleyen 6. günde ise kanda virus tespiti olmamıştır. Enfeksiyon sonrası 3. günde kaslarda enfektif virus tespit edilemezken etkene ait nükleik asit tespiti yapılmıştır. Elde edilen bulgulardan sonra, devekuşlarının kesimden 14 gün önce kene olmayan

bir yerde karantinaya alınması ile hastalık bulaştırma riskinin düşürüleceği ortaya konulmuştur. Bu nedenle, Avrupa'ya canlı ithal edilen kanatlıların ülkeye sokulmadan önce ektoparazitler yönünden ilaçlanması gerektiği belirtilmiş ve bu konu, Avrupa Birliği yönetmeliklerinde gerekli açıklamalar ile yerini almıştır (Capua ve ark., 1998 ve Swanepoel ve ark., 1998).

KKKAV'nun paylaşılmış olan genetik sekansları incelenip karşılaştırıldığında, çok geniş coğrafyalara yayıldığı tespit edilmiş ve bunun da uzun mesafeli virus taşınması ile mümkün olduğu düşünülmüştür. Virusun, uzun mesafeler taşınması için iki mekanizma olabileceği öne çıkmıştır. Birincisi, göçmen kuşlar ile birlikte kenelerin taşınmasıdır. İkinci mekanizma ise, uluslararası çiftlik hayvanlarının ticaretidir. Bu vasıta ile hayvanlar ile birlikte keneler de taşınabilmektedir. Bu iki yol da KKKAV enfekte kenelerin taşınarak ülkelerde salgınlara ve enfekte olan veya olmayan bir bölgeye yeni bir virus/suş gelmesine neden olabilmektedir (Bente ve ark., 2013).

Kuşların üzerinde bulunan kene sayısı göreceli olarak diğer hayvanların taşıyabileceğinden az olsa da, özellikle göç etme sırasında enfekte keneleri uzun mesafeler taşıyıp virusun yayılımını genişletebilmekte ve hastalık bulaştırmada önemli rol oynamaktadır (Hasle ve ark., 2009 ve Hoogstraal ve ark., 1961). Yapılan birçok çalışmada (Hasle ve ark., 2009; Estrada-Pena ve ark., 2012), kuşların KKKAV'nü farklı kıtalara taşıyabildiği vurgulanmaktadır. Kenenin, kuşlar üstündeki beslenme süresi dikkate alınırsa, enfekte kene Afrika'daki bir bölgeden Akdeniz'de bir bölgeye direk olarak taşınmayabilir. Ancak, kuşlar göç etme sırasında birden fazla yerde durup dinlenmekte ve beslenmektedir. Bu sırada da üzerindeki keneler bu duraklama alanlarında konaktan ayrılmakta veya yeni keneler kuşa tutunup yeni duraklama noktasına kadar seyahat etmektedir. Ortaya çıkan görüşe göre, Afrika'nın batısından göç eden kuşlar kısa aralıklar ile durmakta, bu alanlarda üzerlerindeki keneleri bırakmakta ve bu alandan da yeni keneleri üzerlerine alarak yolcuğu devam ettirmektedirler. İspanya'da bulunan KKKAV'nün moleküler özelliklerinin Afrika'nın batı kıyısındakiler ile birbirine benzemesi bu görüşü destekleyen bir kanıttır (Estrada-Pena ve ark., 2012). Bu çalışmada, 2011 yılında Fas'da kuşlardan 52 kene

toplanmıştır. Yapılan havuzların 3 tanesinde KKKAV genomik RNA'sı tespit edilmiştir. Bu bulgu ile de göç eden kuşların enfekte keneleri taşıdığı doğrulanmıştır. Buna göre de Afrika (Fas) ile Avrupa (İspanya) arasında kuşlar aracılığı ile KKKAV'nün taşındığı da gösterilmiştir. Kuşların üstündeki bazı kenelerin ortalama 2-3 hafta kaldığı bilinmektedir. Bazı göçmen kuşlara takılan takip sistemleri ile yapılan gözlemlerde, saatlik ortalama yaklaşık 50 kilometre ile uçabildiği ve bu hesapla da enfekte kenelerin, kuşlar üzerinde olgunlaşırken farklı kıtalara geçebileceği de mümkün olduğu görülmektedir ve kenelerin virus taşınması ile ilgili diğer görüşleri desteklemektedir (Estrada-Pena ve ark., 2012; Lindeborg ve ark., 2012; Palomar ve ark., 2013 ve Schmaljohann ve ark., 2007). Göçmen kuşların, keneleri kıtalar arasında taşıdığını destekleyen başka bir çalışmada, İtalya ve Yunanistan'daki kuş gözlem noktalarında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kenelerden 3 tanesi KKKAV yönünden pozitif tespit edilmiştir. Pozitif bulunan bu keneler Yunanistan'ın Antikythira bölgesinden geçen kuşlardan elde edilmiştir. Yapılan filogenetik analizlerin sonucuna göre de, Afrika 3 genotipine ait olduğu ortaya konulmuştur (Lindeborg ve ark., 2012).

2016 yılı Ağustos ayında İspanya'da ilk kez bir insanda kene kaynaklı yerel bir bulaşma tespit edilmiştir. Görülen bu yerel bulaşma Palomar ve ark. (2017), tarafından 2013-2015 yılları arasında 2000'den fazla kenede ve 200'den fazla insan serumunda yürütülen araştırma sonuçlarına göre oldukça ilginçtir. Çünkü bu çalışmada, kenelerde KKKAV tespiti veya insanlarda antikör tespiti yapılamamıştır. Yerel bulaşmalar tespit edildikten sonra, 9000'den fazla kenede yürütülen çalışmada yabani hayvanlardan toplanan kenelerde KKKAV genomu tespiti gerçekleştirilmiştir. Evcil hayvanlardan toplanan kenelerde ise virus tespiti gerçekleşmemiştir. İspanya'da tespit edilen KKKAV genomları Afrika genetik hat 3 içinde sınıflandırılmıştır (Mora-Rillo ve ark., 2017). İspanya'da tespit edilen KKKAV'larının kaynağının Fas göç rotasını kullanan göçmen kuşların taşıdığı kenelerden köken almış olabileceği belirtilmiştir (Negredove ark., 2017).

İngiltere’de kuşlardan toplanan keneler arasında olgun olmayan *H.marginatum* da tiplendirilmiştir ve her baharda birçok kenenin bu şekilde ülkeye geldiği belirtilmiştir (Jameson ve ark., 2012). Yine Norveç’te, göçmen kuşlardan toplanan keneler arasında bir Afrika kenesi olan *H.rufipes* de bulunmuştur (Hasle ve ark., 2009). Bu şekilde kenelerin yayılabileceği; Almanya’da bir insanda olgun *H.marginatum* tespiti ve Macaristan’da da bir inek üzerinde *H.rufipes* bulunması ile de hava sıcaklığının kenelerin coğrafik dağılımı açısından çok önemli olmadığını, erişkin kenelerin soğuk havalara da dayanıklı olduğunu göstermektedir (Hornok ve ark., 2012; Kampen ve ark., 2007 ve Turell ve ark., 2007).

Ülkemizde de Karadeniz Bölgesi’nde bir göçmen kuştan toplanan nimfte KKKV RNA’sı tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda ise, bu virusun Rusya ve Avrupa suşlarına filogenetik olarak yakın olduğu görülmüştür (Leblecioğlu ve ark., 2014).

### **1.1.5. Arbovirusların Dünyadaki Dağılımı**

#### **1.1.5.1. Flavivirusların Dünyadaki Dağılımı**

BNV, 1937 yılında Uganda’da hasta bir kadının kanında bulunduktan sonra 1999 yılında Amerika kıtasına ulaşmış ve büyük salgınlara neden olmuştur (Rappole ve Hubalek, 2003 ve Smithburn ve ark., 1940). 1950’li yıllarda Mısır’ın Nil deltasında yapılan serolojik çalışmada insanlarda %40 oranında seropozitiflik elde edilmiştir (Smithburn ve ark., 1954).

USUV, Avrupa’da ilk olarak 1996 yılında İtalya’da tespit edildikten sonra diğer Avrupa ülkelerinde de bildirilmiştir. BNV ise, İtalya’da ilk kez 1998 yılında atlarda ensefalitise neden olduğu zaman tespit edilmiştir (Autorino ve ark., 2002). İtalya’da görülen, insan ve at klinik vakaları üzerine, 2008 yılında sivrisinek ve kuş örnekleri toplanması için bölgesel sürveyans programı oluşturulmuştur (Angelini ve ark., 2010). Bu kapsamda toplanan, yabani kuş ve sivrisinek havuzunda BNV ve



USUV taraması yapılmış ve hem sivrisinek havuzlarında hem de yabani kuşlarda USUV ve BNV tespit edilmiştir.ve yabani kuşların da 44 tanesinde BNV, 11 tanesinde de USUV tespit edilmiştir (Tamba ve ark., 2011). Aynı bölgede yapılan başka bir çalışmada ise nötralizasyon testleri sonucunda USUV ve BNV'ye karşı yabani kuşlarda seropozitiflik tespit edilmiştir (Llopis ve ark., 2015). Son yıllarda kuzey İtalya'da yapılan bu virolojik ve serolojik çalışmalar virusun zoonotik potansiyelini göstermiştir (Calzolari ve ark., 2013 ve Cavrini ve ark., 2009). Ayrıca, bu sonuçlar ile virusların bu bölgedeki insanlar için tehdit oluşturabileceği ve bu nedenle daha geniş bir örnekleme çalışmasının yapılması gerektiği vurgulanmıştır (Tamba ve ark., 2011).

Amerika Birleşik Devletleri'nde sinirsel klinik semptomları bulunan ve encephalomyelit olduğu tespit edilen 3 alpakada BNV tespit edilmiştir. Yapılan histolojik incelemeler sonucunda, alpakalardaki encephalomyelit durumunun atlardaki tablo ile aynı şekilde olduğu görülmüştür (Dunkel ve ark., 2004).

Amerika Birleşik Devletleri'nde BNV çok önemli bir halk sağlığı sorunudur. 1999 yılında virus ülkeye girdikten sonra günümüze kadar olan süreçte ülkenin her yerine yayılmıştır. Konu ile ilgili raporlara göre; 1999-2017 yılları arasında insanlarda tespit edilen BNV vaka sayısı 48,183, bu vakalarda sinirsel semptom gösterenlerin sayısı 22,999 ve ölen insan sayısı ise 2,163'tür (CDC, 2018).

#### **1.1.5.2. Nairovirusların Dünyadaki Dağılımı**

Avrupa'da KKKAV enfekte bölgeler incelendiğinde temel konakçı olarak kır tavşanları dikkat çekmektedir ve benzer şekilde Kırım'da hayvanlardan izole edilen 11 KKKAV'nün 3 tanesi kır tavşanlarından (*Lepus europaeus*) elde edilmiştir (Chumakov, 1974). Kır tavşanlarına yapılan KKKAV deneysel enfeksiyonda inokulasyon sonrası 15. günde vireminin devam ettiği görülmüştür (Zgurskaya ve ark., 1971). Kırım bölgesindeki ilk salgında, yapılan araştırmalar sonucunda, Avrupa kır tavşanlarında kenelerin sayısının normalden daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Bu artış sebebiyle de, kene-kır tavşanı ilişkisinin bu salgında çok önemli olduğunun düşünülmesine neden olmuştur (Hoogstraal, 1979).

Madagaskar'da 1985 yılında, kesimhanedeki bir sığır üzerinden toplanan *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* türü kenede KKKAV tespit edilmiştir. Sonraki yıllarda, 1995 mezbaha çalışanından toplanan kanlardan elde edilen verilere göre; 15 çalışmada antikor tespit edilirken, bir tanesinde de IgM tespiti gerçekleştirilmiştir (Andriamandimbyve ark., 2011). Senegal'de de sığır ve keçilerde KKKAV antikor pozitiflikleri bulunmaktadır (Zeller ve ark., 1997).

1944 yılında Kırım'da görülen vakaların benzerleri Bulgaristan'da görülmeye başladıktan sonra, ülkede araştırmalar başlatılmıştır. Araştırmalar neticesinde 1970 yıllarında fare beyninden KKKAV için aşı elde edilmiştir. Bununla birlikte, hiperimmünize edilmiş gönüllülerden de spesifik immunglobülinler hastaların tedavisinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. 1953 yılından beri paylaşılan verilere göre 1500'den fazla insan vakası bulunmaktadır. Çoğunlukla ülkenin doğu bölgesinde, yaz/bahar aylarında ve tarım-hayvancılık ile uğraşan insanlarda hastalık tespitleri mevcuttur. Yapılan araştırmada, toplanan 911 kenenin yaklaşık %2'sinde KKKAV tespiti bulunmaktadır (Gergova ve ark., 2012). 2014 yılında Bulgaristan'da, enfekte bölgelerdeki hayvanlardan toplanan kenelerden elde edilen verilere göre, Avrupa 1 ve Avrupa 2 genotipinin ülkede sirküle olduğu ortaya konmuştur (Panayotova ve ark., 2016).

Balkan ülkelerinden Kosova'da 1950'li yıllarda, Arnavutluk'ta 1986'da salgınlar bildirilmiştir (Duh ve ark., 2008 ve Papa ve ark., 2002). Kosova'da KKKAV'nün yaygınlığının araştırılması amacıyla yapılan çalışmada toplanan kenelerin (n=1102) 40 tanesinde KKKAV RNA'sı tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen genetik analizlerin karşılaştırılması sonucu KKKAV'lerinin orijininin Türkiye ve Yunanistan olduğu bildirilmiştir. Kosova'da sığır, koyun ve insanlarda yapılan serolojik çalışmada ise sığırların %4-18,4'ünde, koyunların %3,1'inde ve insanların %4'ünde antikorlar tespit edilmiştir (Fajs ve ark., 2014; Sherifi ve ark., 2014 ve Sherifi ve ark., 2016).

KKKAV, Yunanistan'da 1975 yılında tespit edilmiş ve sonrasında *Rhipicephalus bursa* türü keneden AP92 suşu izole edilmiştir (Bente ve ark., 2013).

İspanya'da 2010 yılında yapılan bir çalışma kapsamında geyiklerden toplanan yarı beslenmiş kenelerden KKKAV RNA'sı elde edilmiştir. Yapılan filogenetik analizler sonucunda da bu virusun Afrika'dakiler ile aynı dalda çıktığı gösterilmiştir (Estrada-Pena ve ark., 2012).

Cezayir'de, KKKAV'nün dağılımını araştırmak amacıyla toplanan kenelerde yapılan bir araştırmada 15 kenede KKKAV AP92 suşu ile uyumlu gen sekansları elde edilmiştir. Elde edilen bu bulgu, Avrupa 2 genotipinin sadece Balkanlar ve Türkiye ile sınırlı olmadığını göstermiştir (Kautman ve ark., 2016).

Çin'de meydana gelen kanamalı ateş semptomlu bir salgında insanlardan, koyunlardan ve kenelerden KKKAV tespit edilmiştir (Yen ve ark., 1985).

Pakistan'da, 1960'lı yıllarda *Hyalomma* kenelerinden virus izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Begum ve ark., 1970). 2008 yılında ise Pakistan'da KKKAV tespit edilen numunelere yapılan sekans işlemleri sonrasında Asya-1 ve Asya-2'nin ülkede sirküle olduğu belirlenmiştir. Asya-2'nin ülkeye gelmesindeki bir teori, göç eden kuşların taşıdığı keneler ile de ülkeye girmiş olabileceği yönündedir (Alam ve ark., 2013).

İran'da ise ilk bildirim 1970 yıllarına dayanmaktadır. Bu dönemde, koyunlarda virus tespiti, insanlarda ve sığırlarda antikör tespitinin yanında kenelerden de virus izolasyonu yapıldığı bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda koyunların %41,9-77,5, ineklerde %30 ve keçilerin de %33,3- 46 oranında seropozitif oldukları görülmüştür (Chinikar ve ark., 2010; Hoogstraal, 1979; Sureau ve Klein, 1980 ve Telmadarraiy ve ark., 2010).

Hindistan'da 2011 yılında *Hyalomma anatolicum* kenelerinde, bufaloda ve insanlarda KKKAV RNA'sı ve antikör pozitiflikleri tespit edilmiştir (Mourya ve ark., 2012).

### 1.1.5.3. Phlebovirusların Dünyadaki Dağılımı

İtalya'daki meningoensefalit vakalarının Ağustos ayında en yüksek seviyede seyretmesiyle birlikte bunun tatarcıkların aktivitesi ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, nörolojik vakalar ve TOSV arasında bağlantılar kurulmuş ve İtalya'da, meningoensefalit vakalarının %30-40'ının etkeninin TOSV olduğu ortaya konulmuştur (Braitto ve ark., 1998; Charrel ve ark., 2005; Nicoletti ve ark., 1991 ve Valassina ve ark., 2003).

İtalya'da yaban hayatında 27 dağ faresi, 1 fare, 13 kırmızı fare, 5 sansar, 5 kunduz, 2 porsuk, 2 yarasa, 4 tilki ve 2 kirpi den yapılan örnekleme sonrasında gerçekleştirilen bir çalışmada sadece yarasa beyininde TOSV tespiti yapılmıştır (Verani ve ark., 1982 ve Verani ve ark., 1988).

1980'lerde yarasa, tatarcık ve insanlardan izole edilen TOSV'lere yapılan analizler sonucunda, bu virusların nükleoproteinlerinde bazı değişimler olduğu görülmüştür. İspanya'da klinik semptom gösteren hastalardan toplanan örnekler ile yapılan çalışmada ise, İspanya'da bulunan TOSV'nin İtalya'dakinden farklı olduğu bildirilmiştir (Charrel ve ark., 2005 ve Ciufolini ve ark., 1985).

Yunanistan'da köpeklerden toplanan serumlara yapılan nötralizasyon testleri sonucunda SFSV yönünden %30,2-71,9, TOSV yönünden de %4,4-8,4 oranlarında seropozitiflikler bulunmuştur. Elde edilen bulgular ışığında da, bu grup virusların öncelikli statüye alınması gerektiği ve bu virusların, yaygınlığı nedeniyle de veteriner ve tıp camiasında üzerinde durulmasının önemli olduğu belirtilmiştir (Alwassouf ve ark., 2016a). Encefalitis tanısı konulan bir vakanın nedeni olarak TOSV genotip C ve meningoensefalit vakasında ise bir phlebovirus olan Adria virusu tespit edilmiştir.

edilmiştir. Akut ateş sendromlu hastaların da %8'inde Phlebovirus varlığı raporlanmıştır (Anagnostou ve ark., 2011 ve Papa ve ark., 2015).

Fransa ve İspanya'da yapılan çalışmalarda, meningitisin en önemli etkenleri arasında TOSV'ün yer aldığı ve insanlarda %26 oranında seropozitiflikler bulunduğu bildirilmiştir (Charrel ve ark., 2005 ve Mendoza-Montero ve ark., 1998). TOSV'ün evcil hayvanlardaki yaygınlığının araştırılması amacıyla at, keçi, domuz, kedi, köpek, koyun ve ineklerden toplam 1186 serum örneği toplanmıştır. Örneklerin %36,2'sinde TOSV antikorları tespit edilmiştir. En yüksek seropozitiflik oranları da kediler (%59,6) ve köpeklerde (%48,3) bulunmuştur. Bu bulgulara göre evcil hayvanların önemli bir çoğunluğunun TOSV ile enfekte olduğu görülmüştür. Yapılan moleküler çalışmada ise sadece bir serum örneğinde TOSV RNA'sı tespit edilmiştir (Charrel ve ark., 2005; Dahmani ve ark., 2016; Hemmersbach-Miller ve ark., 2004; Navarro-Marí ve ark., 2011; Peyrefitte ve ark., 2005 ve Thirion ve ark., 2011).

Portekiz'de, Phlebovirusların kedi ve köpeklerdeki durumunu aydınlatmak için 189 kedi ve 1160 köpekten serum örneği toplanmış, yapılan nötralizasyon testi sonucunda TOSV'e karşı %6,2-6,8 ve SFSV'ye karşı %50,8-56,3 antikor pozitifliği tespit edilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda bu virusların, köpeklerde sirküle olarak, insanlara buluşabileceği teorisi ortaya atılmıştır. Aynı çalışmada sahipli köpeklerdeki TOSV seroprevalansının ise, başıboş köpeklere oranla daha yüksek olduğu da görülmüştür (Alwassouf ve ark., 2016b ve Maia ve ark., 2017).

Arnavutluk'ta Phlebovirusların araştırılması amacıyla yapılan çalışmada toplanan tatarcıklardan yapılan yeni nesil sekanslama sonucunda Balkan virus (BALKV) tespit edilmiştir ve devamında yapılan sörveyans çalışmalarında bu virusun farklı Balkan ülkelerinde bulunduğu ortaya konulmuştur (Ayhan ve ark., 2016 ve Ayhan ve ark., 2017).

1976 yılında yayınlanan makaleye göre Hırvatistan'da Phlebovirusların sirküle olduğu ve yapılan çalışma sonucunda da %15-57 oranında seropozitiflikler

bulunduğu belirtilmiştir (Tesh ve ark., 1976). Hırvatistan'da TOSV genotip C'nin de bulunduğu bildirilmiştir (Punda-Polic ve ark., 2012).

### **1.1.6. Türkiye'de Arbovirusların Dağılımlı**

#### **1.1.6.1. Flavivirusların Dağılımlı**

Türkiye'de BNV ile ilgili ilk çalışmalar 1971 yılına dayanmaktadır. Bu çalışmada koyunlardan toplanan serum örneklerinden; Ankara'da %20 ve Hatay'da %0,9 oranında antikor tespiti bildirilmiştir (Radda, 1971). 1980 yılında ise Ege bölgesinde, insanlardan toplanan serumlarda BNV için %21,5 seropozitiflik bulunmuştur (Serter, 1980).

Türkiye'de 2010 yılında meydana gelen bilinen ilk BNV salgınında çoğunluğu batı illerinden olmak üzere 47 insan vakası tespit edilmiş ve bu vakaların 10'u ölüm ile sonuçlanmıştır. Yine aynı yıl içinde, İzmird'e iki atta da BNV seropozitifliği tespit edilmiştir (Kalaycıoğlu ve ark., 2012).

Ergünay ve ark.(2013), yaptığı araştırmada, Mersin ve Edirne'de kurulan sivrisinek tuzaklarından, Adana, Mersin ve Muğla illerindeki at ve insanlardan BNV RNA'sı tespitleri yapılmıştır. Yine aynı çalışmada Kars ilindeki rdeklerden, şanlıurfa ilindeki atlardan, koyunlardan ve Mersin ilinde insanlardan toplanan serumlara yapılan PRNT sonucunda da sırasıyla %9, %13, %1,9 ve %12 oranında seropozitiflikler bildirilmiştir. Doğu Anadolu Bölgesi'nde yapılan serolojik çalışmada ise 282 eşek, 48 köpek ve 45 sığırdan toplanan kan serumlarına ELISA yöntemi ile BNV antikor taraması yapılmış ve %5,8 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir (Turan ve ark., 2017). Yine 650 at ve 234 eşeğe ait serumlar ile yapılan diğer bir çalışmada da atlarda %4,15 ve eşeklerde %1,28 seropozitiflik tespit edilmiştir (Kale ve ark., 2017) Türkiye'de çeşitli illerden (Muğla, İzmird, şanlıurfa, Bursa, Ankara, Mardin) rnek toplanarak yapılan serolojik çalışmalarda, sığırlarda %4, köpeklerde %37,7, atlarda %13,5, koyunlarda %1 ve insanlarda %20,4- 17

oranında pozitiflikler bildirilerek virusun ne kadar yaygın olduğu gösterilmiştir (Karakoç ve ark., 2013 ve Özkul ve ark., 2006).

Akdeniz ve Trakya bölgelerinde BNV'nin sivrisineklerdeki durumunu araştırmak amacıyla 2012, 2014-2015 yıllarında kurulan sivrisinek tuzaklarından havuzlar oluşturulmuştur. Testler sonucunda Trakya bölgesinde birçok havuz BNV yönünden pozitif bulunmuş ve virüs genetik hat 1, grup 1a olarak sınıflandırılmıştır. Tespit edilen yüksek sayıdaki havuza dayanarak Trakya bölgesinde virus sirkülasyonu gösterilmiştir (Ergünay ve ark., 2013; Ergünay ve ark., 2014 ve Ergünay ve ark., 2017).

Eskişehir'de bir at harasında ortaya çıkan klinik semptomlardan sonra işletmeden toplanan serumlara yapılan testler sonucunda %31,6 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir. Aynı zamanda klinik semptom gösteren bir at ve bir insandan yapılan analizler sonucunda da BNV genetik hat 1, grup 1a, küme 6'da yer aldığı belirtilmiştir (Ergünay ve ark., 2015 ve Özkul ve ark., 2013). 2014 yılında ise klinik semptomlar gösteren Bursa ilinde bulunan harada ölen bir atın beyninden BNV genetik hat 2 tespiti yapılmıştır (Monaco ve ark., 2016).

#### **1.1.6.2. Nairovirusların Dağılımı**

Sağlık Bakanlığı tarafından 2002-2017 yılları arasında ülkemizde 10562 KKKAV vakası tespit edilmiş ve 501 ölüm olduğu bildirilmiştir (Sağlık Bakanlığı, 2018).

Türkiye'de tespit edilen KKKAV'ler çoğunlukla Avrupa genotiplerine yakın bulunmuştur. Türkiye'nin batı bölgesinde kenelerden ve insanlardan yapılan virus teşhisleri sonucunda elde edilen veriler ile viruslar Avrupa 1 ve Avrupa 2 (AP92) gruplarında sınıflandırılmıştır (Ertuğrul ve ark., 2009; Gargili ve ark., 2011; Midilli ve ark., 2009 ve Özkaya ve ark., 2010).

Karadeniz Bölgesi'ndeki illerde toplanan kenelere yapılan analizler sonucunda, enfekte bir bölge olan Kelkit vadisinden, Sinop, Samsun, Ordu, Giresun, Amasya, Tokat ve Sivas illerindeki örneklerde KKKAV RNA'sı tespit edilmiştir (Albayrak ve ark., 2010 ve Tonbak ve ark., 2006). Van, Bayburt ve Mersin illerinde kenelerde ise KKKAV AP92 tespiti yapılmıştır (Dinçer ve ark., 2017).

Marmara bölgesinde hayvanlardaki durumu incelemek için koyun, keçi ve sığırlardan numuneler toplanmış ve keçilerin %66'sı, koyunların %31'i ve sığırların %13'ü KKKAV antikoru yönünden pozitif bulunmuştur. Bu hayvanların %6,6'sı da KKKAV antijeni yönünden pozitif tespit edilmiştir (Tuncer ve ark., 2014). Bir diğer serolojik çalışmada ise Elazığ, Samsun, Sivas, Tokat ve Yozgat illerinden toplanan 100 sığır ve 100 koyun örneğinde yapılan çalışma sonucunda sığırlarda %17 ve koyunlarda %37 KKKAV antikoru tespit edilmiştir (Kırbaş, 2009). Karadeniz bölgesinde koyun ve keçilerden toplanan 105 serumun 78 tanesi KKKAV antikoru yönünden ve 9 tanesi de viral nükleik asit pozitif tespit edilmiştir (Albayrak ve ark., 2012).

Ülkemizde KKKAV ile mücadele amacıyla, Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından risk altındaki bölgelerde bulunan hayvanlar ücretsiz dağıtılan ektoparaziterler ile ilaçlanmakta, aynı zamanda çiftçilere de eğitimler verilmektedir. Sağlık Bakanlığı da hastalık ile mücadele için medya yolu ile halka ulaşarak, kamu spotları yapmakta, broşürler hazırlamakta, halk sağlığı açısından hastalığın önemini anlatarak bilinçlenmeyi sağlamakta ve hızlı tepki verebilmek için hastalık tanısı/mücadelesi amacıyla birimler arası koordinasyon çalışmaları yapmaktadır. Eğitim çalışmaları kapsamında ev ziyaretleri yapılmış; okul, cami ve köy merkezleri gibi halka kolay ulaşılabilecek alanlar da eğitim amacıyla kullanılmıştır. 2013 yılında paylaşılan verilere göre de, 430,000 kişiye yüz yüze eğitim verilmiştir. Sağlık çalışanları da hastanelerde KKKAV ile enfekte hastalar ile yakın temas nedeniyle nazokomial bulaşma hakkında bilgilendirilmiştir. Sahada, tarlada veya orman gibi kene tutunması açısından riskli alanlarda iken koruyucu ekipmanlar kullanılması veya tutunmayı önleyici tedbirler alınması bulaşma riskini düşürmektedir. Diğer hastalıklarda olduğu gibi Kurban Bayramı benzeri hayvan hareketlerinin arttığı özel



günlerde KKKAV'nün de farklı bölgelere taşınma ihtimali yükselmektedir (Leblebicioğlu ve ark., 2016).

### 1.1.6.3. Phlebovirusların Dağılımı

1955 yılında Antalya'da yapılan bir çalışmada, insanlardan toplanan serumlarda SFSV'ye karşı %22 ve SFNV için de %62 oranında antikor yanıtı tespit edilmiştir (Tesh ve ark., 1976). Bu bulguya göre aslında ülkemizde uzun yıllardır phleboviruslar sirküle olmaktadır. Antalya'da elde edilen bulgulardan sonra, 1980 yılında Ege bölgesindeki durumu ortaya koymak için toplanan örneklerdeki antikor yanıtı araştırılmış ve SFNV için %13,9 seropozitiflik bildirilmiştir (Serter, 1980).

2007 ve 2008 yıllarında, Ankara'da yaz aylarında insanlarda ateş, baş ağrısı, bulantı ve kas ağrıları, kusma, eklem ağrıları ve nadiren de ishal ile karakterize bir salgın ortaya çıkmıştır. “**Mamak Ateşi**” olarak isimlendirilen salgının nedeni yeni bir SFSV izolatı (SFTV) olarak bildirilmiştir. Aynı dönemlerde İzmir ve Adana'da benzer vakalar görülmüş ve bunun da nedeninin SFSV olduğu tespit edilmiştir. Ankara'da yapılan retrospektif bir çalışmada numunelerin %22'si SFSV için seropozitif olarak bulunurken, bir numunede de TOSV antikoruna da tespit edilmiş ve aynı anda birden fazla phlebovirusun sahada sirküle olabileceği görülmüştür (Çarhan ve ark., 2010).

İç Anadolu, Karadeniz ve Akdeniz bölgesinde kan donörlerinde yapılan bir araştırmada örneklerin %15,7'sinde TOSV RNA'sı tespit edilmiş ve bu pozitif örneklerin de %25'inde TOSV IgM antikorları bulunmuştur. Pozitif bulunan örneklerle yapılan moleküler testler sonucunda, TOSV genotip A olarak sınıflandırılmıştır (Ergünay ve ark., 2011 ve Ergünay ve ark., 2012a).

Adana'da toplanan tatarcık örneklerine yapılan testler sonucunda üç yeni phlebovirus Adana virus, Toros virus ve Zerdali virus tespit edilerek izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Alkan ve ark., 2015 ve Alkan ve ark., 2016).

İnsanlarda yapılan çalışmaların yanında güney bölgemizde yapılan bir araştırmada kedi, köpek, koyun ve keçiler hedef grup olarak seçilmiştir. Adana ve Mersin’de toplanan serumlara göre, köpeklerin %40’ında ve keçilerin de %4’ünde TOSV’a karşı spesifik antikorlar tespit edilmiştir. Çalışmanın moleküler bölümünde elde edilen bulgulara göre, köpeklerin %9,9’unda bulunan TOSV, yapılan filogenetik analizler sonucunda genotip A ve B olarak sınıflandırılmıştır. Aynı zamanda genotip B tespit edilen köpeklerin 2 tanesinde *Leishmania infantum* da tanımlanmıştır. Bu iki enfeksiyonun ortak noktası, vektör olarak tatarcıkları kullanmalarıdır (Dinçer ve ark., 2015 ve Dinçer ve ark., 2016).

Kanatlı hayvanların birçok patojen için rezervuar oldukları veya taşınmasında rolleri oldukları bilinen bir gerçektir. Özellikle, göçmen kuşlar patojenlerin farklı coğrafyalar arasında naklinde rol oynamaktadır. Hazırlanan bu araştırma kapsamında aynı noktadan hareketle, ülkemiz üzerinde iki önemli doğal konaklama merkezindeki (Samsun ve Hatay illerinde) su rezervlerini paylaşan yabani kuşlarda (göçmen ve/veya yerleşik) ülkemiz için daha önceden tanımlanmış veya tanımlanmamış bazı zoonoz nitelikli virusların araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen verilere dayanarak, söz konusu virusların taşınmasında yerleşik ve göçmen yabani kuşların olası rolleri ve bu yolla taşınan virusların belirlenmesine çalışılmıştır.

## 2.GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1.Gereç

#### 2.1.1.Araştırmada Kullanılan Hayvanlar ve Örnekler

Tez çalışmasında, Samsun ve Hatay illerinde Tarım ve Orman Bakanlığı bünyesinde bulunan Yaban Hayatı Rehabilitasyon Merkezlerine, diğer kuruluşlara getirilen veya avcılar tarafından avlanmış olan toplam 117 adet ölü yabancı kuş (göçmen veya yerleşik) kullanıldı. Araştırma kapsamına alınan kuşların Tür/Aile/Cins dağılımları Çizelge 2.1’de sunuldu.

**Çizelge.2.1.** Araştırma kapsamında kullanılan kuşların Tür/Cins dağılımı.

Kuş Türü	Aile	Cins	Ad	Sayı
Kartal	<i>Accipitriformes</i>	<i>Clanga pomarina</i>	Lesser Spotted Eagle	9
Şahin	<i>Accipitriformes</i>	<i>Pernis apivorus</i>	European Honey Buzzard	10
Leylek	<i>Ciconiiformes</i>	<i>Ciconia ciconia</i>	White Stork/ Black Stork	7
Pelikan	<i>Pelecaniformes</i>	<i>Pelecanus onocrotalus</i>	Great White Pelican	2
Flamingo	<i>Phoenicopteriformes</i>	<i>Phoenicopus roseus</i>	Greater Flamingo	2
Kaya Kartalı	<i>Accipitriformes</i>	<i>Aquila chrysaetos</i>	Golden Eagle	1
Karga	<i>Passeriformes</i>	<i>Corvus cornix</i>	Hooded Crow	2
Balıkçıl	<i>Pelecaniformes</i>	<i>Botaurus stellaris</i>	Eurasian Bittern	3
Su kuşu	<i>Pelecaniformes</i>	<i>Ardea herodias</i>	Great Blue Heron	1
Ördek	<i>Anatidae</i>	<i>Anas</i>	Mallard	24
Kuşu	<i>Anseriformes</i>	<i>Cygnus columbianus</i>	Bewick’s Swan	3
Keklik	<i>Galliformes</i>	<i>Perdix perdix</i>	Gray Partridge	15
Dalgıç kuşu	<i>Gaviiformes</i>	<i>Gavia stellata</i>	Red-Throated Diver	1
Martı	<i>Charadriiformes</i>	<i>Chroicocephalus ridibundus</i>	Black-Headed Gull	3
Baykuş	<i>Strigiformes</i>	<i>Tyto alba</i>	Western Barn Owl	12
Atmaca	<i>Accipitriformes</i>	<i>Accipiter nisus</i>	Eurasian Sparrowhawk	5
Bıldırcın	<i>Galliformes</i>	<i>Coturnix coturnix</i>	Common Quail	11
Kaz	<i>Anseriformes</i>	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	3
Karatavuk	<i>Passeriformes</i>	<i>Turdus merula</i>	Eurasian Blackbird	2
Güvercin	<i>Columbiformes</i>	<i>Columba livia</i>	Common Pigeon	1

Yukarıda verilen merkezlerde yapılan incelemeler sonrasında bu kuşlardan organ/doku örnekleri alınarak -20°C’de donduruldu ve soğuk zincirde Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalına getirildi. Söz konusu hayvanlardan alınan örneklerin lokasyon ve organ/doku çeşitliliği yönünden dağılımı Çizelge 2.2 ve 2.3’de sunuldu. Viroloji Anabilim Dalına ulaşan doku/organ örnekleri ile ilgili tüm çalışmalar anabilim dalı yüksek güvenli laboratuvarlarında (BSL-3) gerçekleştirildi.

**Çizelge.2.2.** Hatay bölgesinde çalışmaya dahil edilen 61 kuşa ait örneklerin dağılımı.

Kuş		Doku/Organ							
Türü	Sayı	Akciğer	Karaciğer	Dalak	Böbrek	Tüy	Kan	Beyin	TOPLAM
<b>Kartal</b>	9	2	2	2	2	2	0	7	<b>17</b>
<b>Şahin</b>	10	10	10	10	10	10	0	2	<b>52</b>
<b>Leylek</b>	7	3	3	3	3	3	0	7	<b>22</b>
<b>Pelikan</b>	2	2	2	2	2	2	0	0	<b>10</b>
<b>Flamingo</b>	2	2	2	1	2	2	0	0	<b>9</b>
<b>Kaya Kartal</b>	1	1	1	1	1	1	0	0	<b>5</b>
<b>Karga</b>	1	1	1	1	1	-	0	1	<b>5</b>
<b>Bahkçıl</b>	2	0	0	0	0	0	0	2	<b>2</b>
<b>Su kuşu</b>	1	0	1	0	0	1	1	0	<b>3</b>
<b>Ördek</b>	4	3	3	3	3	3	0	1	<b>16</b>
<b>Keklik</b>	1	1	1	0	0	1	0	1	<b>4</b>
<b>Martı</b>	2	0	0	0	0	0	0	2	<b>2</b>
<b>Baykuş</b>	12	10	10	0	10	0	0	12	<b>42</b>
<b>Atmaca</b>	5	2	2	2	2	0	0	3	<b>11</b>
<b>Karatavuk</b>	2	2	2	2	0	2	0	0	<b>8</b>
<b>TOPLAM</b>	<b>61</b>	<b>39</b>	<b>40</b>	<b>27</b>	<b>36</b>	<b>27</b>	<b>1</b>	<b>38</b>	<b>208</b>

**Çizelge.2.3.** Samsun bölgesinde çalışmaya dahil edilen 56 kuşa ait örneklerin dağılımı.

Kuş		Doku/Organ						
Türü	Sayı	Akciğer	Karaciğer	Dalak	Böbrek	Tüy	Kan	TOPLAM
<b>Karga</b>	1	1	1	1	1	-	0	<b>4</b>
<b>Bahkçıl</b>	1	1	1	1	1	1	0	<b>5</b>
<b>Ördek</b>	20	20	20	20	20	20	0	<b>100</b>
<b>Kuğu</b>	3	3	3	0	3	3	0	<b>12</b>
<b>Keklik</b>	14	13	13	4	9	13	0	<b>52</b>
<b>Dalgıç kuşu</b>	1	1	1	0	1	1	0	<b>4</b>
<b>Martı</b>	1	1	1	0	1	1	0	<b>4</b>
<b>Bıldırcın</b>	11	11	11	11	11	11	0	<b>55</b>
<b>Kaz</b>	3	3	3	3	3	3	0	<b>15</b>
<b>Güvercin</b>	1	1	1	1	1	1	0	<b>5</b>
<b>TOPLAM</b>	<b>56</b>	<b>55</b>	<b>55</b>	<b>41</b>	<b>51</b>	<b>54</b>	<b>0</b>	<b>256</b>

### 2.1.2. Kontrol Amacıyla Kullanılan Viruslar ve Hücre Kültürü

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen RT- PCR kapsamında pozitif kontrol amacıyla kullanılmak üzere BNV, TOSV ve KKKA virusları sırasıyla Flavi, Phlebo- ve Nairovirus PCR uygulamalarında kullanıldı. Bu viruslar Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edildi. Zikavirus Real Time RT-PCR taraması çalışmasında ise pozitif kontrol olarak kullanılan ZIKV gRNA'sı ise INIA CISA, Madrid, İspanya tarafından sağlandı.

Çalışmada kullanılan Vero E6 hücre kültürü Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı hücre koleksiyonundan temin edildi. Hücreler, %5 fetal bovine serum içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) içinde çoğaltıldı.

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Dokuların İşlenmesi

Laboratuvara getirilen doku/organ örneklerinin homojenizasyonu, gerekli biyogüvenlik şartlar altında gerçekleştirildi. Öncelikle, makas-bistüri yardımı ile küçültülen dokular bu işlemi takiben antibiyotikli medyum içinde 1/10 oranında sulandırılarak homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar 4000 rpm'de, 10 dakika (dk) 4°C'de santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant porsiyonlanarak, -20°C'de saklandı. Bu porsiyonların bir bölümü moleküler tanı yöntemleri ile genomik RNA (gRNA) tespiti için kullanılırken, kalan kısmı RT-PCR ile pozitif bulunan doku örneklerinden virus izolasyonu için hücre kültürlerine inokule edildi.

### 2.2.2. Viral Nükleik Asit İzolasyonu

Doku homojenatlarından gRNA izolasyonu için, ticari ekstraksiyon kiti (Ribospin™ vRD plus, GeneAll, G. Kore) kullanıldı. İzolasyon işlemi ürün geliştiricisi firmanın yönergesi doğrultusunda, aşağıda özetlendiği şekilde yapıldı:

- 300 µL örnek 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı.
- Üzerine 500 µL VL buffer eklenerek vortekslendi. Tüp kısa süreyle santrifüj edildi ve 10 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletildi.
- Üzerine 700 µL RB1 buffer eklendi ve vortekslenip kısa bir santrifüj yapıldı.
- Hazırlanan karışım mini spin-kolona aktarılıp 10,000xg'de 30 saniye (sn) santrifüj edildi.
- Üzerine 500 µL RBW buffer eklenip tekrar 10,000xg'de 30 sn santrifüj edildi.
- Üzerine 500 µL RNW buffer eklenip tekrar 10,000xg'de 30 sn santrifüj edildi.
- 10,000xg'de 60 sn santrifüj edildi.

- Mini spin kolon, 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne alınıp, üzerine 30 µL nükleaz free su eklenip oda sıcaklığında 1 dk beklendi.
- 10,000 xg'de 60 saniye santrifüj edildi.

Elde edilen ekstraktlar kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

### 2.2.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Elde edilen ekstraktlar ilk önce reverse transkripsiyon (RT) işlemine tabi tutularak komplementer DNA (cDNA) elde edildi. RT işlemi için ticari kit kullanıldı (First Strand cDNA sentez kiti, Fermentas/Thermo, Litvanya) ve üretici firma tarafından önerilen protokol uygulandı. Buna göre RT işlemi için Karışım-1;

Random Hexamer	0,5 µL
Deiyonize su	3 µL
RNA	3 µL

olacak şekilde hazırlandı ve 72°C'de 5 dakika bekletildi.

Daha sonra Karışım-2,

dNTP	1 µL
5x buffer	2 µL
RT enzimi	0,5 µL

olarak hazırlandı ve Karışım-1 ile karıştırıldıktan sonra aşağıda verilen sürelerde tanımlanan ısı derecelerinde muamele edildi:

25°C'de 10 dakika  
37°C'de 60 dakika  
72°C'de 10 dakika

Elde edilen cDNA'lar, Phlebovirus, Nairovirus cinsi Bunyaviruslar, ile Flavivirusların araştırılması için PCR'da kalıp DNA'lar olarak kullanıldı.

#### 2.2.4. Hedef DNA'ların çoğaltılması:

Tez kapsamında toplanan yabancı kuşlara ait doku/organ örneklerinde aranan Phlebo-, Flavi- ve Nairovirusların tespit edilmesi amacıyla kullanılan Primer/Prob dizileri Çizelge.2.4 de sunuldu.

Çizelge 2.4'de sunulan TBPVL ve HRTGL primerleri, kene kaynaklı Phlebovirusların tespit edilmesi amacıyla kullanıldı. Araştırmada kullanılan Phlebovirus primerlerinin tespit ettiği bazı viruslar aşağıda sunuldu:

RVFV	Rift Valley fever virus,
TOSV	Toscanavirus
UUKV	Uukuniemi virus
HRTV	Heartland virus
SFSV	Sandfly fever Sicilian virus
SFNV	Sandfly fever Naples virus
TBPVs	Tick-borne phleboviruses
SFTSV	Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus
BHAV	Bhanja virus

Çizelge 2.4'de sunulan Flavivirus primerleri ile tespit edilebilen virüsler aşağıda sunuldu;

YFV	Yellow fever virus
DENV	Dengue virus
BNV	Batı Nil Virusu
JEV	Japanese encephalitis virus
TBEV	Tick-borne encephalitis virus
USUV	Usutu virus



**Çizelge. 2.4.** Araştırma kapsamında tanısal amaçla yapılan in vitro amplifikasyon uygulamalarında kullanılan primer/prob özellikleri.

Primer Kodu	Primer Dizini (5'→3')	Kaynak	Amplikon Büyüküğü ve Hedef gen
<b>PHLEBOVIRUS</b>			
PhIP2	GGCTACTTCAARAAYAARGANGA	Klimentov ve ark. (2016)	507bp L segment
PhIM2	CTCTCTCAGICCICCRTGYTG		
SFNV-S1	CTTYTTRTCYTCYCTRGTGAAGAA	Charrel ve ark. (2007)	433 bp S segment
SFNV-R1	ATGATGAAGAARATGTCAGAGAA		
SFNV-S2	GCRGCCATRRTTKGGYTTTTCAA		286 bp S segment
SFNV-R2	CCTGGCAGRGACACYATCAC		
TBPVL-F	CAGCATGGIGICTIAGAGAGAT	Matsuno ve ark. (2015)	514bp L segment
TBPVL-R	TGIAGIATSCCYTGCATCAT		
HRTGL-F	CAGCATGGIGIYTIAGRGAAATYTATGT		523bp L segment
HRTGL-R	GAWGTRWARTGCAGGATICCYTGCATCAT		
NPhlebo1	ATGGARGGITTGTIWSICIICC	Sanchez-Seco ve ark. (2003)	553 bp L segment
NPhlebo1	AARTTRCTIGWIGCYTTIARIGTIGC		
NPhlebo2	WTICCIAAICCIYMSAARATG		244 bp L segment
NPhlebo2	TCYTCYTTRTTYTTRARRTARCC		
<b>FLAVIVIRUS</b>			
1NS5F:	GCATCTAYAWCAYNATGGG	Vazquez ve ark. (2012)	1111 bp
1NS5Re:	CCANACNYNRTTCCANAC		
2NS5F:	GCNATNTGGTWTYATGTGG		983 bp NS5
2NS5Re:	CATRTCTTCNGTNGTCATCC		
<b>Zikavirus</b>			
ZIKV-F	CCGCTGCCCAACACAAG	Lanciotti ve ark. (2007)	77 bp Poliprotein
ZIKV-R	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT		
ZIKV-Pr	FAM- GCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-TAMRA		
<b>NAIROVIRUS</b>			
Primer F	ACAGCARTGIATIGGICCCAYTT	Honig ve ark., 2004	443bp L segment
Primer R	ATGATTGCIAYAGIAAYTTYAA		

Çizelge 2.4’de sunulan Nairovirus primerleri ile tespit edilebilen viruslar:

- NSDV      Nairobi sheep disease virus  
 KKKAV      Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virusü

DUGV Dugbe virus'tur

Çalışmada kullanılan PCR master miksleri hazırlamada ticari kit (Thermo Scientific Taq DNA Polymerase, ABD) kullanıldı ve içeriği aşağıda sunuldu:

Moleküler Saf Su	18,4	µL
10x Reaksiyon Tamponu	3	µL
MgCl <sub>2</sub>	2,4	µL
dNTP	0,8	µL
Forward Primer	0,8	µL
Reverse Primer	0,8	µL
Enzim	0,8	µL
cDNA	3	µL
Toplam	30	µL

Zikavirus tespiti amacıyla yapılan tek basamaklı Real Time RT-PCR için hazır tampon sistemi kullanıldı (QuantiNova Pathogen+IC, Qiagen, Almanya). Reaksiyonlar için hazırlanan karışım aşağıda sunuldu;

4x Reaksiyon tamponu	5	µL
Forward Primer	1,6	µL
Reverse Primer	1,6	µL
Prob	1	µL
Moleküler Saf Su	5,8	µL
RNA	5	µL
Toplam	20	µL

Bildirilen primer/problar için yapılan optimizasyon sonrası kullanılan ısı döngüleri Çizelge.2.5'de sunuldu.

**Çizelge.2.5.** PCR uygulamaları için kullanılan amplifikasyon protokolleri.

<b>PhiP2 -PhiM2 primer çifti için</b>			<b>TBPVL-F-TBPVL-R ve HRTGL-F-HRTGL-R primerleri için</b>		
95°C	5 dk		94°C	5 dk	
95°C	45 sn	40 siklus	94°C	45 sn	40 siklus
50°C	1 dk		55°C	1 dk	
72°C	1 dk		72°C	1 dk	
72°C	6 dk		72°C	5 dk	
<b>SFNV S1-SFNV R1 SFNV S2 –SFNV R2 primerleri için</b>			<b>NPhlebo1-NPhlebo1 NPhlebo2-NPhlebo2 primerleri için</b>		
94°C	5 dk		95°C	5 dk	
94°C	30 sn	40 siklus	95°C	30 sn	40 siklus
49°C	1 dk		45°C	1 dk	
72°C	1 dk		72°C	1 dk	
72°C	7 dk		72°C	5 dk	
<b>1NS5F-1NS5Re ve 2NS5F-2NS5Re primerleri için</b>			<b>Primer F- Primer R, Touch-up PCR için</b>		
94°C	5 dk		94°C	5 dk	
94°C	1 dk	40 siklus	94°C	1 dk	40 siklus
52°C	3 dk		42-50°C	1 dk	
72°C	1 dk		72°C	3 dk	
72°C	5 dk		72°C	5 dk	
<b>ZIKV-F1, ZIKV-R, ZIKV-Pr ile real time RT-PCR için</b>					
50°C	10 dk				
95°C	2 dk				
95°C	5 sn	40 siklus			
60°C*	30 sn				

\* Floresan okuma basamağı

Örneklerin amplifikasyon süreci tamamlandıktan sonra, olası PCR ürünlerini görüntülemek amacıyla, %1'lik agaroz jel (Prona, EU) + Safe-Red (ABM, Kanada) hazırlandı. Agaroz jelin hazırlanmasında ve tank tamponunda Tris-Asetat-Etilen Diamin Tetra Asetik asit (TAE) tampon solüsyonu kullanıldı. 0,5xTAE solüsyonu içinde mikrodalga yardımıyla eritilen agaroz, soğutulduktan sonra üzerine Safe-Red boyası (0,5 µg/ml) eklendi ve jel tarakları yerleştirilmiş olan jel taşıyıcısına döküldü. Donan agaroz jeldeki taraklar çıkarılarak, elektroforez tankına yerleştirildi.

PCR ürünleri, yükleme boyası (6x Loading Dye, Fermentas Litvanya) ile 1 kısım boya + 5 kısım PCR ürünü olacak şekilde karıştırılarak, kuyucuklara konuldu. Ürün büyüklüğünün yaklaşık olarak belirlenebilmesi için 3000 bp'lik DNA merdiveninden (Fermentas, Litvanya) (1 kısım stok marker + 1 kısım yükleme boyası + 4 kısım su) bir kuyucuğa 1 µl olarak yüklendi. Daha sonra ürünler elektrik akımına tabi tutularak (8 volt/cm), yaklaşık 30 dk sonra jel görüntüleme sistemi (Kodak, Gel Logic 100, ABD) ile PCR sonucu oluşan DNA bantları görüntülendi.

Uygun büyüklükte tespit edilen PCR ürünleri sekanslama işlemi için ayrılarak hedef bant saflaştırma ve takiben dizin analizi işlemlerine tabi tutuldu. Ayrıca PCR ürünü dizin analizi yöntemi ile doğrulanan organ/doku homejenatlarına izolasyon prosedürleri uygulandı.

### **2.2.5. Dizin Analizi, Sonuçların Değerlendirilmesi ve Filogenetik**

#### **Analizler**

RT-PCR ile elde edilen PCR ürünlerinin pürifikasyonu ve dizin analizi ticari bir firmadan (BM Lab., Ankara) hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi. Analiz sonrası elde edilen ham veriler, National Center Biotechnology Information (NCBI) servisinin Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) web sayfasından sağlanan hizmetten yararlanılarak tanımlandı. Dizinler, Aliview (Larsson, 2014) ve "Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences (*mafft*) v.7.427" yazılımı (Kato ve Standley, 2016) kullanılarak kendi aralarında karşılaştırıldı. Aynı

programın çoklu hizalama özelliğinden yararlanılarak elde edilen veriler, Gen Bankasından elde edilen diğer viruslarla hizalandı.

Bu çalışmada elde edilen virüslere ait dizinlerin, daha önceki çalışmalarda tespit edilen virus dizinleri ile arasındaki genetik yakınlığın ortaya konulması amacıyla, nükleik asit dizinleri üzerinden gerçekleştirilen filogenetik analiz için MEGA versiyon X (Kumar ve ark., 2018), MrBayes (Ronquist ve Huelsenbeck, 2003), RAxML (Stamatakis, 2014) programlarında filogenetik analizler paralel yapılarak oluşturulan ağaçların doğrulukları kontrol edildi. Tüm programlarda Maximum Likelihood metodu tercih edildi. MEGA X programında General Time Reversible (GTR)+ Gamma modellemesinde 1000 bootstrap yapılarak %50'den fazla benzer modeller gösterildi. RAxML programında en uygun ağacı bulmak için GTR+Gamma yöntemi ile 1000 bootstrap yapılarak en uygun ağaç elde edildi. MrBayes programında ise Markov chain Monte Carlo analiziyle GTR+ Gamma yöntemi kullanılarak kümelenme değeri 0.001 altında toplanıncaya kadar 2 farklı kanalda bootstrap yapılarak en uygun ağaç bulundu. RAxML ve MrBayes programlarından çıkan veriler Figtree 1.4.3 (Rambaut, 2009) ve Dendroscope 3 (Huson ve Scornavacca, 2012) ile işlenerek ağaçlar elde edildi. Kullanılan 3 analiz programından elde edilen ağaçlar benzer olduğunda analiz sonuçları güvenilir olarak kabul edildi.

Nükleotit ve aminoasit benzerlik tablolarının oluşturulması amacıyla CLC Main Workbench 8.1 (Qiagen, Almanya) kullanıldı.

### **2.2.6. Virus İzolasyonu**

TOSV ve BNV yönünden pozitif tespit edilen numunelere ait homojenatlar virus izolasyonu amacıyla Vero E6 hücre kültürüne inokule edildi. Bu amaçla;

- Hücre ile kaplı T25 hücre kültürü şişeleri vasat ile yıkandı.

- Daha sonra ekilecek olan şüpheli organ homojenizatına ait 0,22 um'lık filtreden geçirilmiş 0,5 ml süpernatant hücre kültürü şişesine konularak 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
- Hücre kültürü şişesi içindeki inokulum toplandıktan sonra 5 ml vasat eklendi ve 37°C'lik ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi.
- İvert mikroskopta her gün selüler patolojiler (CPE) yönünden kontrol edildi.
- Pozitif olan hücreler -80°C'de dondurulup, 37°C'de çözüldü. Daha sonra santrifüj tüpüne aktarılarak +4°C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kriotüplere porsiyonlanıp moleküler tanı ve/veya yeni pasajlama işlemleri için kullanıldı (Kent ve ark., 2010). Bu uygulama 5 pasaj tekrar edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Araştırmada Kullanılan Kuşlar

Araştırma kapsamında Hatay ve Samsun illerindeki kuş konaklama alanlarına yakın rehabilitasyon merkezlerince laboratuvarımıza dokuları gönderilen kuşların, yapılan sınıflandırma sonucunda, 20 farklı kuş türüne ait örneklerin alındığı gözlendi. Yapılan sınıflandırma çalışması sonrasında Hatay'dan 15 ve Samsun'dan ise 10 farklı kuş türünün örneklendiği tespit edildi. Bu kuşların bir kısmının göçmen (66), bir kısmının ise yerleşik (51) kuşlar olduğu belirlendi. Çalışma kapsamına alınan kuşların Tr/Aile/Cins dağılımları izelge 2.1'de sunuldu.

Bu hayvanlardan toplam 464 tani materyali çalışma kapsamında kullanıldı. Bu materyallerin kuş ve organ ve/veya doku örnekleri temelinde sınıflandırması izelge 3.1'de sunuldu.

#### 3.2. Viral Genom Tespiti alışmaları

Tez alışması kapsamında Hatay ve Samsun illerinden toplanan toplam 117 kuşa ait doku/organ örneklerinde yapılan RT-PCR sonucunda 18 kuşta araştırma kapsamında aranan viruslar tespit edildi. Bu çalışmada virus tespit edilen kuşlardan 4' Hatay, 14' ise Samsun illerindeki rehabilitasyon merkezlerinden ve avcılardan temin edildi. Kuşlardan bir tanesi Batı Nil Virusu (%0,85) yönünden, 17 tanesi ise Toscana virus (%14,5) yönünden pozitif bulundu (izelge 3.2; izelge 3.3). Nairovirus yönünden test edilen kuş örneklerinin hiç birisinde beklenen büyüklükte ürün elde edilemedi.

**Çizelge.3.1.** Çalışma kapsamında kullanılan kuş/organ dağılımı.

Hayvan Türü	Hayvan Sayısı	Test Edilen Materyaller							
		Akciğer	Karaciğer	Dalak	Böbrek	Tüy	Kan	Beyin	TOPLAM
Kartal	9	2	2	2	2	2	0	7	17
Şahin	10	10	10	10	10	10	0	2	52
Leylek	7	3	3	3	3	3	0	7	22
Pelikan	2	2	2	2	2	2	0	0	10
Flamingo	2	2	2	1	2	2	0	0	9
Kaya Kartalı	1	1	1	1	1	1	0	0	5
Karga	2	2	2	2	2	-	0	1	9
Balıkçıl	3	1	1	1	1	1	0	2	7
Su kuşu	1	0	1	0	0	1	1	0	3
Ördek	24	23	23	23	23	23	0	1	116
Kuşu	3	3	3	0	3	3	0	0	12
Keklik	15	14	14	4	9	14	0	1	56
Dalgıç kuşu	1	1	1	0	1	1	0	0	4
Martı	3	1	1	0	1	1	0	2	6
Baykuş	12	10	10	0	10	0	0	12	42
Atmaca	5	2	2	2	2	0	0	3	11
Bıldırcın	11	11	11	11	11	11	0	0	55
Kaz	3	3	3	3	3	3	0	0	15
Karatavuk	2	2	2	2	0	2	0	0	8
Güvercin	1	1	1	1	1	1	0	0	5
<b>TOPLAM</b>	<b>117</b>	<b>94</b>	<b>95</b>	<b>68</b>	<b>87</b>	<b>81</b>	<b>1</b>	<b>38</b>	<b>464</b>



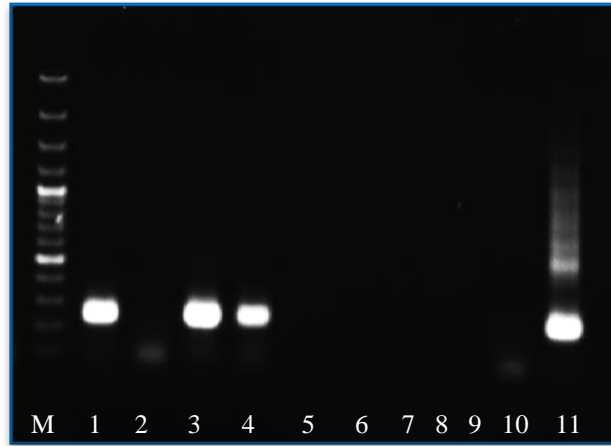
**Çizelge.3.2.** Çalışmada toplanan ve virolojik yönden pozitif olarak tespit edilen kuşların dağılımı.

HATAY			SAMSUN		
Kuş türü	Sayı	Pozitif tespit edilen kuş sayısı	Kuş türü	Sayı	Pozitif tespit edilen kuş sayısı
Kartal	9	1	Karga	1	0
Şahin	10	0	Balıkçıl	1	0
Leylek	7	1	Ördek	20	4
Pelikan	2	1	Kuşu	3	0
Flamingo	2	1	Keklik	14	5
Kaya Kartalı	1	0	Dalgıç kuşu	1	0
Karga	1	0	Martı	1	0
Balıkçıl	2	0	Bıldırcın	11	4
Su kuşu	1	0	Kaz	3	0
Ördek	4	0	Güvercin	1	1
Keklik	1	0			
Martı	2	0			
Baykuş	12	0			
Atmaca	5	0			
Karatavuk	2	0			
<b>TOPLAM</b>	<b>61</b>	<b>4</b>	<b>TOPLAM</b>	<b>56</b>	<b>14</b>

Kuşlardan alınan doku/organ örneklerinin tamamı, araştırmada tespit edilen virüsler, hangi kuş türünden izole edildiği ve lokalizasyonu Çizelge.3.2 ve Çizelge 3.3'de ve PCR'lardan elde edilen jel görüntüleri Şekil.3.1- Şekil.3.7'de sunuldu.

**Çizelge.3.3.** Çalışmada virolojik yönden pozitif olarak tespit edilen kuşların dağılımı.

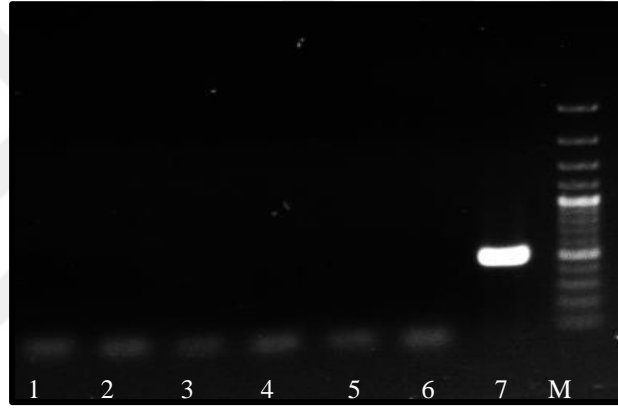
<b>Kuş türü</b>	<b>Virus</b>	<b>Bölge</b>	<b>Organlar</b>
Flamingo	Toscanavirus	Hatay	Böbrek
Leylek	Toscanavirus	Hatay	Beyin
Pelikan	Toscanavirus	Hatay	Beyin
Kartal	Batı Nil Virus	Hatay	Dalak, Kalp, Böbrek
Ördek	Toscanavirus	Samsun	Akciğer, Karaciğer
Ördek	Toscanavirus	Samsun	Akciğer, Karaciğer, Kalp, Böbrek
Güvercin	Toscanavirus	Samsun	Akciğer, Karaciğer, Kalp
Keklik	Toscanavirus	Samsun	Karaciğer, Kalp, Dalak
Bıldırcın	Toscanavirus	Samsun	Karaciğer, Kalp
Bıldırcın	Toscanavirus	Samsun	Kalp
Bıldırcın	Toscanavirus	Samsun	Karaciğer, Kalp
Keklik	Toscanavirus	Samsun	Akciğer
Keklik	Toscanavirus	Samsun	Karaciğer, Kalp
Keklik	Toscanavirus	Samsun	Akciğer, Karaciğer, Dalak
Keklik	Toscanavirus	Samsun	Akciğer, Karaciğer, Kalp
Bıldırcın	Toscanavirus	Samsun	Akciğer, Karaciğer, Kalp
Ördek	Toscanavirus	Samsun	Karaciğer
Ördek	Toscanavirus	Samsun	Akciğer



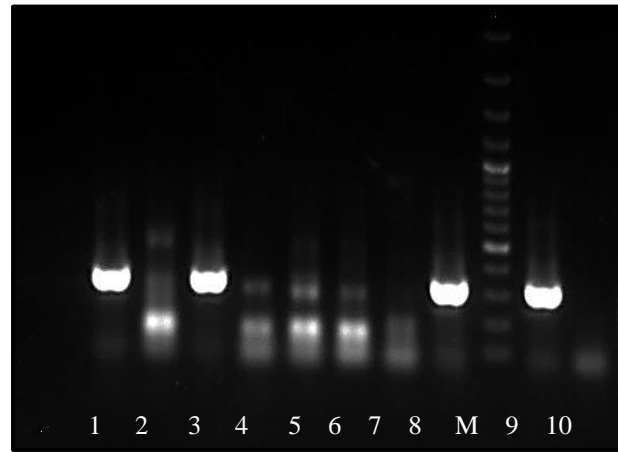
**Şekil.3.1.** Nplebo Primerleri ile yapılan PCR'a ait jel görüntüsü (M:Merdiven, 1-9 Kuş örnekleri, 10 Negatif kontrol, 11 Pozitif kontrol).



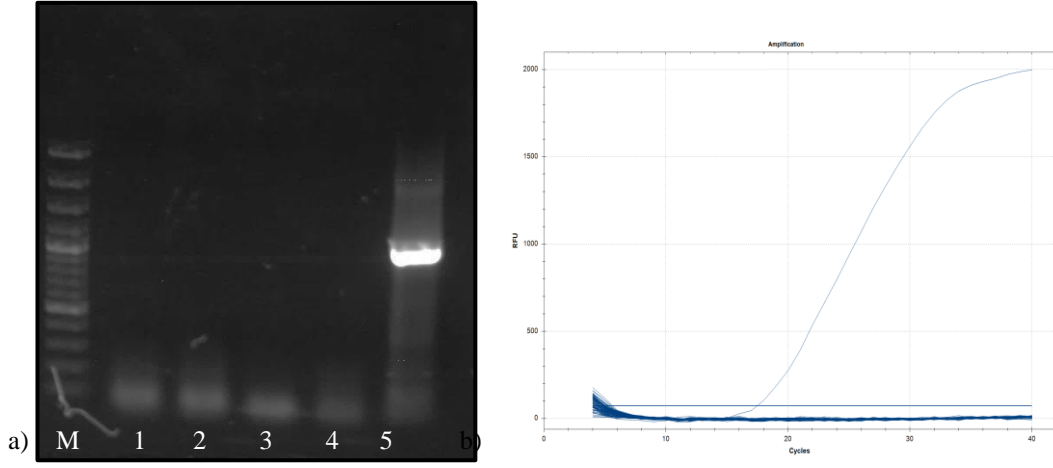
**Şekil.3.2.** HRTGL primerleri ile yapılan PCR'a ait jel görüntüsü (M:Merdiven, 1-6 Kuş örnekleri, 7 Negatif kontrol ,8 Pozitif kontrol)



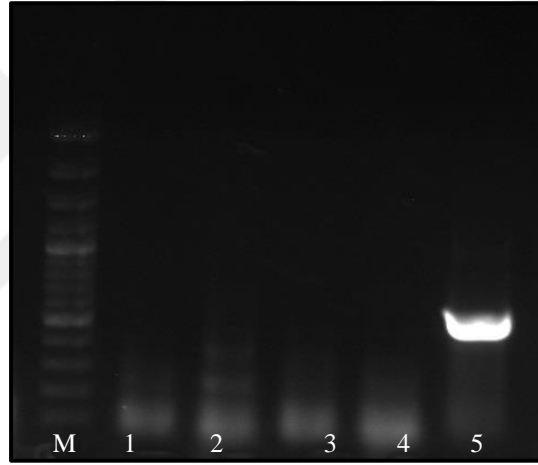
**Şekil.3.3.** Nairovirus primerleri ile yapılan PCR'a ait jel görüntüsü (M:Merdiven, 1-5 Kuş örnekleri, 6 Negatif kontrol ,7 Pozitif kontrol).



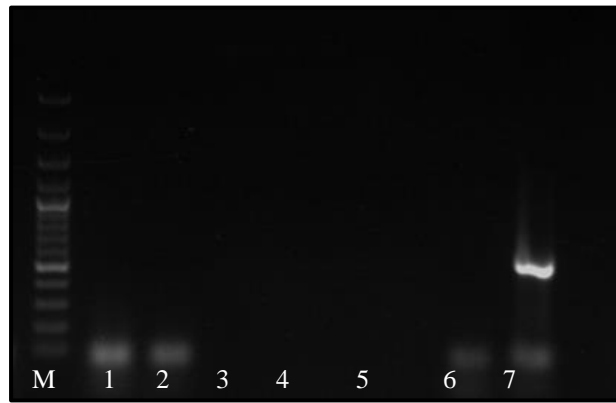
**Şekil.3.4.** SFNV primerleri ile yapılan PCR'a ait jel görüntüsü (M:Merdiven, 1-8 Kuş örnekleri, 9 Pozitif kontrol, 10 Negatif kontrol).



**Şekil.3.5.** a) Flavivirus primerleri ile yapılan PCR'a ait jel görüntüsü (M:Merdiven, 1-3 Kuş örnekleri, 4 Negatif kontrol, 5 Pozitif kontrol) b) Zikavirus için yapılan Real Time RT-PCR görüntüsü.



**Şekil.3.6.** PhIP2 primerleri ile yapılan PCR'a ait jel görüntüsü (M:Merdiven, 1-3 Kuş örnekleri, 4 Negatif kontrol, 5 Pozitif kontrol).



**Şekil.3.7.** TBPVL primerleri ile yapılan PCR'a ait jel görüntüsü (M:Merdiven, 1-5 Kuş örnekleri,6 Negatif kontrol, 7 Pozitif kontrol).

### **3.2.1. Hedef DNA'ların Flavivirus Yönünden Değerlendirilmesi**

Hatay ve Samsun illerinden toplanan toplam 117 kuştan 1 tanesi Flavivirus genusunda yer alan BNV yönünden pozitif bulundu. Samsun'dan toplanan 56 kuşun tamamı negatif iken, Hatay'dan toplanan 61 kuşun 1 tanesinde BNV RNA'sı tespit edildi. (Çizelge 3.2; Çizelge 3.3). Bu olguda BNV gRNA pozitifliği hayvanda alınan her üç dokuda da gözlemlendi.

Hatay'da pozitif bulunan kuş türü olan kartaldan elde edilen üç iç organ da BNV yönünden pozitif bulundu.

### **3.2.2. Hedef DNA'ların Nairovirus Yönünden Değerlendirilmesi**

Hatay ve Samsun illerinden toplanan toplam 117 kuşa yapılan analizler sonucunda Nairovirus spesifik bir bant tespit edilmedi ve örneklenen kuşların tamamı negatif olarak değerlendirildi.

### **3.2.3. Hedef DNA'ların Phlebovirus Yönünden Değerlendirilmesi**

Hatay ve Samsun illerinden toplanan toplam 117 kuştan 17'si Phlebovirus genusunda yer alan TOSV yönünden pozitif bulundu. Samsun'dan toplanan 56 kuşun 14'ünde (%25), Hatay'dan toplanan 61 kuşun 3 tanesinde (%4,9) TOSV RNA'sı tespit edildi (Çizelge 3.2; Çizelge 3.3).

TOSV yönünden pozitif tespit edilen kuşların ait örneklerin intikal ettiği zaman açısından yapılan değerlendirmede Hatay'da pozitif tespit edilen kuşların 2016 yılında (Eylül-Ekim) örneklendiği ve o dönemde Samsun'dan toplanan kuşlarda pozitiflik tespit edilmediği görüldü. Diğer taraftan 2017 yılında (Ekim-Şubat aylarında) toplanan örneklerdeki TOSV pozitifliği ise sadece Samsun'da örneklenen kuşlara ait idi.

**Çizelge.3.4.** Farklı primerler ile TOSV pozitif tespit edilen kuş/organ/primer dağılımı.

Toplanan Bölge	Kuş türü/ Kodu	NPhlebo	SFNV	PhIP2 -PhIM2
Samsun	Bıldırcın (Bil1/17/TR)	Karaciğer	Kalp	
	Bıldırcın (Bil3/17/TR)	Kalp		
	Bıldırcın (Bil8/17/TR)	Kalp	Karaciğer	
	Keklik (Ku1/17/TR)	Kalp, Karaciğer, Akciğer		
	Bıldırcın (Ku2/17/TR)	Akciğer	Akciğer, Kalp, Karaciğer	Kalp, Akciğer
	Ördek (Duc3/17/TR)	Karaciğer		
	Ördek (Duc4/17/TR)	Akciğer		
	Ördek (Duc5/17/TR)	Akciğer	Akciğer, Karaciğer	
	Ördek (Duc6/17/TR)	Akciğer	Kalp, Karaciğer, Böbrek, Akciğer	Böbrek, Akciğer, Karaciğer
	Güvercin (Pige7/17/TR)	Kalp	Kalp, Akciğer	Karaciğer
	Keklik (Kek1/17/TR)	Akciğer		
	Keklik (Kek2/17/TR)	Karaciğer, Kalp		
	Keklik (Kek3/17/TR)	Akciğer, Dalak, Karaciğer	Akciğer	
	Keklik (Kek4/17/TR)	Kalp, Dalak, Karaciğer	Kalp	Karaciğer
Hatay	Flamingo (flkd2)	Böbrek		
	Leylek (24stbr; 18stbr)	Beyin	Beyin	
	Pelikan (15pel; 1pelbr)	Beyin	Beyin	

Phlebovirus tespiti amacıyla virusun S segmenti ve L segmentini hedef alan primerler kullanıldı. Kullanılan primerler arasında SFNV (S segmenti) NPhlebo (L segmenti) ve PhIP2/PhIM2 (L segmenti) primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR'lar sonucunda beklenen büyüklüklerde ürün elde edildi. İllere göre farklı primerler ile TOSV pozitif tespit edilen olgular için kuş/organ/primer dağılımı Çizelge 3.4'de sunuldu.

### **3.3. Virus İzolasyon Çalışmaları**

#### **3.3.1. Flavivirus İzolasyon Sonuçları**

Hatay'da BNV pozitif tespit edilen kartal iç organlarından yapılan inokulasyonlar neticesinde herhangi bir virus üremesine ilgili olabilecek sitopatik etki tespit edilemedi.

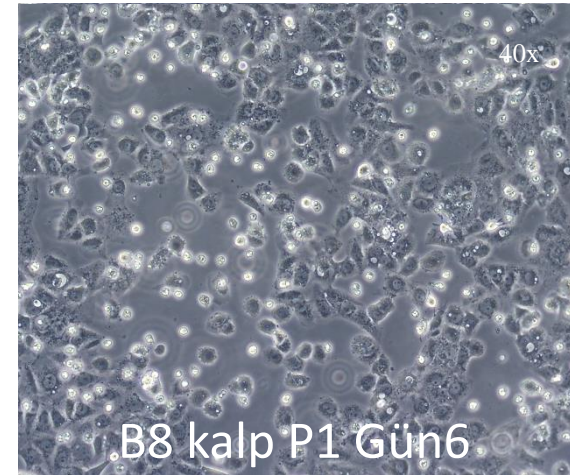
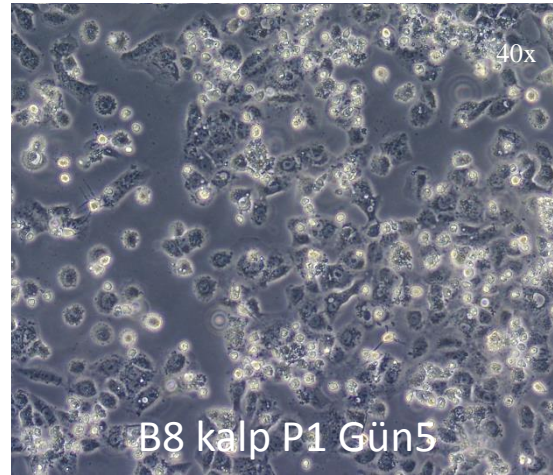
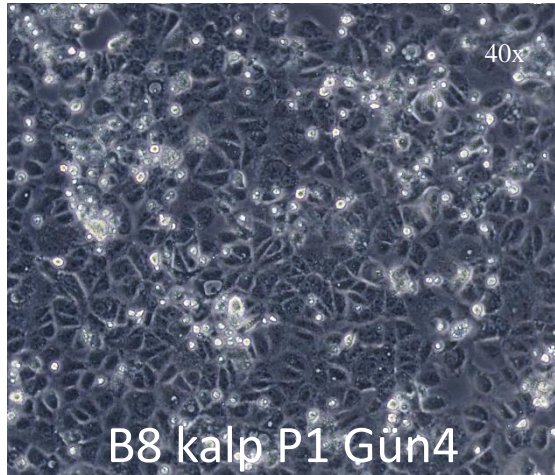
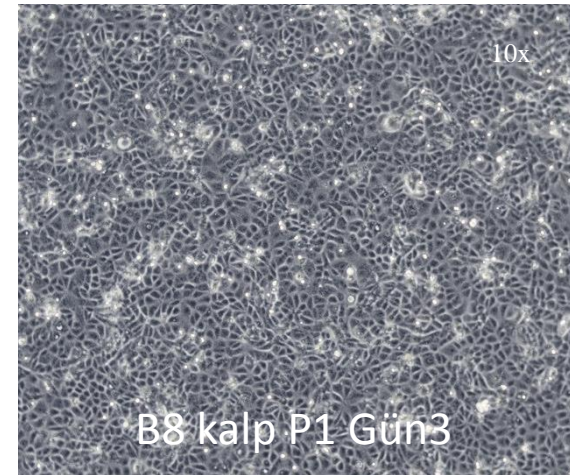
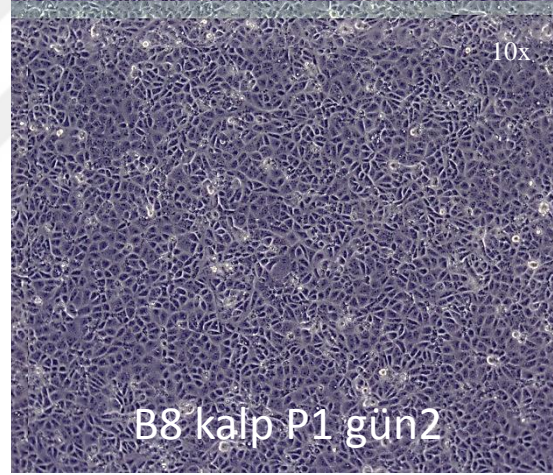
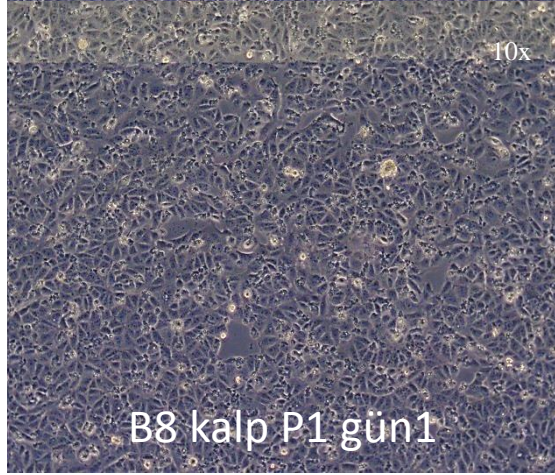
#### **3.3.2. Phlebovirus İzolasyon Sonuçları**

Hatay'da TOSV pozitif tespit edilen Flamingo ve Pelikana ait organlar ve Samsun'da TOSV pozitif tespit edilen tüm kuşlara (n=14) ait toplam 34 adet organ kullanılarak Vero E6 hücre kültürüne adsorpsiyonlu yöntem ile ekildi. Hücre kültürleri her gün CPE yönünden kontrol edildi ve bu kontrollere ilişkin notlar Çizelge 3.5'de verildi. Ayrıca gözlenen CPE'lere yönelik çekilen fotoğraflar da Şekil 3.8'de verildi.

Hücre kültürüne ekim yapılan tüm organların 1. pasajından sonra 2. pasajları da gerçekleştirildi.

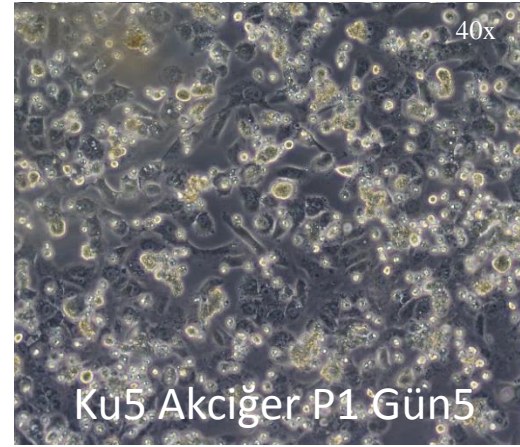
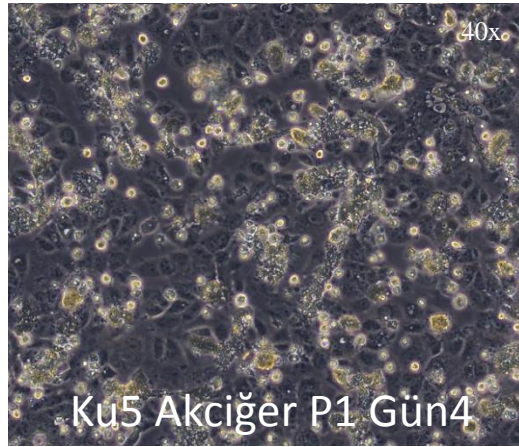
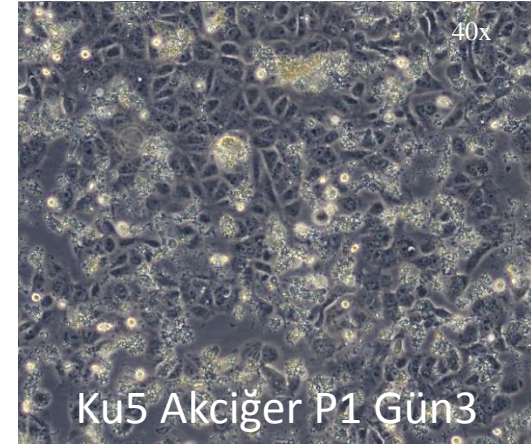
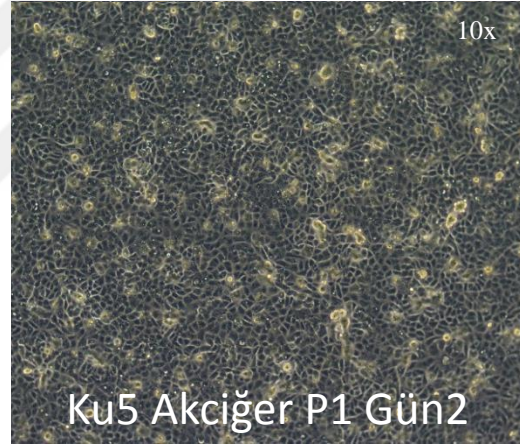
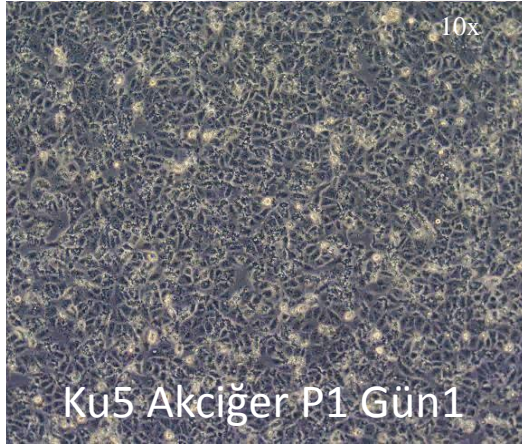
Her pasaj aşamasında örneklere Phlebovirus için PCR yapıldı. Sadece 3 kuşa ait organlarda (Ku1/17/TR- Keklik, Pige7/17/TR- Güvercin; Duc5/17/TR- Ördek) beklenen büyüklükte bant tespit edildi ve pozitif olarak değerlendirildi.

Bu 3 kuşa ait (Ku1/17/TR, Duc5/17/TR, Pige7/17/TR) organların toplam 5 kez kör pasajları yapıldı. Bu pasajlamalardan sonra tekrar Phlebovirus için PCR yapıldı ve beklenen büyüklükte bantlar tespit edildi. Bu pasajlardan elde edilen PCR ürünleri, doğrulamak amacıyla da gen sekanslaması yapıldı. Gelen veriler işlendiğinde TOSV gen dizisi ile uyumlu olduğu tespit edildi.

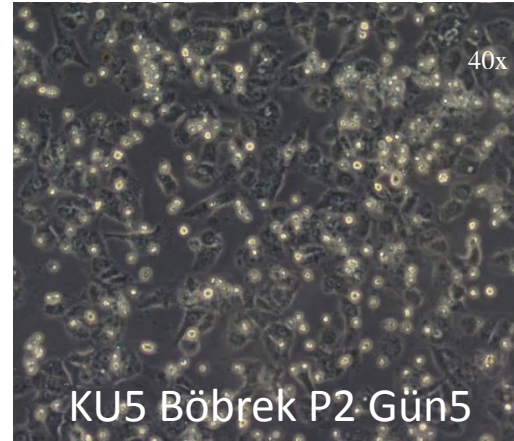
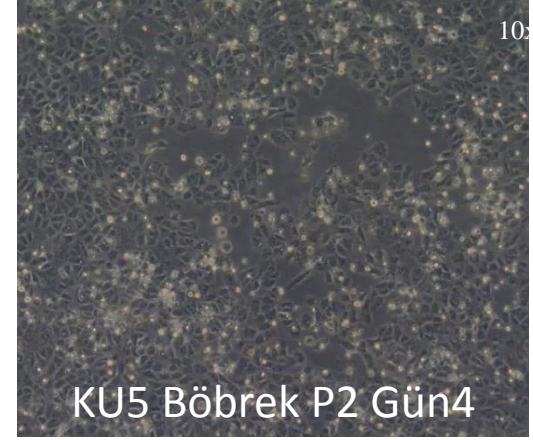
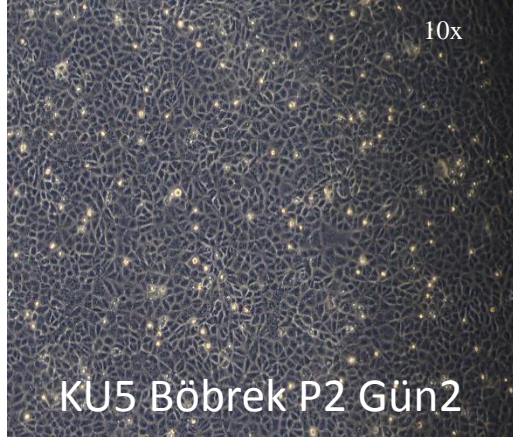


Şekil.3.8. Organ inokulasyonlarına ait CPE görüntüleri

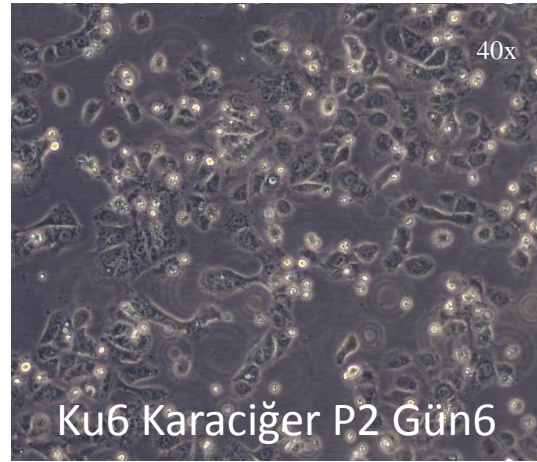
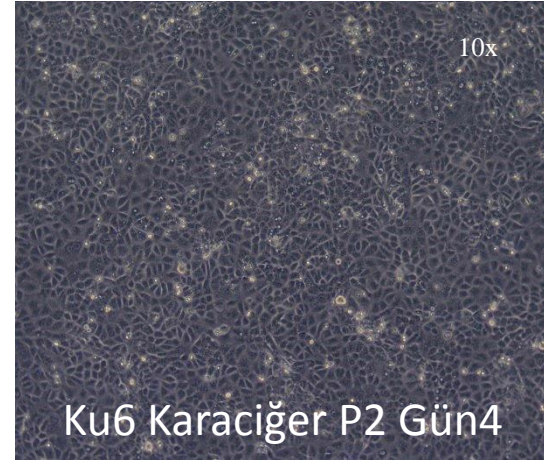
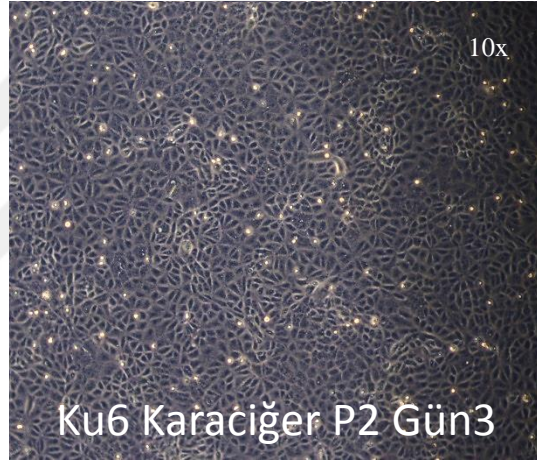
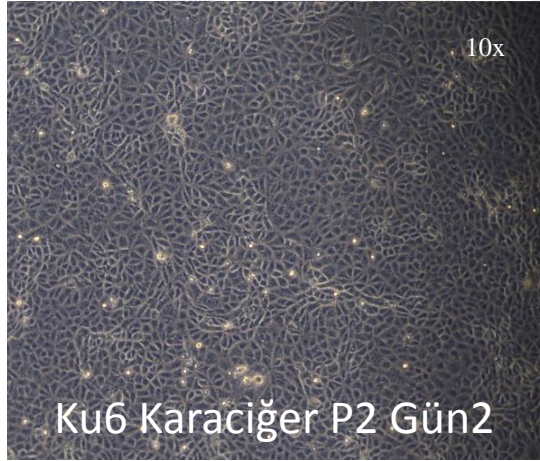




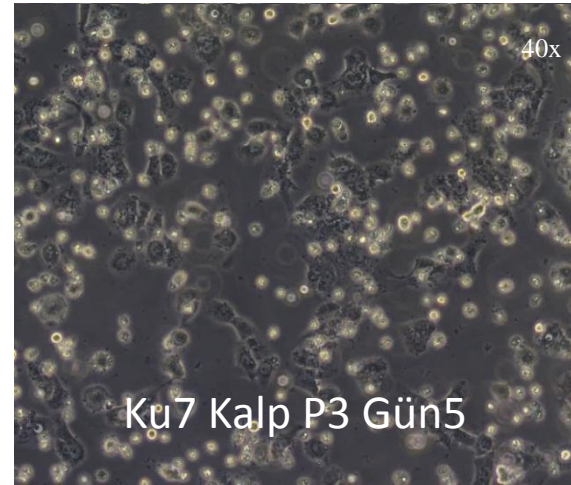
Şekil.3.8.Devamı



Şekil.3.8.Devamı



Şekil.3.8.Devamı



Şekil.3.8.Devamı

**Çizelge.3.5.** Hücre kültürü CPE takip Listesi. (\* ile işaretli örnekler PCR ile TOSV pozitif tespit edilmiştir).

		1.Pasaj					2.Pasaj					3.Pasaj				
		1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün
bildircin (b1)	karaciğer	-	-	+	++	+++	-	-	+	++	+++					
	kalp	-	+	++	++	+++	-	-	+	++	+++					
bildircin (b3)	kalp	-	-	+	++	+++	-	-	+	++	+++					
bildircin (b8)	kalp	-	+	++	++	+++ (6.gün)	-	+	++	++	+++					
	karaciğer	-	-	++	+++		-	-	++	+++						
keklik (ku1)*	kalp	-	+	++	+++		-	+	++	+++		-	+	++	++	+++
	karaciğer	-	+	++	+++		-	+	++	+++		-	+	++	++	+++
	akciğer	-	+	++	+++		-	+	++	+++		-	+	++	++	+++
bildircin (ku2)	kalp	-	+	++	++	+++	-	+	++	++	+++					
	karaciğer	-	-	-	+	+++	-	-	-	+	+++					
	akciğer	-	-	+	++	+++	-	-	+	++	+++					
ördek (ku3)	karaciğer	-	-	+	++	+++	-	-	+	++	+++					
ördek (ku4)	akciğer	-	-	+	++	+++	-	-	+	++	+++					
ördek (ku5)*	karaciğer	+	++	++	+++		+	++	+++			-	++	++	+++	
	böbrek	-	+	++	++	+++	-	++	++	+++	+++	-	++	++	+++	+++
	akciğer	-	+	++	++	+++	-	+	++	+++	+++	-	+	++	+++	+++
ördek (ku6)	kalp	-	-	+	+	++	-	-	+	+	++					
	karaciğer	-	-	-	+	+++	-	-	-	+	+++ (6.gün)					
	akciğer	-	-	+	++	+++	-	-	+	++	+++					
	böbrek	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
güvercin (ku7)*	kalp	-	+	++	+++		-	+	++	+++		-	+	++	+++	+++
	karaciğer	-	+	++	+++		-	+	++	+++		-	+	++	+++	+++
	akciğer	-	+	+	++	+++	-	+	+	++	+++	-	+	++	+++	+++
keklik (bs1)	akciğer	-	+	++	+++		-	+	++	+++						
keklik (bs2)	kalp	-	+	++	+++		-	+	++	+++						
	karaciğer	+	++	++	+++		+	++	++	+++						
keklik (bs3)	karaciğer	-	+	+	++	+++	-	+	+	++	+++					
	akciğer	+	+	++	+++		+	+	++	+++						
	dalak	-	-	+	++	+++	-	-	+	++	+++					
keklik (bs4)	kalp	-	+	++	+++		-	+	++	+++						
	karaciğer	-	-	+	++	+++	-	-	+	++	+++					
Flamingo	dalak	-	+	++	+++		-	+	++	+++						
	akciğer	-	+	++	+++		-	+	++	+++						
Pelikan	Böbrek	-	+	++	+++		-	+	++	+++						
	akciğer	-	+	++	+++		-	+	++	+++						

### 3.4. Nükleotid Dizini ve Filogenetik Analizler:

Genbanktan alınan accession numaraları Çizelge 3.6’de sunuldu.

**Çizelge.3.6.** Araştırma kapsamında tespit ve/veya izole edilen virusların filogenetik analizlerinde kullanılan gen dizilerine ilgili olarak Genbank’tan alınan kayıt numaraları.

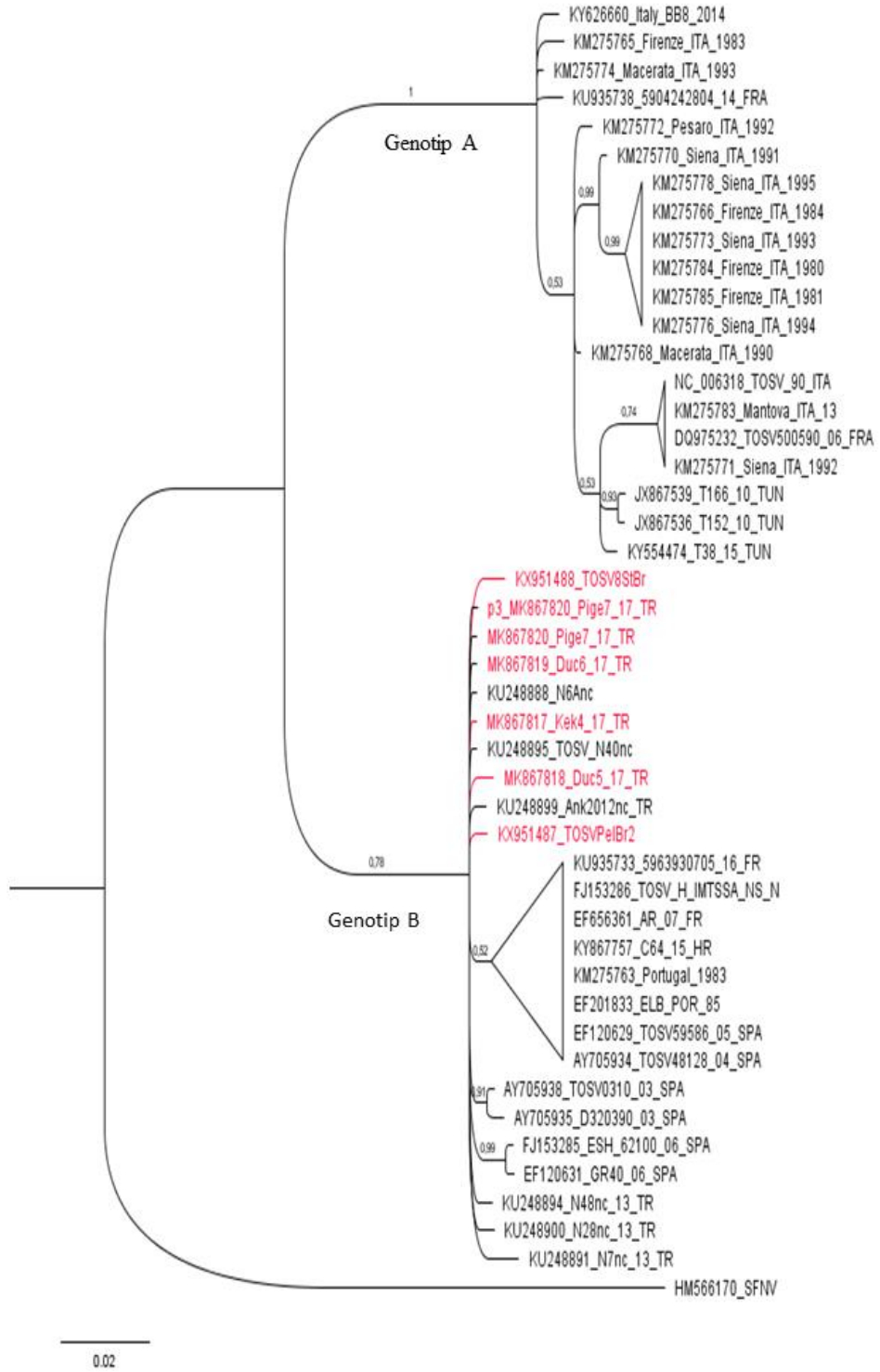
Örnek adı	Örnek kodu	Accession no
ku7kalp	Pige7/17/TR	MK867816
ku6ac	Duc6/17/TR	MK867812
ku5ac	Duc5/17/TR	MK867814
ku4ac	Duc4/17/TR	MK867813
ku3kc	Duc3/17/TR	MK867815
ku2ac	Ku2/17/TR	MK867811
ku1ac	Ku1/17/TR	MK867810
bs17kc2	Kek2/17/TR	MK867807
bs17kc3	Kek3/17/TR	MK867808
bs17dlk4	Kek4/17/TR	MK867806
bs17ac1	Kek1/17/TR	MK867809
b8kalp	Bil8/17/TR	MK867805
b3 kalp	Bil3/17/TR	MK867804
b1kc	Bil1/17/TR	MK867803
ku7ac	Pige7/17/TR	MK867820
ku5kc	Duc5/17/TR	MK867818
ku6kalp	Duc6/17/TR	MK867819
bs17kalp4	Kek4/17/TR	MK867817
Flamingo	FlKd2	KX951486
Pelikan	5PelBr	KX951485
Leylek	8StBr	KX951488
Pelikan	PelBr2	KX951487
Kartal-Dalak	WNV isolate 76	KY711338
Kartal-Kalp	WNV isolate 75	KY652382
Kartal-Böbrek	WNV isolate 77	KY711339

### **3.4.1. Phlebovirus Pozitif Tespit Edilen Dizinlerin Değerlendirilmesi**

#### **3.4.1.1. Phlebovirus S segmenti yönünden sonuçların değerlendirilmesi**

Bu çalışmada, SFNV F/R primerleri kullanılarak yapılan PCR tekniği ile TOSV pozitif olarak değerlendirilen 10 kuş örneğinin altısının TOSV S segmenti N proteini gen bölgesi yönünden dizin analizi gerçekleştirildi. S segmenti gen bölgesinin kısmi dizinin filogenetik analizi sonucunda örneklerin birlikte tek bir dalda yer aldıkları ve B genotipinde oldukları gözlemlendi (Şekil 3.9). Filogenetik ağaçta B genotipinde yer alan tüm örneklerin daha önce ülkemizde bildirilen N40nc ve N28nc köpek örnekleri ile İspanya (GR40, 10310) ve Portekiz’de bildirilen (ELB) tatarcık ve insan örneklerine yakın olduğu tespit edildi.

Dizin analizi yapılan yerel suşların kendi aralarında ve genotip B de yer alan diğer suşlar ile olan nükleotit benzerlik ve farklılık oranları Şekil 3.3’de sunuldu. Elde edilen suşların S segmenti N proteini gen bölgesinin kısmi dizinleri bakımından kendi aralarındaki nükleotit benzerlik oranı %88,61-99,67, genotip B de yer alan tüm suşlar ile olan nükleotit benzerlik oranı ise %76,58-100 olarak belirlendi (Şekil 3.10). Elde edilen S segmenti N proteini gen bölgesinin aminoasit bazında kendi aralarındaki benzerlikleri %88,68-100 olarak bulunurken; genotip B de yer alan tüm suşlar ile olan aminoasit benzerlik oranı ise %77,36-100 olarak tespit edildi (Şekil 3.11).



Şekil.3.9. TOSV S segmentine ait filogenetik ağaç.







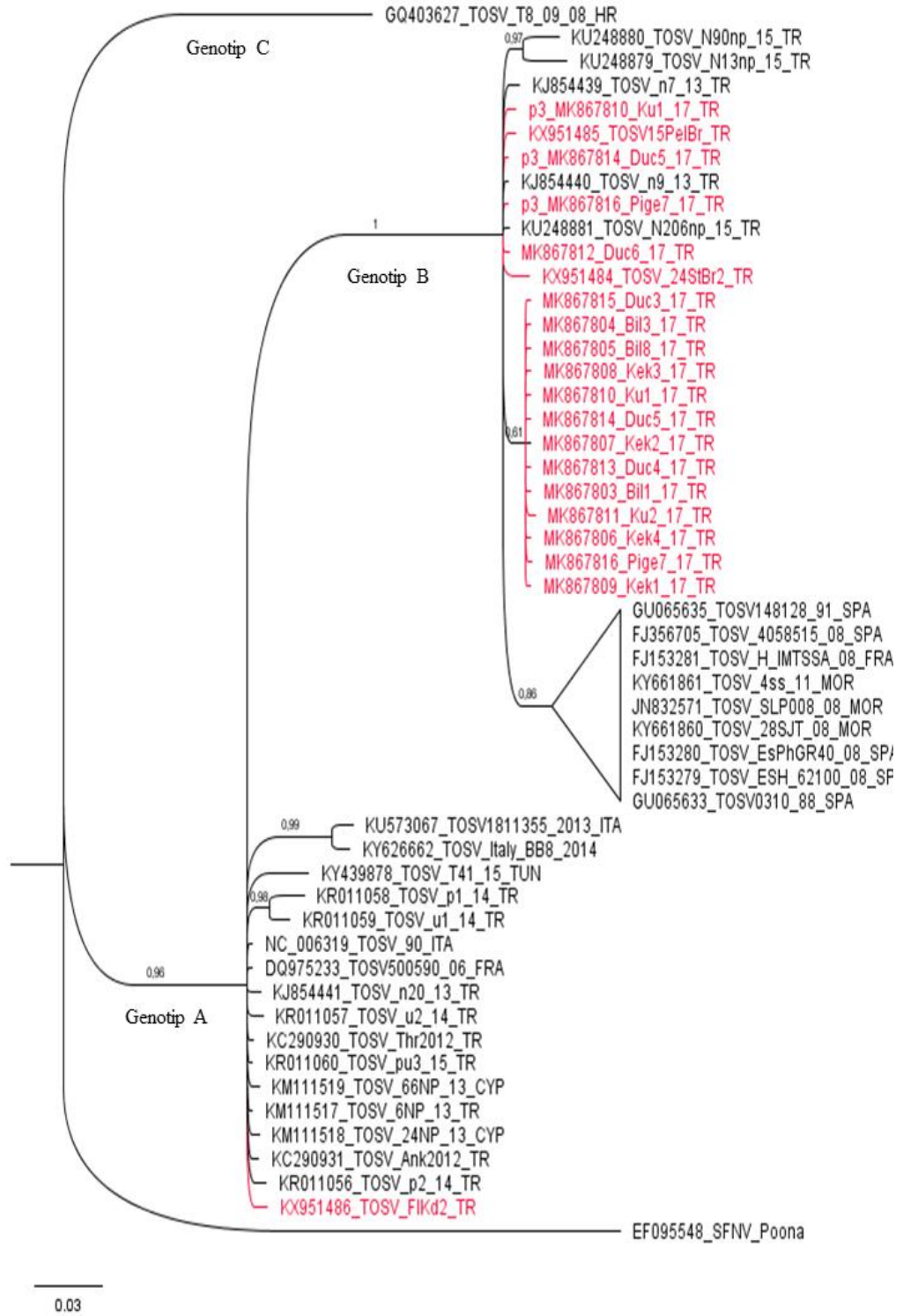
### 3.4.1.2. Phlebovirus L segmenti yönünden sonuçların değerlendirilmesi

Bu çalışmada kullanılan NphleboF/R primerleri ile yapılan PCR tekniği ile TOSV pozitif olarak değerlendirilen 17 kuş örneğinin tamamının ve 3 kuşa [(Keklik (Ku1/17/TR), Güvercin (Pige7/17/TR) ve Ördek (Duc5/17/TR)] ait organların hücre kültürü pasajlarının TOSV L segmenti RdRp gen bölgesi yönünden dizin analizi gerçekleştirildi. RdRp gen bölgesinin kısmi dizininin filogenetik analizi sonucunda, örneklerin iki ayrı ana dalda yer aldıkları, bir örneğin (Flamingo) A genotipinde; 19 örneğin ise B genotipinde olduğu gözlemlendi (Şekil 3.12).

Elde edilen filogenetik ağaçta, B genotipini oluşturan dal incelendiğinde, Türkiye’den elde edilen sekans verilerinin kendi içlerinde bir grup oluşturduğu ve İspanya, Fas ve Fransa suşlarının ayrı bir grup oluşturduğu görüldü. Kuşlardan elde edilen genetik veriler ile yapılan bu ağaçta, Türkiye’deki genotip B suşlarının diğer ülkelerdeki suşlardan ayrılmış olduğu dikkat çekti.

Çalışmada tespit edilen genotip B sekansları, en çok Türkiye’de köpeklerden elde edilen N206np, n9 ve N90np benzerlik gösterdi. A genotipinde yer alan flamingodan tespit edilen suş ise Kıbrıs’ta tatarcıkta tespit edilen 6NP suşu ile yakın bulundu.

Dizin analizi yapılan yerel suşların kendi aralarında ve Genotip A ile genotip B de yer alan diğer suşlar ile olan nükleotit benzerlik ve farklılık oranları Şekil 3.13’de sunuldu. Elde edilen suşların RdRp gen bölgesinin kısmi dizinleri bakımından kendi aralarındaki nükleotit benzerlik oranı %69,11-100; aminoasit benzerlikleri %80,49-100 olarak saptandı. Genotip A da yer alan tüm suşlar arasındaki nükleotit benzerlik oranı % 88,62-100; aminoasit benzerlik oranı %90,24-100 olarak saptanırken, genotip B de yer alan tüm suşlar arasındaki nükleotit benzerlik oranı ise %77,14-100; aminoasit benzerlik oranı ise %76,83-100 olarak belirlendi (Şekil 3.14).



Şekil.3.12. TOSV L segmentine ait filogenetik ağaç.

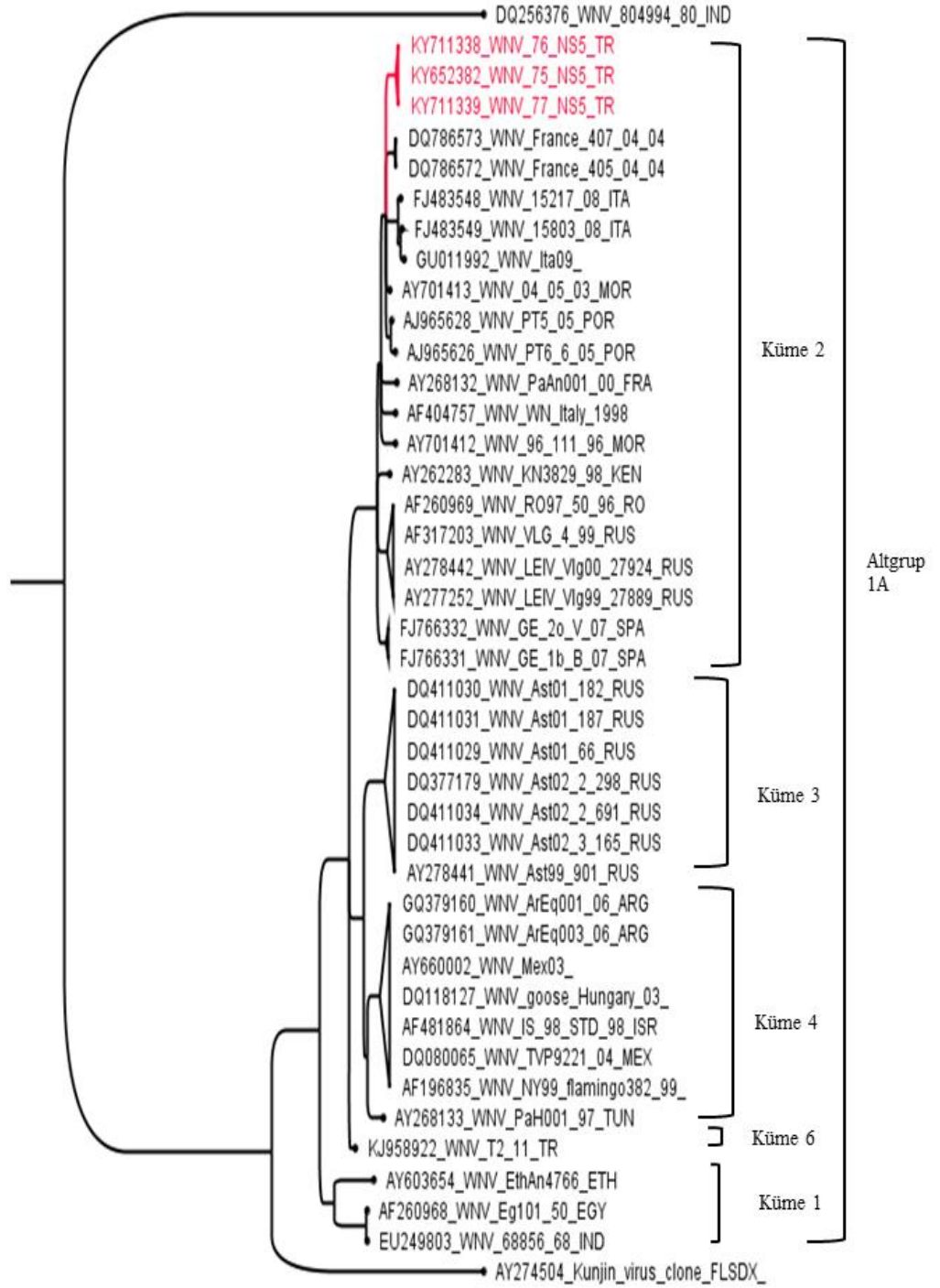




### **3.4.2. Flavivirus yönünden sonuçların değerlendirilmesi**

#### **3.4.2.1. BNV NS5 gen bölgesi yönünden sonuçların değerlendirilmesi**

Bu çalışmada kullanılan NS5 F/R primerleri kullanılarak yapılan PCR tekniği ile BNV pozitif olarak değerlendirilen 1 kuşa ait 3 organ örneğinin NS5 gen bölgesi yönünden dizin analizi gerçekleştirildi. NS5 gen bölgesinin kısmi dizinin filogenetik analizi sonucunda kuş örneklerinin BNV Altgrup 1a Küme 2’de yer aldığı gözlemlendi (Şekil 3.15). Filogenetik ağaçta ise Akdeniz bölgesindeki ülkeler (Fransa, İtalya, Portekiz, Fas) ile aynı dalda yer aldığı saptandı. Çalışmada tespit edilen BNV 1a sekansları, en çok sırasıyla Fransa’da saksığan beyninden elde edilen 407/04, 405/04 suşları ile İtalya’da insandan elde edilen Ita09 ve saksığandan elde edilen 15803 ile 15217 suşları, Portekiz’de sivrisineklerden elde edilen PT5.05 ve at beyninden elde edilen 04.05 suşu ile yakın bulundu.(Şekil 3.16; Şekil 3.17).



0.04

Şekil.3.15. BNV NS5 gen bölgesine ait filogenetik ağaç.







#### 4. TARTIŞMA

Ülkelerin coğrafyalarına ait olmayan veya dünyada ilk kez varlıkları tanımlanan ya da uzun süre sonra tekrar ortaya çıkabilen hastalık etkenlerinin yayılımını öngörebilmek için araştırmaların yapılması gerekmektedir. Bu etkenlerin başında da vektör kaynaklı hastalıklar gelmektedir. Enfekte vektörlerin yeni coğrafyalara taşınması ile bu hastalıkların yayılımı artabilmektedir. Vektörlerin taşınmasında ise kuşların oynadığı önemli roller çok sayıda araştırmada vurgulanmaktadır (Clark ve ark., 2006; Fiona ve ark., 2011; Hubálek ve Halouzka, 1999; Komar ve ark., 2003; Lelli ve ark., 2012; McKenzie ve Goulet, 2010; Reisen, 2017, s:27; Steele ve ark., 2000 ve Zehender ve ark., 2013). Bazı ülkelerde halk sağlığını etkileyen hastalıkların takip edilmesi için ölü kuş gözlem sürveyans ağları oluşturulmuştur (Angelini ve ark., 2010; Becker ve ark., 2012; Lecollinet ve ark., 2016; Lelli ve ark., 2012; Nasci ve ark., 2002 ve Ziegler ve ark., 2015). BNV, kuşlarda uzun süren viremiye neden olduğundan, virus yayılımında kuşların önemli bir rolü bulunmaktadır. Amerika'da 1999 yılında ortaya çıkan BNV salgınından sonra ilk başlarda özellikle ölü kargalar takibe alınmıştır (Nasci ve ark., 2002). Günümüzde ise BNV açısından kuşların sürekli takipleri halk yardımı ile internet ortamından ([www.depgis.state.pa.us](http://www.depgis.state.pa.us)) yapılmaktadır. KKKAV yönünden ise kuşların rolü tam olarak bilinmemekle birlikte taşıdıkları enfekte keneler ile virusu da yaydıkları bilinmektedir (Estrada-Pena ve ark., 2012; Lindeborg ve ark., 2012; Palomar ve ark., 2013 ve Schmaljohann ve ark., 2007). Bu tez çalışması kapsamında Hatay'dan elde edilen verilerin bir kısmının kullanılarak yapıldığı yayın (Hacıoğlu ve ark., 2017) dışında, TOSV ile ilgili kuşlarda pozitif tespit edilen başka bir araştırma bulunmamaktadır. TOSV'ün, Akdeniz bölgesindeki ülkelerde halk sağlığı açısından önemi yüksek olduğu için, bu virusların rezervuarının bulunması veya yayılımında rol oynayan canlıların tespiti çok önemlidir. Bu tez çalışmasında ise özellikle bazı Flaviviruslar, Phleboviruslar ve Nairoviruslar üzerinde durulmaktadır.

Göçmen kuşların göç sırasında düzenli olarak gösterdikleri periyodik hareketler, onları potansiyel bir patojen taşıyıcısına çevirmektedir. Mevsimsel göçler

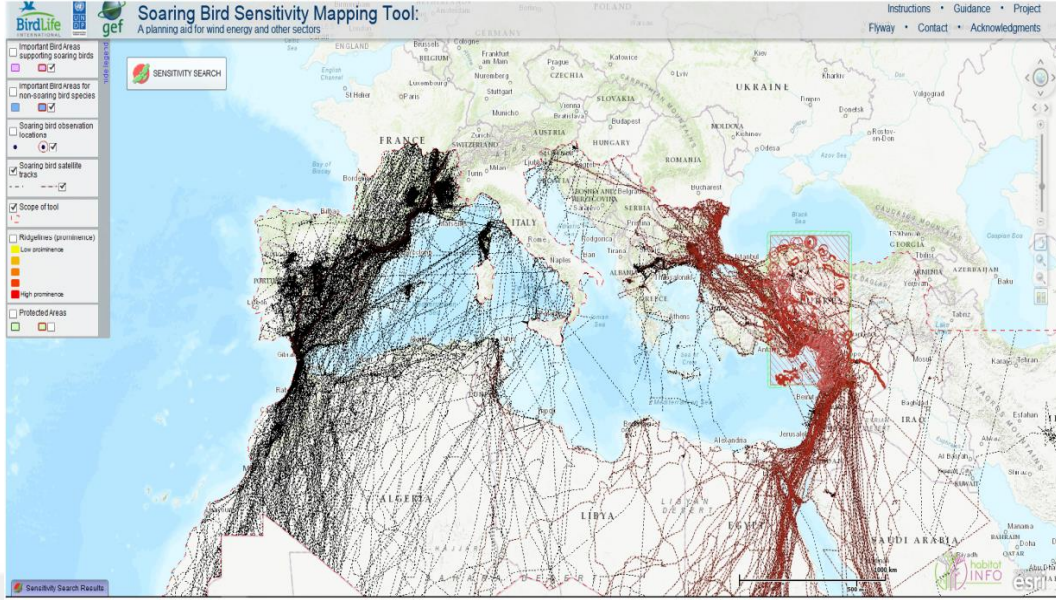
sırasında milyonlarca kuş hareket etmektedir. Özellikle, ana göç koridorları üzerinde bulunan ülkeler kuşların taşıdıkları patojenler yönünden risk altındadır. Afrika'dan göç eden kuşlar Doğu ve Batı olmak üzere iki temel göç rotasını takip etmektedir. (Şekil 4.1) (Ciccozzi ve ark., 2013). Doğu rotasını izleyen kuşlar İsrail üzerinden ülkemize ve sonra Rusya'ya geçmektedir. Göç hareketleri sırasında kuşlar, konakladıkları veya durakladıkları bölgedeki yerel kuşlar ile de etkileşim içindedir ve bazı göçmen kuşlar konaklama bölgelerinde (ülke içinde) farklı yönde hareketler/rotalar izleyebilmektedir.

Bu çalışmada Hatay ve Samsun illerinden toplanan toplam 117 kuşa ait doku/organ örneklerinden biri (kartal) Batı Nil Virüsü (%0,85) yönünden pozitif tespit edilmiştir. Ülkemizde daha önce yabani/göçmen kuşlarda BNV tespiti ile ilgili bir bildirim bulunmamaktadır. Ancak, Akdeniz bölgesindeki ülkelerde BNV ile ilgili yapılan araştırmalarda Avrupa'ya virusun Afrika'dan göçmen kuşlar aracılığı ile geldiği yönünde teoriler üretilmiştir (Fiona ve ark., 2011). Oluşturulan filogenetik ağaçta da, çalışmada bulunan BNV suşunun Akdeniz ülkelerindeki suşlara yakın olduğu gözlenmiştir.

Kuşlardaki uzun viremi süresinden dolayı Amerika'ya da virusun göçmen kuşlar aracılığı ile gelmiş olabileceği ile hipotezler bulunmaktadır (Rappole ve Hubalek, 2003). Macaristan, Yunanistan, Avusturya, İtalya, Almanya, Polonya, Dominik Cumhuriyeti, Venezüella ve Amerika'da yapılan çalışmalarda, bu teorileri destekleyecek şekilde, yabani kuşlarda BNV tespiti yapılmıştır ve bu nedenle kuşların takip edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Bakonyi ve ark., 2005 ve Bakonyi ve ark., 2006; Becker ve ark., 2012; Birds ve ark., 2003; Bosch ve ark., 2007; Chaskopoulou ve ark., 2011; Juricova ve ark., 1998; Lelli ve ark., 2012; Llopis ve ark., 2015; Nasci ve ark., 2002; Niczyporuk ve ark., 2011; OIE, 2018; Ruiz ve ark., 2010; Tamba ve ark., 2011; Valiakos ve ark., 2011; Wheeler ve ark., 2012; Wodak ve ark., 2011 ve Ziegler ve ark., 2015). Bu tez çalışmasında da daha önceki çalışmaları destekler nitelikte ülkemizdeki yabani kuşlarda BNV sirkülasyonunun varlığı gösterilmiş ve bu tip konakların virus sürveyansı için önemli araçlar olabileceği düşünülmüştür.

Ülkemizde daha önce yapılan çalışmalarda BNV Genetik Hat 1 alttip 1a'nın sivrisineklerde ve atlarda tespitinin yanı sıra bir atta da Genetik Hat 2 tespiti bulunmaktadır (Ergünay ve ark., 2013; Ergünay ve ark., 2015; Ergünay ve ark., 2017; Monaco ve ark., 2016 ve Özkul ve ark., 2013). Bu çalışma kapsamında tespit edilen BNV ülkemizde daha önce atlardan tespit edilen küme 6'dan farklı olarak Genetik Hat 1 Alttip 1a Küme 2'de sınıflandırılmıştır. Küme 2 ve 6 Afrika kökenli viruslardan oluşmaktadır ve son 20 yıldır Akdeniz bölgesindeki ülkelerde salgınlara neden olmuştur (May ve ark.,2011). Bu sonuca göre de ülkemizde Genetik Hat 1 Alttip 1a'da bulunan 2 farklı küme BNV'nin mevcut olduğu görülmüştür. Macaristan'da, Avusturya ve Yunanistan'da yabani kuşlarda BNV genetik hat 2 tespit edilmiş ve bu ülkelerde yaban hayatında genetik hat 2'nin sirküle olduğu belirtilmiştir (Bakonyi ve ark., 2006; Erdelyi ve ark., 2007; Valiakos ve ark., 2011 ve Wodak ve ark., 2011). Fakat ülkemizde Genetik hat 2 sadece Bursa'daki bir at harasında bildirilmiştir (Monaco ve ark., 2016). Kuş göç yollarına bakıldığında (Şekil 4.1) Bursa ile Avrupa'nın rotaları bağlantılı olduğundan kuş kaynaklı bir bulaşmanın mümkün olabileceği ihtimali bulunmaktadır. Bu bağlamda, ülkemizde yaban kuşlarından elde edilen ilk BNV tespiti verisi olması sebebiyle özgün bir çalışma konumundadır. Ülkemizin güney bölgelerinde de Genetik Hat 1 ile birlikte Genetik Hat 2'nin sirküle olup olmadığı konusunda yorum yapabilmek için daha geniş çaplı örneklemeler yapılmalıdır.

Avrupa'da yapılan çalışmalarda kuşlarda BNV'nin yanında USUV yönünden de tespitler bulunmaktadır (Autorino ve ark., 2002; Llopis ve ark., 2015 ve Tamba ve ark., 2011). Ülkemizde USUV sirkülasyonu ile ilgili herhangi bir bildirim bulunmamaktadır. Bu çalışmada da USUV tespiti gerçekleşmemiştir.



Şekil.4.1. 2017 yılında takip cihazı takılmış kuşların hareketleri (Birdlife, 2019).

Göçmen kuşların Afrika-Avrupa kıtaları arasında enfekte keneleri uzun mesafeler taşıyıp KKKAV yayılımını genişletebildikleri ve hastalık bulaştırmada önemli rol oynadıkları birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir (Estrada-Pena ve ark., 2012; Lindeborg ve ark., 2012; Palomar ve ark., 2013 ve Schmaljohann ve ark., 2007). Ancak, devekuşları dışındaki kuşlarda sınırlı sayıda araştırma bulunması nedeniyle, kuşların rolü tam olarak kanıtlanamamıştır (Hoogstraal, 1979). Afrika-Avrupa arasında KKKAV'nun göçmen kuşların taşıdığı keneler ile bulaştığı, hem genetik analizler ile hem de bu bölgelerdeki göçmen kuşların üzerindeki kenelerin gelişim aşamalarından tespit edilmiştir. Türkiye'de de Karadeniz bölgesinde göçmen kuş üzerindeki bir kenede KKKAV'ü tespit edildiği önceden belirtilmiştir (Leblecioğlu ve ark., 2014). Bu tez çalışması kapsamında kuşlarda Nairovirus tespit edilememiştir. Kuşların Nairovirusların bulaşması rolünde de değinildiği üzere, KKKAV'nun yabani kuşlarda viremi süresi konusunda net bir bildirim olmamakla birlikte sistemik bir enfeksiyon durumu da bilinmemektedir. Yukarıda da belirtildiği gibi kuşların taşıdığı kenelerde KKKAV'ü tespit edilmiştir (Leblecioğlu ve ark., 2014; Estrada-Pena ve ark., 2012). Bu çalışmada da KKKAV pozitifliği tespit edilememesinin muhtemel nedenleri arasında bahsedilen bu durumların olabileceği göz önüne alınmıştır.

Phleboviruslar, özellikle Akdeniz kıyısı ve çevresindeki ülkelerdeki insanlar için önemli bir hastalık etkenidir. İnsanlarda çoğunlukla grip benzeri semptomlar, arthritis ve sinirsel semptomlar (ensefalitis, meningitis vb.) ile kendini göstermektedir. Ülkemizde “Tatarcık Humması” olarak da bilinen hastalığa neden olmakla birlikte birçok bölgeden bu virusların neden olduğu hastalıklar ile ilgili bildirimler bulunmaktadır ve Ankara’da da “Mamak Ateşi” isimli bir salgına da neden olmuştur (Çarhan ve ark., 2010; Ergünay ve ark., 2011; Ergünay ve ark., 2012a; Ergünay ve ark., 2012b ve Tesh ve ark., 1976). Yapılan çalışmalar incelendiğinde, çoğunlukla tatarcıklarda virus tespiti gerçekleştirilmiştir. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda araştırmacılar evcil hayvanlarda da (kedi, köpek, keçi) antikor tespit ettiklerini bildirmişler ve köpeklerden de virus tespiti gerçekleştirmişlerdir (Alwassouf ve ark., 2016a; Charrel ve ark., 2005; Dahmani ve ark., 2016; Dinçer ve ark., 2015 ve Dinçer ve ark., 2016, Hemmersbach-Miller ve ark., 2004; Navarro-Marí ve ark., 2011; Peyrefitte ve ark., 2005 ve Thirion ve ark., 2011). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda kuşlarda TOSV tespit edilmediğinden, kuşların bu virus sirkülasyonunda rol oynamadığı düşünülmekteydi (Charrel ve ark., 2005 ve Charrel ve ark., 2007).

Bu çalışmada, toplamda 117 kuş örneğinin 17 tanesi TOSV pozitif bulunmuştur. Bunların 3 tanesi Hatay ve 14 tanesi ise Samsun bölgelerinden toplanan kuşlara aittir. Bulunan bu sonuçlar ile dünyada ilk kez TOSV kuşlarda tespit edilmiş ve başarılı bir şekilde hücre kültürlerinde izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Sadece moleküler olarak tespit edilmeyip aynı zamanda enfekte kuşların organlarından virus izolasyonu gerçekleştirildiği için kuşların TOSV sirkülasyonunda rolleri olabileceği hipotezi doğrulanmıştır. Özellikle Samsun’da örneklenen 54 kuştan 14’ünde TOSV tespit edilmesi söz konusu bölgede TOSV enfeksiyonunun yaygınlığını ortaya koymuştur. Bu 14 kuşun tüm organları da hücre kültürüne inokule edilmiş ve yapılan değerlendirmelerde CPE gözlenmiştir. Ancak PCR ve takiben nükleotid dizileme teknikleri ile yapılan doğrulamalarda, sadece 3 kuş organlarından (ördek, güvercin ve keklik) yapılan ekimlerden elde edilen nükleotid dizilerinin TOSV ile uyumlu olduğu görülmüştür. Yaban hayatındaki hayvanlarda farklı virusların sirküle olabileceğinden ve ekilen bu kuş örneklerinde

TOSV'ün yanında başka virusların bulunabileceği ayrıca hücre kültüründe üreme aşamasında diğer virusların TOSV'ün üremesini baskılamış olabileceği de düşünülmektedir.

Toplam 17 kuşta tespit edilen TOSV'lere yapılan genotiplendirme sonucunda 1 kuş genotip A ve 16 tanesi ise genotip B olarak sınıflandırılmıştır. Ülkemizde TOSV yönünden yapılan araştırmalar incelendiğinde, insanlarda ve tatarcıklarda genotip A'nın sirküle olduğu bildirilmekle birlikte, köpeklerden de genotip B bildirimleri mevcuttur (Dinçer ve ark., 2015 ve Dinçer ve ark., 2016, Ergünay ve ark., 2010b; Ergünay ve ark., 2011 ve Ergünay ve ark., 2012a). Diğer ülkelerden yapılan bildirimlerde ise bazı ülkelerde genotip A ve B'nin insanlarda sirküle olduğu ifade edilmiştir (Alkan ve ark., 2015; Charrel ve ark., 2007; Collao ve ark., 2009 ve Punda-Polic ve ark., 2012). Kuşlarda yapılan bu tespit ile vadesi tahmin edilemese bile gelecekte ülkemizde genotip B'nin de insanlarda enfeksiyona neden olabileceği öngörüsü konulabilmektedir. Bu nedenle de kuşların göç rotasında bulunan şehirler için risk değerlendirmelerinin yapılması gereklidir. Ülkemizde özellikle kuş göç rotaları ile kesişen yaşam alanlarında insan ve/veya hayvanlarda yapılacak çalışmalar ile TOSV varlığı araştırılarak bu hipotezin de sorgulanması mümkün olabilecektir.

Yaban hayatında numune toplamak oldukça zorlu ve özel araştırma ekiplerinin iş birliğini gerektiren bir süreçtir ve bu nedenle enfeksiyöz nitelikli hastalıkların yaban hayatında varlığı ve yayılımı ile ilgili soruların cevaplanması uzun ve zahmetli çalışmalara ihtiyaç duymaktadır. TOSV genotip B bildirilen ülkelerde yaban hayata ilgili veri ne yazık ki bulunmamaktadır.

TOSV genotip B'nin görüldüğü ülkeler incelendiğinde (Fransa, İspanya, Portekiz, Fas, Türkiye, Hırvatistan, Yunanistan) virusun kuşların göç rotasında olduğu gibi iki ayrı koldan yayıldığı görülmektedir (Şekil 4.1) Alkan ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada Fransa, İspanya, Portekiz ve Fas'ın yanında Türkiye'de TOSV B genotipinin görülmesinin nedenini sorgulamışlar ve ülkemizde TOSV'ün izolasyonunun olmadığını vurgulamışlardır. Yapılan bu tez çalışması ile diğer araştırmacıların TOSV'ün nasıl yayıldığı konusunda yaptıkları yorumlara yeni bir ışık



tutulmuş olup, göç rotaları ile TOSV'ün yayılımının örtüştüğü bulgusundan hareketle, bu yayılımda kuşların rolü olabileceği ortaya konulmuştur. Ayrıca çalışma kapsamında TOSV'ün izolasyonu yapılarak da saha viruslarının elde edilmesi ülkemize bu virusun göçmen kuşlar aracılığı ile gelmiş olabileceği hipotezini kuvvetlendirmiştir.

Çalışma kapsamında TOSV L segmenti yönünden oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde; ülkemizden bildirilen TOSV B genotip sekanslarının dünyadaki diğer genotip B sekanslarından ayrı bir grup oluşturduğu gözlenmiştir. Genotip B hattı içinde oluşan bu ayrı gruplanma her ne kadar filogenetik ağaç üzerinde çok net bir şekilde Samsun ve Hatay orjinli örneklerdeki virusları da birbirinden ayırsa da daha uzun genom yapılarının nükleotit analizi ile doğrulanmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Cusi ve ark.(2018), yaptıkları bir çalışmada; TOSV'ün muhtemel kökeninin Kuzey Afrika olabileceği ve buradan da Avrupa ile Türkiye'ye gelmiş olabileceğini yaptıkları filodinamik analizler ile ortaya koymuşlardır. Fakat bu iki kıta arasındaki sıçramanın nasıl olduğunun net olmadığını belirtmişlerdir. Kuşların TOSV yayılımında, belirtilen teorideki sıçramadan sorumlu olabileceği, ilk kez bu tez çalışması ile ileri sürülmektedir.

İtalya, İspanya, Fransa ve Tunus gibi ülkelerde tatarcık toplanarak gerçekleştirilen TOSV araştırmalarında farklı oranlarda pozitiflikler tespit edilmesi sebebiyle, değişen çevresel koşullara bağlı olarak enfeksiyon oranının daha iyi anlaşılabilmesi için daha fazla sayıda tuzak örneklemeleri yapılmasına ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (Alkan ve ark., 2015). Aynı zamanda, TOSV'ün araştırılması için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının kapasitelerinin artırılması gerektiği de bildirilmiştir (Alkan ve ark., 2015). Yapılan bu çalışma ile kuşlarda TOSV varlığı gösterildikten sonra TOSV'ün tahmin edilenden daha fazla yayılmış olabileceği noktasından hareketle bu konuda araştırmaların artırılmasının hastalık takibine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Kuşlardan yeni TOSV suşlarının edinilmesi ile kuşların konaklama noktalarındaki alanlarda kurulacak tatarcık tuzaklarının yanında

o bölgelerdeki kuş ve memeli hayvanlara ait biyolojik örnekler kullanılarak yapılacak araştırmalar sonucunda TOSV'ün yayılım dinamiğinin hakkında daha net bilgiler elde edileceği düşünölmektedir.

Collao ve ark. (2009), yaptığı çalışmada, TOSV'ün Akdeniz bölgesi ölkelerinde bulunan insanlar (yerleşik veya turist) için önemli bir patojen olduğu ve virus hakkında araştırma yapabilmek için genom sekans bilgilerinin yeterli olmadığı belirtilmiştir. Özellikle yabani TOSV suşu hakkında daha fazla bilgi edinilerek teşhis için kullanılan primerlerin, sahadaki TOSV'ü ne kadar tanıdığı ile ilgili çalışmaların yapılmasına da bu konu dahilinde ihtiyaç olduğu aynı çalışmada bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında ise, TOSV tespiti amacıyla birden fazla primer kullanılmış ve bazı kuşlarda sadece bir primer çifti ile pozitiflik tespit edilmiştir. Kullanılan primerler pozitif kontrollerde çalışmış ve fakat sahadaki virusu tespit edememiştir. Bu kapsamda, tez çalışmasında TOSV teşhisinde kullanılan primerler içinde *Nphlebo* primerlerinin sahadaki TOSV'lere daha iyi bağlandığı tespit edilmiştir. Bundan sonra yapılacak araştırmalar için söz konusu primerlerin kullanımı önerilmiştir.

Özellikle zoonoz hastalıklarda, vektörlerin veya vertebralıların düzenli bir şekilde taranması ile aktif şekilde sirköle olan patojenler tespit edilebilir. Enzootik bulaşma seviyesi, insanları veya evcil hayvanları etkileyecek riski belirtmektedir (Reisen, 2017, s:31). Enzootik bulaşma aktivitesi için toplanan vektörlerdeki pozitiflik oranı, vertebralı konakçıların enfeksiyon oranı, sentinel serokonversiyon oranları ve klinik vakalar takip edilmektedir. Virusların amplifiye olduğu konakçılardan veya rezervuarlardan numune toplayıp test etmek, enzootik bulaşma seviyelerini tespit etmek için önemli bir noktadır (Reisen, 2017, s:31). Popölasyonlarda zamanla enfekte olan yeni canlıları tespit etmek, virusun bulaşma aktivitesini açıklamak için yapılması gereken bir araştırmadır (Reisen, 2017, s:31). Samsun'da örneklenen kuşların %25 gibi yüksek oranı TOSV pozitif olarak belirlendiğinden söz konusu bölgede insanlarda enfeksiyona neden olduğu ve/veya yakın gelecekte olabileceği düşünölmektedir. Aynı bölgedeki vektör aktivitesinin ve kuşların takibinin hastalık yayılımına ilişkin prediktif değer sağlayabileceği düşünöncesiyle yeni çalışmaların yapılmasının yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

Kuşların göç rotaları ile ilgili çalışmalar incelendiğinde kuşların Afrika'da Fas, Tunus gibi ülkelerden geçerek Avrupa'da İspanya, Fransa, Portekiz'e ulaştığı bildirilmiştir (EEA, 2019; Leito ve ark., 2015). Bu tez çalışmasında bulunan TOSV'nin İspanya, Portekiz ve Fas'tan bildirilen TOSV sekansları ile uyum gösterdiği yapılan analizler ile gösterilmiştir.

Tez çalışmasında tespit edilen BNV ve TOSV ile yapılan analizlere göre, bu viruslara en yakın olarak Akdeniz bölgesindeki ülkeler ortaya çıkmıştır. Tespit edilen TOSV ve BNV'nin kuşların göç rotasında bulunan ülkelerden yapılan bildirimlere genetik olarak yakın olduğu görülmüştür. Bu veriler ışığında da kuşların ülkeler/bölgeler arasında virus bulaşmasında rolü olduğu hipotezi de güçlenmiştir.

## 5.SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında Samsun ve Hatay bölgelerinde bulunan yabani/göçmen kuşlardan toplanan numuneler ile söz konusu virusların varlığı ve yayılımı ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre BNV ve TOSV'ün ülkemizde kuşlarda sirküle olduğu ve yayılımında kuşların rolü olduğu tespit edilmiştir.

Ülkemizde dönem dönem insanlarda ve atlarda enfeksiyonlara ve ölümlere neden olan BNV, bu çalışma kapsamında Hatay'da bir kartalda tespit edilerek kuşların BNV dağılımında diğer ülkelerdeki gibi önemli olabileceği düşünülmüştür.

BNV için yapılan genetik analizlere göre de, BNV Genetik Hat 1 Alttip 1A'da sınıflandırılmıştır. Filogenetik ağaçtaki dağılıma bakıldığında da, kartaldan tespit edilen virusun Akdeniz ülkelerindekine yakın olduğu tespit edilmiştir.

BNV'nün gözlenmesi amacıyla Amerika Birleşik Devletleri'nde kuşlar sürekli bir takip altında olduğuna ve bunun için online sistemlerin kullanılarak halk yardımı alındığına değinilmişti. Ülkemizde de kuşların taşıdığı hastalıklar hakkında halka yeterince bilgi verilebilirse ve benzer sistemler oluşturulur ise bu konular daha hızlı bir biçimde araştırılabilecektir.

Bu çalışma ile ilk kez kuşlarda TOSV tespit edilerek TOSV epidemiyolojisine katkı sağlanmıştır.

Bu çalışma kapsamında pozitif bulunan kuşlardan 1 tanesi genotip A ve 16 tanesi de genotip B olarak sınıflandırılmıştır. Ülkemizde daha önce genotip B bildirimleri köpeklerden yapılmıştır. Ülkemizde insanlarda genotip B'nin sirküle olup olmadığının araştırılması ve kaynağının göçmen kuşlardan gelip gelmediğinin tespiti hastalık yayılımını anlamak açısından önemlidir.

TOSV, ülkemizde insanlarda birçok bölgede tespit edilmiştir. Bunun yanında hayvanlarda da antikör tespitleri bulunmasına rağmen hayvanlarda semptom yapıp yapmadığı ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada, kuşlarda virus izolasyonu gerçekleştirilerek, bu canlılarda virusun çoğaldığı gösterilmiştir ve kanatlılar için önemli bir patojen olup olmadığı ileride yapılacak çalışmalar ile ortaya konulacaktır. Kanatlı ve çiftlik hayvanlarının bu enfeksiyon yönünden araştırılması olası verim kayıplarının tespitinde faydalı olabilecektir.

Özellikle kuşlarda yapılacak TOSV araştırmalarında, karşılaştırılan primerlerden Nphlebo primerlerinin tanı amacı ile kullanılması önerilmektedir.

Güvercinler insanların yaşadığı ortamlarda sıklıkla bulunmaktadır. Bu yakınlıktan dolayı taşıdıkları patojenleri insanlara yabancı kuşlara göre daha rahat bulaştırabilir. Bu nedenle güvercinde tespit edilip izole edilen TOSV'ü bulaştırması hakkında araştırma yapılması önemlidir.

Bu çalışma kapsamında Nairovirus tespit edilememiştir. Nairovirusların kuşlardaki yayılımını araştırmak için kuşlar ile ilgili daha fazla ve geniş çapta çalışmalar planlanmalıdır. Kene kaynaklı virusların kuşlardaki yayılımını araştırırken mümkünse kuştan alınan numunelerin yanında kenelerin de toplanması, elde edilecek verilerin güvenilirliğini arttıracaktır.

Bundan sonra da ülkemizde daha geniş çaplı yapılacak yabancı kuşlar konulu çalışmalar ile kuşların taşıdığı düşünölen hastalıklar araştırılarak ölkemize tehdit oluşturacak patojenler tespit edilmelidir.

Yapılan bu tez çalışmasında Hatay'dan elde edilen bulguların bir bölümü "A snapshot avian surveillance reveals West Nile virus and evidence of wild birds participating in Toscana virus circulation" başlıklı yayın haline dönüştürölmüştür (Hacıoğlu ve ark., 2017).

## ÖZET

### **Samsun ve Hatay İllerindeki Göçmen Kuşlarda Önemli Bazı Zoonotik Virusların Araştırılması**

Yeni ve yeniden çıkan hastalıklar, insan ve hayvan sağlığını tehdit ettiğinden tüm dünyada araştırılması öncelikli patojenler arasında bulunmaktadır. Bu patojenlerin ülkelere nasıl geldiği ve bulaşma siklusunun nasıl olduğu yapılan araştırmalar ile aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Bu patojenlerin taşınmasında göçmen kuşlar önemli bir rol oynamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında da göçmen kuşların kullandığı göç rotaları incelenerek Samsun ve Hatay illerindeki kuşlardan Flavivirus, Nairovirus ve Phleboviruslerin araştırılması amacıyla numuneler toplandı. Toplamda 117 kuştan elde edilen 464 numuneye belirtilen virus aileleri için RT-PCR ve Zika virus için Real Time RT-PCR yöntemleri kullanılarak analizler yapıldı. Hatay'dan toplanan bir kartalda Batı Nil Virusu tespit edildi. Yapılan genetik analizlere göre de Genetik Hat 1 Alttip 1a olarak sınıflandırıldı. Hatay'dan toplanan üç kuşta (flamingo, pelikan ve leylek) ve Samsun'dan toplanan 14 kuşta (4 ördek, 5 keklik, 4 bildircin ve 1 güvercin) ise Toscana virus (TOSV) tespit edildi. Samsun bölgesinden toplanan kuşların %25'i TOSV yönünden pozitif bulunduğundan bu hastalığa dikkat edilmesi gerekmektedir. Yapılan analizlere göre de Hatay'dan bir kuş Genotip A ve geri kalan 16 kuş ise Genotip B olarak sınıflandırılmıştır. Pozitif tespit edilen dokular hücre kültürlerine inokule edildikten sonra güvercin, ördek ve kekliğe ait organlardan TOSV izolasyonu yapılmıştır. Kuşlarda tespit edilen BNV ve TOSV ile ülkemizde bu hastalıkların sirkülasyonunda kuşların rolleri olabileceği görüldü. Ayrıca bu çalışma ile dünyada ilk defa kuşlarda TOSV tespiti yapılmıştır. Bu bulgu ile kuşların TOSV sirkülasyonuna katıldığı ve virusun ülkeler arasında vahşi/göçmen kuşlar aracılığıyla taşınabileceğine dair kanıt elde edilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Arbovirus, Batı Nil Virus, Göçmen Kuşlar, Toscanavirus, Yaban Hayatı.

## SUMMARY

### **Investigation of some important zoonotic viruses in migrating birds in Samsun and Hatay provinces**

Emerging and re-emerging diseases that threaten human and animal health have priority for researches among the other pathogens all over the World. How these pathogens arrive in countries and how the transmission cycle occurs are explained by researches. Migrating birds have important role in transmissions of these pathogens. The migrating routes used by migratory birds were examined and samples were collected to investigate Flavi- Nairo ve Phleboviruses from the birds in Samsun and Hatay provinces, within the scope of this thesis. 464 samples collected from 117 birds were analyzed by RT-PCR and qRT-PCR for these viruses. An eagle sample which collected from Hatay was found positive for West Nile Virus (WNV) and it was classified as Genetic Line 1 Subtype 1a according to genetic analysis. Toscana virus (TOSV) was detected in three birds (flamingo, pelicans and storks) collected from Hatay and 14 birds (4 ducks, 5 partridges, 4 quails and 1 pigeon) collected from Samsun. It should be noted that 25% of birds collected from Samsun region are found positive for TOSV. One bird from Hatay was classified as Genotype A while the other 16 birds were classified as Genotype B. Moreover, TOSV isolated from pigeon, duck and partridge's organs after the positive tissues were inoculated into cell cultures. Detection of WNV and TOSV in birds showed that birds have a role in the circulation of these infections in our country. In addition, this is the first detection of TOSV in birds. These findings prove that birds participated in TOSV circulation and TOSV could be transported between countries by wild / migratory birds.

**Keywords:** Arbovirus, Migrating Birds, Toscanavirus, West Nile Virus, Wildlife.

## KAYNAKLAR

- AKAKPO AJ, SALUZZO JF, BADA R, BORNAREL P, SARRADİN, P (1991). Epidemiology of Rift Valley fever in west Africa. 1. Serological investigation of small ruminants in Niger. *Bull Soc Pathol. Exot*, **84**:217–224.
- ALAM MM, KHURSHID A, SHARIF S, SHAUKAT S, SULEMAN RM, ANGEZ M, ZAIDI SS (2013). Crimean-Congo hemorrhagic fever Asia-2 genotype, Pakistan. *Emerg. Infect. Dis* **19**(6): 1017
- ALBAYRAK H, OZAN E, KURT M (2010). Molecular detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus (CCHFV) but not West Nile virus (WNV) in hard ticks from provinces in Northern Turkey. *Zoonoses Public Health*, **57**: 156–160.
- ALBAYRAK H, OZAN E, KURT M (2012). Serosurvey and molecular detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) in northern Turkey. *Trop Anim Health Prod*, **44**: 1667–1671.
- ALKAN C, BICHAUD L, DE LAMBALLERIE X, ALTEN B, GOULD EA, CHARREL RN (2013). Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: Epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral Res*, **100**: 54–74.
- ALKAN C, ALWASSOUF S, PIORKOWSKI G, BICHAUD L, TEZCAN S, DINCER E, ERGUNAY K, OZBEL Y, ALTEN B, DE LAMBALLERIE X, CHARREL RN (2015). Isolation, Genetic Characterization, and Seroprevalence of Adana Virus, a Novel Phlebovirus Belonging to the Salehabad Virus Complex, in Turkey. *J Virol*, **89**: 4080–4091.
- ALKAN C, ERISOZ KASAP O, ALTEN B, DE LAMBALLERIE X, CHARREL RN (2016). Sandfly-Borne Phlebovirus Isolations from Turkey: New Insight into the Sandfly fever Sicilian and Sandfly fever Naples Species. *PLoS Negl Trop Dis* **10**: 1–19.
- ALTAMURA LA, BERTOLOTTI-CIARLET A, TEIGLER J, PARAGAS J, SCHMALJOHN CS, DOMS RW (2007). Identification of a novel C-terminal cleavage of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus PreGN that leads to generation of an NSM protein. *J Virol*, **81**(12): 6632-6642.
- ALWASSOUF S, CHRISTODOULOU V, BICHAUD L, NTAIS P, MAZERIS A, ANTONIOU M, CHARREL RN (2016a). Seroprevalence of Sandfly-Borne Phleboviruses Belonging to Three Serocomplexes (Sandfly fever Naples, Sandfly fever Sicilian and Salehabad). in Dogs from Greece and Cyprus Using Neutralization Test. *PLoS Negl Trop Dis* **10**: 1–13.
- ALWASSOUF S, MAIA C, AYHAN N, COIMBRA M, CRISTOVAO JM, RICHT H, BICHAUD L, CAMPINO L, CHARREL RN (2016b). Neutralization-based seroprevalence of toscana virus and sandfly fever sicilian virus in dogs and cats from Portugal. *J Gen Virol*, **97**: 2816–2823.
- ANAGNOSTOU V, PARDALOS G, ATHANASIOU-METAXA M, PAPA A (2011). Novel phlebovirus in febrile child, Greece. *Emerg. Infect. Dis*, **17**(5): 940.



- ANDRIAMANDIMBY SF, MARIANNEAU P, RAFISANDRATANTSOA JT, ROLLIN PE, HERAUD JM, TORDO N, REYNES JM (2011). Crimean-Congo hemorrhagic fever serosurvey in at-risk professionals, Madagascar, 2008 and 2009. *J Clin Virol*, **52**: 370–372.
- ANGELINI P, TAMBA M, FINARELLI AC, BELLINI R, ALBIERI A, BONILAUDI P, MATTIVI A (2010). West Nile virus circulation in Emilia-Romagna, Italy: the integrated surveillance system 2009. *Eurosurveillance*, **15**(16), 19547.
- APTE-SENGUPTA S, SIROHI D, KUHN RJ (2014). Coupling of replication and assembly in flaviviruses. *Curr. Opin. Virol*, **9**: 134–142.
- ARIAS-GOETA C, MOUTAILLER S, MOUSSON L, ZOUACHE K, THIBERGE JM, CARO V, FAILLOUX AB (2014). Chikungunya virus adaptation to a mosquito vector correlates with only few point mutations in the viral envelope glycoprotein. *Infection, Genetics and Evolution*, **24**: 116–126.
- ASHRAF U, YE J, RUAN X, WAN S, ZHU B, CAO S (2015). Usutu virus: an emerging flavivirus in Europe. *Viruses*; **7**: 219–38.
- ATKINSON B, CHAMBERLAIN J, LOGUE CH, COOK N, BRUCE C, DOWALL SD, HEWSON R (2012). Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **12**(9), 786–793.
- AUTORINO GL, BATTISTI A, DEUBEL V, FERRARI G, FORLETTA R, GIOVANNINI A, LELLI R, MURRI S, SCICLUNA MT (2002). West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**: 1372–1378.
- AYHAN N, VELO E, DE LAMBALLERIE X, KOTA M, KADRIAJ P, OZBEL Y, CHARREL RN, BINO S (2016). Detection of *Leishmania infantum* and a novel phlebovirus (Balkan virus) from sand flies in Albania. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **16**(12): 802–806.
- AYHAN N, ALTEN B, IVOVIC V, DVOŘÁK V, MARTINKOVIC F, OMERAGIC J, KASAP O, E, VOLF P, CHARREL RN (2017). Direct evidence for an expanded circulation area of the recently identified Balkan virus (Sandfly fever Naples virus species) in several countries of the Balkan archipelago. *Parasites & vectors*, **10**(1): 402.
- BAKONYI T, HUBALEK Z, RUDOLF I, NOWOTNY N (2005). Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, **11**: 225–231.
- BAKONYI T, IVANICS E, ERDELYI K, URSU K, FERENCZI E, WEISSENBOCK H, NOWOTNY N (2006). Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, **12**: 618–623.
- BARTELLONI PJ, TESH RB (1976). Clinical and serologic responses of volunteers infected with phlebotomus fever virus (Sicilian type). *Am J Trop Med Hyg.*, **25**: 456–62.
- BECKER N, JÖST H, ZIEGLER U, EIDEN M, HÖPER D, EMMERICH P, HOFFMANN B (2012). Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. *PloS one*, **7**(2): e32604.

- BEGUM F, WISSEMAN JR, CASALS J (1970). Tick-borne viruses of west Pakistan: IV. Viruses similar to, or identical with, Crimean Hemorrhagic Fever (Congo-Semunya), wad medani and pak argas 461 isolated from ticks of the changa manga forest, lahore district, and of hunza, gilgit agency. Pakistan. *American journal of epidemiology*, **92**(3): 197-202.
- BENTE DA, FORRESTER NL, WATTS DM, MCAULEY AJ, WHITEHOUSE CA, BRAY M (2013). Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Res* **100**: 159–189.
- BERTHET FX (1997). Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *J. Gen. Virol*, **78**: 2293–2297.
- BERTHET N, NAKOUNÉ E, GESSAIN A, MANUGUERRA JC, KAZANJI M (2016). Complete genome characterization of the Arumowot virus (unclassified Phlebovirus) isolated from *Turdus libonyanus* birds in the Central African Republic. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **16**(2): 139-143.
- BILIBIN A, (1950). Omsk and Crimean hemorrhagic fevers (In English:NAMRU3eT805). Symptoms Diagn. *Infect. Medgiz*, 200e208.
- BİRDİLİFE (2019).Erişim adresi: [https://maps.birdlife.org/MSBtool/?locale=en\\_US](https://maps.birdlife.org/MSBtool/?locale=en_US). Erişim tarihi: 16.03.2019
- BİRDİS R, KOMAR O, ROBBİNS MB, KLENK K, BLİTVİCH BJ, MARLENEE NL, BURKHALTER KL, GUBLER DJ, GONZÁLVEZ G, PEÑA CJ, PETERSON AT, KOMAR N (2003) West Nile Virus Transmission in Dominican Republic. *Emerg Infect Dis*, **9**: 1299–1302.
- BISAİLLON M, LEMAY G (1997). Viral and cellular enzymes involved in synthesis of mRNA cap structure. *Virology*, **236**: 1–7.
- BONDRE VP, JADI RS, MISHRA PN, YERGOLKAR VA, ARANKALLE VA (2007). West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *Journal of General Virology*, **88** (3): 875–884.
- BOSCH I, HERRERA F, NAVARRO JC, LENTINO M, DUPUIS A, MAFFEI J, JONES M, FERNÁNDEZ E, PÉREZ N, PÉREZ-EMÁN J, GUIMARÃES AE, BARRERA R, VALERO N, RUIZ J, VELÁSQUEZ G, MARTINEZ J, COMACH G, KOMAR N, SPIELMAN A, KRAMER L (2007). West Nile virus, Venezuela. *Emerg Infect Dis*, **13**: 651–653.
- BRAITO A, CORBISIERO R, CORRADINI S, FIORENTINI C, CIUFOLINI MG (1998). Toscana virus infections of the central nervous system in children: a report of 14 cases. *J Pediatr*, **132**:144–8.
- BRECHER M, ZHANG J, LI H (2013). The flavivirus protease as a target for drugdiscovery. *Virology Sin*, **28**: 326–336.
- BRUGMAN VA, HORTON DL, PHIPPS LP, JOHNSON N, COOK AJC, FOOKS AR, BREED AC (2013). Epidemiological perspectives on West Nile virus surveillance in wild birds in Great Britain. *Epidemiol Infect*, **141**: 1134–1142.

- BRUNETTI R, FRITZ RF, HOLLISTER AC (1954). An outbreak of malaria in California. *Am J Trop Med Hyg*, **3**: 779–788.
- BUCKLEY, A, DAWSON A, MOSS SR, HINSLEY SA, BELLAMY P, GOULD EA (2003). Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *Journal of General Virology*, **84**(10): 2807-2817.
- CALISHER CH, WEINBERG AN, MUTH DJ, LAZUICK JS (1987). Toscana virus infection in United States citizen returning from Italy. *Lancet*, **1**: 165-166.
- CALZOLARI M, BONILAURI P, BELLIN R, ALBIERI A, DEFILIPPO F, TAMBA M, TASSINARI M, GELATI A, CORDIOLI P, ANGELINI P, DOTTORI M (2013). Usutu virus persistence and West Nile virus inactivity in the Emilia-Romagna region (Italy) in 2011. *PLoS ONE*, **8**: e63978.
- CAPUA I (1998). Crimean-Congo haemorrhagic fever in ostriches: A public health risk for countries of the European Union?. *Avian Pathol*, **27**: 117–120.
- CARROLL SA, BIRD BH, ROLLIN PE, NICHOL ST (2010). Ancient common ancestry of Crimean Congo hemorrhagic fever virus. *Mol Phylogenet Evol*, **55**:1103e10.
- CASTANHA PM, NASCIMENTO EJ, CYNTHIA B, CORDEIRO MT, DE CARVALHO OV, DE MENDONCA LR, AZEVEDO EA, FRANCA RF, RAFAEL D, MARQUES ET (2017). Dengue virus (DENV)-specific antibodies enhance Brazilian Zika virus (ZIKV) infection. *J. Infect. Dis*, **215**:781–785.
- CASTLE E, LEIDNER U, NOWAK T, WENGLER G, WENGLER G (1986). Primary structure of the West Nile flavivirus genome region coding for all nonstructural proteins. *Virology*, **149**(1): 10-26.
- CAVRINI F, GAIBANI P, LONGO G, PIERRO AM, ROSSINI G, BONILAURI P, GERUNDA GE, GERUNDI GE, DI BENEDETTO F, PASETTO A, GIRARDIS M, DOTTORI M, LANDINI MP, SAMBRI V (2009). Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill*, **14**, 17–18.
- CDC (2018). Final Cumulative Maps & Data for 1999–2017. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/cumMapsData.html#seven>. Erişim Tarihi:01.05.2019.
- CDC (2019). Erişim adresi: <https://wwwn.cdc.gov/Arbocat/VirusBrowser.aspx>. Erişim Tarihi: 01.05.2019.
- CHANCEY C, GRINEV A, VOLKOVA E, RIOS M (2015). The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *BioMed Research International*, **2015**: 376230.
- CHARREL RN, GALLIAN P, NAVARRO-MARI JM, NICOLETTI L, PAPA A, SANCHEZ-SECO MP, TENORIO A, DE LAMBALLERIE X (2005). Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerg Infect Dis*, **11**: 1657-1663.
- CHARREL RN, IZRI A, TEMMAM S, DELAUNAY P, TOGA I, DUMON H, MARTY P, DE LAMBALLERIE X, PAROLA P (2007). Cocirculation of 2 genotypes of Toscana virus, southeastern France. *Emerg Infect Dis*, **13**: 465–468.

- CHASKOPOULOU A, DOVAS C, CHAINTOUTIS S, BOUZALAS I, ARA G, PAPANASTASSOPOULOU M (2011). Evidence of enzootic circulation of West Nile virus (Nea Santa-Greece-2010, lineage 2), Greece, May to July 2011. *Euro Surveill*, **16** (31): pii 19933
- CHINIKAR S, GHIASI SM, HEWSON R, MORADI M, HAERI A (2010). Crimean-Congo hemorrhagic fever in Iran and neighboring countries. *J Clin Virol*, **47**: 110–114.
- CHUMAKOV MP, SMIRNOVA SE, TKACHENKO EA (1969). Relationships between strains of Crimean haemorrhagic fever and Congo viruses. *Acta Virologica*, **14**: 82-85.
- CHUMAKOV M (1974). Contribution to 30 years of investigation of Crimean hemorrhagic fever (In English: NAMRU3eT950). In: Chumakov, M.P. (Ed.), *Med Virol*, 22(2). *Tr Inst Polio Virus Entsef Akad Med Nauk SSSR*, pp. 5e18
- CICCOZZI M, PELETTO S, CELLA E, GIOVANETTI M, LAI A, GABANELLI E, PRESTI AL (2013). Epidemiological history and phylogeography of West Nile virus lineage 2. *Infection, Genetics and Evolution*, **17**: 46-50.
- CIUFOLINI MG, MAROLI M, VERANI P. (1985). Growth of two phleboviruses after experimental infection of their suspected sand fly vector, *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg*, **34**: 174–9.
- CLARK L, HALL J, MCLEAN R, DUNBAR M, KLENK K, BOWEN R, SMERASKI CA (2006). Susceptibility of greater sage-grouse to experimental infection with West Nile virus. *J Wildl Dis*, **42**: 14–22.
- CLEAVELAND S, LAURENSEN MK, TAYLOR LH (2001). Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond, B, Biol. Sci*, **356**(1411), 991-999.
- CLEAVES GR, DUBIN DT (1979). Methylation status of intracellular dengue type 240 S RNA. *Virology*, **96**: 159–165.
- COFFEY LL, FORRESTER N, TSETSARKIN K, VASILAKIS N, WEAVER SC (2013). Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future microbiology*, **8**(2): 155-176.
- COLLAO X, PALACIOS G, SANBONMATSU-GÁMEZ S, PÉREZ-RUIZ M, NEGREDO AI, NAVARRO-MARÍ JM, GRANDADAM M, ARANSAY AM, LIPKIN WI, SÁNCHEZ-SECO MP (2009). Genetic diversity of Toscana virus. *Emerg Infect Dis*, **15**: 574–577.
- CONTIGIANI, MS, DIAZ LA, SPINSANTI L (2017). Chapter 6: Flaviviruses. *Arthropod Borne Diseases*, Ed.: Marcondes C.B. Switzerland, p:73-88
- CONTRERAS A, GOMEZ-MARTIN A, PATERNA A, TATAY-DUALDE J, PRATS-VAN DER HAM M, CORRALES JC, SÁNCHEZ A (2016). Epidemiological role of birds in the transmission and maintenance of zoonoses. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, **35**(3): 845-853.

- CUSI MG, GORI SAVELLINI G, TERROSI C, DI GENOVA G, VALASSINA M, VALENTINI M, BARTOLOMMEI S, MIRACCO C (2005). Development of a mouse model for the study of Toscana virus pathogenesis. *Virology*, **333**:66–73.
- CUSI MG, SAVELLINI GG, ZANELLI G (2010). Toscana Virus Epidemiology: From Italy to Beyond. *Open Virol J*, **4**: 22–28.
- CUSI MG, GANDOLFO C, SAVELLINI GG, TERROSI C, SADLER RA, GATHERER D (2018). Phylodynamic analysis of the historical spread of Toscana virus around the Mediterranean. *Biorxiv*, 380477.
- ÇARHAN A, UYAR Y, ÖZKAYA E, ERTEK M, DOBLER G, DILCHER M, WANG Y, SPIEGEL M, HUFERT F, WEIDMANN M (2010). Characterization of a sandfly fever Sicilian virus isolated during a sandfly fever epidemic in Turkey. *Journal of clinical Virology*, **48**(4): 264–269.
- DAHMANI M, ALWASSOUF S, GRECH-ANGELINI S, MARIÉ J LOU, DAVOUST B, CHARREL RN (2016). Seroprevalence of Toscana virus in dogs from Corsica, France. *Parasites and Vectors* **9**: 1–4.
- DEYDE VM, KHRISTOVA ML, ROLLIN PE, KSIAZEK TG, NICHOL ST (2006). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *J Virol*, **80** (17): 8834–8842.
- DIAZ LA, FLORES FS, QUAGLIA A, CONTIGIANI MS (2013). Intertwined arbovirus transmission activity: reassessing the transmission cycle paradigm. *Frontiers in physiology*, **3**: 493.
- DICKSON DL, TURELL MJ (1992). Replication and tissue tropisms of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus in experimentally infected adult *Hyalomma truncatum* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol*, **29**: 767–773.
- DINCER E, GARGARI S, OZKUL A, ERGUNAY K (2015). Potential animal reservoirs of Toscana virus and coinfections with *Leishmania infantum* in Turkey. *Am J Trop Med Hyg*, **92**: 690–697.
- DINCER E, KARAPINAR Z, OKTEM M, OZBABA M, OZKUL A, ERGUNAY K (2016). Canine infections and partial S segment sequence analysis of Toscana virus in Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **16**(9): 611–618.
- DINÇER E, BRINKMANN A, HEKIMOĞLU O, HACIOĞLU S, FÖLDES K, KARAPINAR Z, ÖZE N, ÖZKUL A, NITSCHKE A, ERGÜNAY K (2017). Generic amplification and next generation sequencing reveal Crimean-Congo hemorrhagic fever virus AP92-like strain and distinct tick phleboviruses in Anatolia, Turkey. *Parasites and vectors*, **10**(1): 335.
- DOHM DJ, LOGAN TM, LINTHICUM KJ, ROSSI CA, TURELL MJ (1996). Transmission of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus by *Hyalomma impeltatum* (Acari: Ixodidae) after experimental infection. *J. Med. Entomol*, **33**: 848–851.
- DRESHAJ S, AHMETI S, RAMADANI N, DRESHAJ G, HUMOLLI I, DEDUSHAJ I (2016). Current situation of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Southeastern Europe and neighboring countries: a public health risk for the European Union?. *Travel Med Infect Dis*, **14**: 81–91.

- DSÖ. (2019). Erişim Adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>. Erişim Tarihi:01.05.2019.
- DSÖ (2018). Avian influenza, fact sheet.
- DSÖ (2019). Erişim Adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>. Erişim Tarihi: 01.05.2019.
- DUH D, NICHOL ST, KHRISTOVA ML, SAKSIDA A, HAFNER- I, PETROVEC M, DEDUSHAJ I, AHMETI S, AVŞI T (2008). The complete genome sequence of a Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus isolated from an endemic region in Kosovo. *Virology journal*, **5**(1): 7
- DUNKEL B, PIERO F, WOTMAN KL, JOHNS IC, BEECH J, WILKINS PA (2004). Encephalomyelitis from West Nile flavivirus in 3 alpacas. *Journal of veterinary internal medicine*, **18**(3): 365-367.
- ECDC (2018). Epidemiological update: West Nile virus transmission season in Europe, 2018, epidemiological update news.
- EEA (2019). Erişim Adresi: [https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/figures/migration-routes-for-selected-bird-species/int9\\_migration.pdf/int9\\_migration.pdf.400dpi.gif](https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/figures/migration-routes-for-selected-bird-species/int9_migration.pdf/int9_migration.pdf.400dpi.gif). Erişim Tarihi: 25.04.2019.
- ELLIOTT RM, BRENNAN B (2014). Emerging phleboviruses. *Current opinion in virology*, **5**: 50-57.
- ERDELYI K, URSU K, FERENCZI E, SZEREDI L, RATZ F, SKARE J, BAKONYI T (2007). Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **7**: 181–188.
- ERGUNAY K, SAYGAN MB, AYDOĞAN S, LO MM, WEIDMANN M, DILCHER M, ŞENER B, HASÇELİK G, PINAR A, US D (2010b). Sandfly fever virus activity in Central/Northern Anatolia, Turkey: first report of Toscana virus infections. *Clin Microbiol Infect*, **17**(4): 575-581.
- ERGÜNAY K, SAYGAN MB, AYDOĞAN S, LO MM, WEIDMANN M, DILCHER M, ŞENER B, HASÇELİK G, PINAR A, US D (2011). Sandfly fever virus activity in central/northern Anatolia, Turkey: First report of Toscana virus infections. *Clin Microbiol Infect*, **17**: 575–581.
- ERGUNAY K, AYDOĞAN S, ILHAMI OZCEBE O, CILEK EE, HACIOGLU S, KARAKAYA J, OZKUL A, US D (2012a). Toscana Virus (TOSV). exposure is confirmed in blood donors from Central, North and South/Southeast Anatolia, Turkey. *Zoonoses Public Health* **59**: 148–154.
- ERGUNAY K, ERISOZ KASAP O, KOCAK TUFAN Z, TURAN MH, OZKUL A, ALTEN B (2012b). Molecular Evidence Indicates That Phlebotomus major sensu lato (Diptera: Psychodidae). Is the Vector Species of the Recently-Identified Sandfly Fever Sicilian Virus Variant: Sandfly Fever Turkey Virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **12**: 690–698.
- ERGUNAY K, GUNAY F, OTER K, KASAP OE, ORSTEN S, AKKUTAY AZ, ERDEM H, OZKUL A, ALTEN B (2013). Arboviral Surveillance of Field-Collected Mosquitoes Reveals

Circulation of West Nile Virus Lineage 1 Strains in Eastern Thrace, Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **13**: 744–752.

ERGUNAY K, GUNAY F, KASAP OE, OTER K, GARGARI S, KARAOGLU T, TEZCAN S, CABALAR M, YILDIRIM Y, EMEKDAS G, ALTEN B, OZKUL A (2014). Serological, molecular and entomological surveillance demonstrates widespread circulation of West Nile virus in Turkey. *PLoS neglected tropical diseases*, **8**(7): e3028.

ERGUNAY K, BAKONYI T, NOWOTNY N, OZKUL A (2015). Close relationship between west Nile virus from turkey and lineage 1 strain from central African Republic. *Emerg Infect Dis*, **21**: 352–355.

ERGÜNAY K, LITZBA N, BRINKMANN A, GÜNAY F, SARIKAYA Y, KAR S, ÖRSTEN S, ÖTER K, DOMINGO C, ERISOZ KASAP Ö, ÖZKUL A, MITCHELL L, NITSCHKE A, ALTEN B, LINTON YM (2017). Co-circulation of West Nile virus and distinct insect-specific flaviviruses in Turkey. *Parasites and Vectors*, **10**: 1–14.

ERTUGRUL B, UYAR Y, YAVAS K, TURAN C, ONCU S, SAYLAK O, CARHAN A, OZTURK B, EROL N, SAKARYA S (2009). An outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in western Anatolia, Turkey. *Int J Infect Dis*. **13**(6).

ESTRADA-PENA A, PALOMAR AM, SANTIBÁÑEZ P, SÁNCHEZ N, HABELA MA, PORTILLO A, OTEO JA (2012). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks, Southwestern Europe, 2010. *Emerg. Infect. Dis*, **18**(1): 179.

FAJS L, JAKUPI X, AHMETI S, HUMOLLI I, DEDUSHAJ I, AVŠIČ-ŽUPANC T (2014). Molecular Epidemiology of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Kosovo. *PLoS Negl Trop Dis*, **8**: 43.

FERRAGUTI M, MARTINEZ-DE LA PUENTE J, SORIGUER R, LLORENTE F, JIMÉNEZ-CLAVERO MÁ, FIGUEROLA J (2016). West Nile virus-neutralizing antibodies in wild birds from southern Spain. *Epidemiology and Infection*, **144**(9): 1907-1911.

FIONA J, MAY C, TODD D, TESH R, BARRETT T. (2011). Phylogeography of West Nile Virus: from the Cradle of Evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J Virol*. **85** (6): 2964.

GARGILI A, MIDILLI, ERGONUL O, ERGIN S, ALP HG, VATANSEVER Z, IYISAN S, CERIT C, YILMAZ G, ALTAS K, ESTRADA-PENA A (2011). Crimean–Congo hemorrhagic fever in European part of Turkey: genetic analysis of the virus strains from ticks and a seroepidemiological study in humans. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **11**: 747–752.

GERGOVA I, KUNCHEV M, KAMARINCHEV B (2012). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus -Tick Survey in Endemic Areas in Bulgaria. *Journal of medical virology*, **84**(4): 608-614.

GOMEZ A, KRAMER A, DUPUIS LP (2008). Experimental infection of eastern gray squirrels (*Sciurus carolinensis*) with West Nile virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, **79**(3): 447-451.

- GONZALEZ JP, CAMICAS JL, CORNET JP, FAYE O, WILSON ML (1992). Sexual and transovarian transmission of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in *Hyalomma truncatum* ticks. *Res. Virol*, **143** (1): 23e28
- GORDON SW, LINTHICUM KJ, MOULTON JR (1993). Transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in two species of *Hyalomma* ticks from infected adults to cofeeding immature forms. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, **48**: 576–580.
- GRASHCHENKOV N (1945). Investigations of Etiology, Pathogenesis, and Clinical Symptomatology of Crimean Hemorrhagic Fever (In English: NAMRU3eT1189) Reports 1944. *Sci Investig Inst Neurol Akad Med Nauk SSSR*, pp. 100e107.
- GROBOV A (1946). Carriers of crimean haemorrhagic fever (In English: NAMRU3eT36). *Med. Parazit. Parazit. Bolezn*, **15**: 59e63.
- HACIOGLU S, DİNCER E, ISLER CT, KARAPINAR Z, ATASEVEN VS, OZKUL A, ERGUNAY K (2017). A snapshot avian surveillance reveals West Nile virus and evidence of wild birds participating in Toscana virus circulation. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **17**(10), 698-708.
- HALSTEAD SB (2015). Reappearance of chikungunya, formerly called dengue, in the Americas. *Emerg. Infect. Dis*, **21**: 557–561.
- HASLE G, BJUNE G, EDVARDSSEN E, JAKOBSEN C, LINNEHOL B, RØER JE, LEINAAS HP (2009). Transport of ticks by migratory passerine birds to Norway. *Journal of Parasitology*, **95**(6): 1342-1352.
- HEMMERSBACH-MILLER M, PAROLA P, CHARREL RN, PAUL DURAND J, BROUQUI P. (2004). Sandfly fever due to Toscana virus: an emerging infection in southern France. *Eur J Intern Med*, **15**: 316-7.
- HENDERSON WW, MONROE MC, ST JEOR SC, THAYER WP, ROWE JE, PETERS CJ, NICHOL ST (1995). Naturally occurring Sin Nombre virus genetic reassortants. *Virology*, **214**: 602–610.
- HONIG JE, OSBORNE JC, NICHOL ST (2004). The high genetic variation of viruses of the genus *Nairovirus* reflects the diversity of their predominant tick hosts. *Virology*, **318**(1): 10-16.
- HOOGSTRAAL H (1979). The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *J. Med. Entomol*, **15** (4): 307e417.
- HOOGSTRAAL H, KAISER MN, TRAYLOR MA, GABER S, GUINDY E.( 1961). Ticks (Ixodidea). on birds migrating from Africa to Europe and Asia. *Bull World Health Organ*, **24**:197–212.
- HORNOK S, HORVÁTH G (2012). First report of adult *Hyalomma marginatum rufipes* ( vector of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus ) on cattle under a continental climate in Hungary. *Parasit Vectors*, **5**: 170.
- HUBÁLEK Z, HALOUZKA, J (1999). West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis*, **5**(5): 643.



- HUBÁLEK Z, HALOUZKA J, JUŘICOVÁ Z, ŠIKUTOVÁ S, RUDOLF I, HONZA M, SITKO J (2008a). Serologic survey of birds for West Nile flavivirus in southern Moravia (Czech Republic). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **8**(5), 659-666.
- HUBÁLEK Z, WEGNER E, HALOUZKA J, TRYJANOWSKI P, JERZAK L, ŠIKUTOVÁ S, WLODARCZYK R (2008b). Serologic survey of potential vertebrate hosts for West Nile virus in Poland. *Viral immunology*, **21**(2): 247-254.
- HUSON DH, SCORNAVACCA C (2012). Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Systematic biology*, **61**(6), 1061-1067.
- HUTCHESON HJ, GORHAM CH, MACHAIN-WILLIAMS C, LOROÑO-PINO MA, JAMES AM, MARLENEE NL, BLAIR CD (2005). Experimental transmission of West Nile virus (Flaviviridae: Flavivirus) by *Carios capensis* ticks from North America. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **5**(3): 293-295.
- ICTV (2016). Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Online 10th Report of the ICTV.
- ICTV (2018). Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses 2018b Release.
- JAMESON LJ, MORGAN PJ, MEDLOCK JM, WATOLA G, VAUX AG (2012). Importation of *Hyalomma marginatum*, vector of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus, into the United Kingdom by migratory birds. *Ticks Tick Borne Dis*, **3**:95e9.
- JONES CT, MA L, BURGNER JW, GROESCH TD, POST CB, KUHN RJ (2003). Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *J Virol*, **77**(12): 7143-7149.
- JURICOVA Z, PINOWSKI J, LITERAK I, HAHM KH, ROMANOWSKI J (1998). Antibodies to alphavirus, flavivirus, and bunyavirus arboviruses in house sparrows (*Passer domesticus*) and tree sparrows (*P. montanus*) in Poland. *Avian diseases*, **42**(1): 182-185.
- KALAYCIOGLU H, KORUKLUOGLU G, OZKUL A, ONCUL O, TOSUN S, KARABAY O, GOZALAN A, UYAR Y, CAGLAYIK DY, ATASOYLU G, ALTAS AB, YOLBAKAN S, OZDEN TN, BAYRAKDAR F, SEZAK N, PELITLI TS, KURTCEBE ZO, AYDIN E, ERTEK M (2012). Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011. *Euro Surveill*, **17**(21):20182.
- KALE M, GÜR S, YAPICI O, MAMAK N, YAVRU S, HASIRCIOĞLU S, BULUT O, GÜRÇAY M (2017). Serological investigation of West Nile Virus infection in domestic horses and donkeys in Turkey. *Pak Vet J*, **37**(1): 51-54.
- KAMPEN H, POLTZ W, HARTELT K, WOLFEL R, FAULDE M (2007). Detection of a questing *Hyalomma marginatum marginatum* adult female (Acari, Ixodidae) in southern Germany. *Exp Appl Acarol*, **43**(3):227e31.
- KARAKAŠEVIĆ B (1947). O prvoj epidemiji papatačijeve groznice na teritoriji NR Srbije. *Vojno sanitetski pregled*, **4**(9/10): 224-228.

- KARAKOÇ ZÇ, TÜZÜNER BM, ERGONUL O, PIERRO A, DI FONZO E, KORUK I, SAMBRI V (2013). West Nile virus infection in the Mesopotamia region, Syria border of Turkey. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **13**(10): 739-743.
- KATOH K, STANDLEY DM (2016). A simple method to control over-alignment in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics* **32**: 1933-1942.
- KAUTMAN M, TIAR G, PAPA A, ŠIROKÝ P (2016). Ap92-like crimean-congo hemorrhagic fever virus in Hyalomma aegyptium ticks, Algeria. *Emerg Infect Dis*, **22**: 354–356.
- KAY BH, FARROW RA (2000). Mosquito (Diptera: Culicidae). dispersal: implications for the epidemiology of Japanese and Murray Valley encephalitis viruses in Australia. *J Med Entomol*, **37**: 797–801
- KENT RJ, CRABTREE MB, MILLER BR (2010). Transmission of West Nile virus by Culex quinquefasciatus say infected with Culex Flavivirus Izabal. *PLoS Negl Trop Dis*, **4**(5), e671.
- KHROMYKH AA, SEDLAK PL, WESTAWAY EG (1999). trans-Complementation analysis of the flavivirus Kunjin ns5 gene reveals an essential role for translation of its N-terminal half in RNA replication. *J. Virol.* **73**: 9247-9255.
- KIRBAŞ A (2009). Elazığ, Samsun, Sivas, Tokat ve Yozgat illerindeki sığır ve koyunlarda Kırim Kongo kanamalı ateş virüs enfeksiyonunun seroprevalansının araştırılması; Doktora Tezi
- KLIMENTOV AS, BUTENKO AM, KHUTORETSKAYA NV, SHUSTOVA EY, LARICHEV VF, ISAEVA OV, GMYL AP (2016). Development of pan-phlebovirus RT-PCR assay. *Journal of virological methods*, **232**: 29-32.
- KOMAR N, LANGEVIN S, HINTEN S, NEMETH N, EDWARDS E, HETTLER D, DAVIS B, BOWEN R, BUNNING M (2003). Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis*, **9**(3), 311-22.
- KOMAR O, ROBBINS MB, KLENK K, BLITVICH BJ, MARLENEE NL, BURKHALTER KL, KOMAR N (2003). West Nile virus transmission in resident birds, Dominican Republic. *Emerg. Infect. Dis*, **9**(10): 1299.
- KOONIN EV (1993). Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. *J. Gen. Virol*, **74** (4): 733-740.
- KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, AND TAMURA K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* **35**: 1547-1549.
- LABUDA M, DANIELOVA V, JONES LD, NUTTALL PA (1993). Amplification of tick-borne encephalitis virus infection during co-feeding of ticks. *Med. Vet. Entomol.* **7** (4):339e342.
- LARSSON, A (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics*, **30**(22): 3276-3278.

- LANCIOTTI RS, EBEL GD, DEUBEL V, KERST AJ, MURRI S, MEYER R, KRAMER LD (2002). Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology*, **298**(1): 96-105.
- LAZEAR HM, DIAMOND MS (2016). Zika virus: new clinical syndromes and its emergence in the western hemisphere. *J. Virol*, **90**: 4864-4875.
- LEBLEBICIOGLU H, EROGLU C, ERCIYAS-YAVUZ K, HOKELEK M, ACICI M, YILMAZ H (2014). Role of migratory birds in spreading Crimean-Congo hemorrhagic fever, Turkey. *Emerg Infect Dis*, **20**: 1331-1334.
- LEBLEBICIOGLU H, OZARAS R, IRMAK H, SENCAN I (2016). Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey: Current status and future challenges. *Antiviral Res*, **126**: 21-34.
- LECOLLINET S, BLANCHARD Y, MANSON C, LOWENSKI S, LALOY E, QUENAULT H, TOUZAIN F, LUCAS P, ERAUD C, BAHUON C, ZIENTARA S, BECK C, DECORS A (2016). Dual emergence of Usutu virus in common blackbirds, Eastern France, 2015. *Emerg Infect Dis*, **22**(12): 2225.
- LEITO A, BUNCE RGH, KÜLVIK M, OJASTE I, RAET J, VILLOSLADA M, LEIVITS M, KULL A, KUUSEMETS V, KULL T, METZGER MJ, SEPP K (2015). The potential impacts of changes in ecological networks, land use and climate on the Eurasian crane population in Estonia. *Landscape Ecology*, **30**: 887-904.
- LELLI R, CALISTRI P, BRUNO R, MONACO F, SAVINI G, DI SABATINO D, CORSI I, PASCUCCI I (2012). West Nile transmission in resident birds in Italy. *Transbound Emerg Dis*, **59**: 421-428.
- LI D, SCHMALJOHN AL, ANDERSON , SCHMALJOHN CS (1995). Complete nucleotide sequences of the M and S segments of two hantavirus isolates from California: evidence for reassortment in nature among viruses related to hantavirus pulmonary syndrome. *Virology*, **206**: 973-983.
- LINDEBORG M, BARBOUTIS C, EHRENBORG C, FRANSSON T, JAENSON TGT, LINDGREN P-E, LUNDKVIST Å, NYSTRÖM F, SALANECK E, WALDENSTRÖM J, OLSEN B (2012). Migratory Birds, Ticks, and Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Emerg Infect Dis*, **18**: 2095-2097.
- LLOPIS IV, ROSSI L, DI GENNARO A, MOSCA A, TEODORI L, TOMASSONE L, GREGO E, MONACO F, LORUSSO A, SAVINI G (2015). Further circulation of West Nile and Usutu viruses in wild birds in Italy. *Infection, Genetics and Evolution*, **32**: 292-297.
- LLORENTE F, PÉREZ-RAMÍREZ E, FERNÁNDEZ-PINERO J, SORIGUER R, FIGUEROLA J, JIMÉNEZ-CLAVERO MÁ (2013). Flaviviruses in game birds, Southern Spain, 2011-2012. *Emerg Infect Dis*, **19**(6): 1023.
- LU G, GONG P (2013). Crystal structure of the full-length Japanese encephalitisvirus NS5 reveals a conserved methyltransferase-polymerase interface. *PLoS Pathog*, **9**: e1003549.
- LÜHKEN R, KELLER M, CADAR D, GRINTEN E VAN DER, MICHEL F, ALBRECHT K, EIDEN M, RINDER M, LACHMANN L, HÖPER D, VINA-RODRIGUEZ A, GAEDE W,

- POHL A, SCHMIDT-CHANASIT J, GROSCUP MH (2019). West Nile virus epizootic in Germany, 2018. *Antiviral Res*, **162**: 39–43.
- LVOV DK, BUTENKO AM, GROMASHEVSKY VL, KOVTUNOV AI, PRILIPOV AG, KINNEY R, SHCHELKANOV MY (2004). West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. In *Emergence and control of zoonotic viral encephalitides* (pp. 85-96). Springer, Vienna.
- MAES P, ALKHOVSKY SV, BÀO Y, BEER M, BIRKHEAD M, BRIESE T, BUCHMEIER MJ, CALISHER CH, CHARREL RN, CHOI R, CLEGG CS, DELWART E, DI SERIO F, DIGIARO M, DOLJA VV, DROSTEN C, DU J, EBIHARA H, ZIRKEL F, KUHN JH (2018). Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018. *Archives of virology*, **163**(8): 2295-2310.
- MAIA C, ALWASSOUF S, CRISTÓVÃO JM, AYHAN N, PEREIRA A, CHARREL RN, CAMPINO L (2017). Serological association between *Leishmania infantum* and sand fly fever Sicilian (but not Toscana) virus in sheltered dogs from southern Portugal. *Parasites and Vectors*, **10**: 1–7.
- MALKINSON M, BANET C (2002). The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa. In *Japanese Encephalitis and West Nile Viruses* (pp. 309-322). Springer, Berlin, Heidelberg.
- MATSUNO K, WEISEND C, KAJIHARA M, MATYSIAK C, WILLIAMSON BN, SIMUUNZA M, EBIHARA H (2015). Comprehensive molecular detection of tick-borne phleboviruses leads to the retrospective identification of taxonomically unassigned bunyaviruses and the discovery of a novel member of the genus phlebovirus. *J Virol*, **89**(1): 594-604.
- MCKENZIE V, GOULET N (2010). Bird community composition linked to human West Nile virus cases along the Colorado Front Range. *EcoHealth*, **7**: 439–447.
- MEHMET K, SIBEL G, ORHAN Y, NURI M, SIBEL Y, SIBEL H, METIN G (2016). Serological Investigation of West Nile Virus Infection in Domestic Horses and Donkeys in Turkey. *Pakistan Veterinary Journal*, **37**(1): 51-54.
- MENDOZA-MONTERO J, GÁMEZ-RUEDA MI, NAVARRO-MARÍ JM, DE LA ROSA-FRAILE M, OYONARTE-GÓMEZ S (1998). Infections due to sandfly fever virus serotype Toscana in Spain. *Clinical infectious diseases*, **27**(3): 434-436.
- MEULEN VKM, PENSAERT MB, NAUWYNCK HJ (2005). West Nile virus in the vertebrate world. *Archives of virology*, **150**(4): 637-657.
- MICHEL F, FISCHER D, EIDEN M, FAST C, REUSCHEL M, MÜLLER K, RINDER M, URBANIAK S, BRANDES F, SCHWEHN R, LÜHKEN R, GROSCUP M, ZIEGLER U (2018). West Nile Virus and Usutu Virus Monitoring of Wild Birds in Germany. *Int J Environ Res Public Health*, **15**: 171.
- MIDILLI K, GARGILI A, ERGONUL O, ELEVLI M, ERGIN S, TURAN N, SENGOZ G, OZTURK R, BAKAR M (2009). The first clinical case due to AP92 like strain of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus and a field survey. *BMC Infect. Dis*, **9**: 90.

- MILD M, SIMON M, ALBERT J, MIRAZIMI A (2010). Towards an understanding of the migration of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of general virology*, **91**(1): 199-207.
- MONACO F, ÇIZMECI Ş, POLCI A, PORTANTI O, BARUT F, DENİZ A, COSSEDDU GM, PIŞKIN C, SAVINI G (2016). West Nile virus lineage 2 circulation in Turkey. *Veterinaria italiana*, **51**(2): 77-81.
- MORA-RILLO M, DÍAZ-MENÉNDEZ M, CRESPILO-ANDUJAR C, ARRIBAS JR (2017). Autochthonous Crimean-Congo haemorrhagic fever in Spain: So much to learn. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **36**: 2018, doi:10.1016/j.eimc.2017.05.004.
- MOURYA DT, YADAV PD, SHETE AM, GURAV YK, RAUT CG, JADI RS, PAWAR SD, NICHOL ST, MISHRA AC (2012). Detection, isolation and confirmation of crimean-congo hemorrhagic fever virus in human, ticks and animals in Ahmadabad, India, 2010-2011. *PLoS Negl Trop Dis*, **6**: 2010–2011.
- MUKHOPADHYAY S, KUHN RJ, ROSSMANN, MG (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol*, **3**: 13–22.
- NASCI RS, KOMAR N, MARFIN AA, LUDWIG G V, KRAMER LD, DANIELS TJ, FALCO RC, CAMPBELL SR, BROOKES K, GOTTFRIED KL, BURKHALTER KL, ASPEN SE, KERST AJ, LANCIOTTI RS, MOORE CG (2002). Detection of West Nile virus-infected mosquitoes and seropositive juvenile birds in the vicinity of virus-positive dead birds. *Am J Trop Med Hyg* **67**: 492–496.
- NAVARRO-MARÍ JM, PALOP-BORRÁS B, PÉREZ-RUIZ M, SANBONMATSU-GÁMEZ S (2011). Serosurvey Study of Toscana Virus in Domestic Animals, Granada, Spain. *Vector-Borne Zoonotic Dis* **11**: 583–587.
- NEGREDO, A, DE LA CALLE-PRIETO, F, PALENCIA-HERREJÓN, E, MORA-RILLO, M, ASTRAY-MOCHALES, J, SÁNCHEZ-SECO, M. P, LOPEZ EB, MENARGUEZ, J, FERNANDEZ-CRUZ, A, SANCHEZ-ARTOLA, B, DELGADO, E, ARELLANO, ER (2017). Autochthonous Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Spain. *New England Journal of Medicine*, **377**(2): 154-161.
- NEKLYUDOV, M (1952) A case of hemorrhagic fever (Crimea) (In English: NAMRU3-T1514). *Suvrem Med. Sof*, **5**:92e95.
- NICOLETTI L, RENZI A, CACIOLLI S, BARTOLOZZI D, BALDUCCI M, TRAINI E, LEONCINI F, BALDERESCHI M, PACI P, PADOVANI P, CIUFOLINI MG, VERANI P (1991). Central nervous system involvement during infection by Phlebovirus Toscana of residents in natural foci in central Italy (1977–1988). *Am J Trop Med Hyg*, **45**:429–34.
- NICZYPORUK JS, SAMOREK-SALAMONOWICZ E, KOZDRUŃ W, MIZAK Z (2011). The survey of wild birds for West Nile virus in Poland. *Pol J Vet Sci*, **14**: 573–577.
- NUTTALL PA, JONES LD, LABUDA M, KAUFMAN WR. (1994). Adaptations of arboviruses to ticks. *J. Med. Entomol*, **31**: 1-9.
- OIE (2018). Erişim Adresi: [www.oie.int](http://www.oie.int). WAHIS database. Erişim Tarihi: 26.12.2018

- OZKAYA E, DINCER E, CARHAN A, UYAR Y, ERTEK M, WHITEHOUSE CA, OZKUL A (2010). Molecular epidemiology of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus in Turkey: occurrence of local toptype. *Virus Res*, **149**: 64–70
- OZKUL A, YILDIRIM Y, PINAR D, AKCALI A, YILMAZ V, COLAK D (2006). Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey. *Epidemiology & Infection*, **134**(4): 826-829.
- OZKUL A, ERGUNAY K, KOYSUREN A, ALKAN F, ARSAVA EM, TEZCAN S, EMEKDAS G, HACIOGLU S, TURAN M, US D (2013). Concurrent occurrence of human and equine West Nile virus infections in Central Anatolia, Turkey: The first evidence for circulation of lineage 1 viruses. *Int J Infect Dis*, **17**: e546–e551.
- PALOMAR AM, PORTILLO A, SANTIBÁÑEZ P, MAZUELAS D, ARIZAGA J, CRESPO A, GUTIÉRREZ Ó, CUADRADO JF, OTEO JA (2013). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks from migratory birds, Morocco. *Emerg Infect Dis*, **19**: 260–263.
- PALOMAR AM, PORTILLO A, SANTIBÁÑEZ S, GARCÍA-ÁLVAREZ L, MUÑOZ-SANZ A, MÁRQUEZ FJ, OTEO JA (2017). Molecular (ticks) and serological (humans) study of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in the Iberian Peninsula, 2013–2015. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, **35**(6): 344-347.
- PANAYOTOVA E, PAPA A, TRIFONOVA I, CHRISTOVA I (2016). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus lineages Europe 1 and Europe 2 in Bulgarian ticks. *Ticks Tick Borne Dis*, **7**: 1024-1028.
- PAPA A, DANIS K, BAKA A, BAKAS A, DOUGAS G, LYTRAS T, THEOCHAROPOULOS G, CHRYSAGIS D, VASSILIADOU E, KAMARIA F, LIONA A, MELLOU K, SAROGLU G, PANAGIOTOPOULOS T (2010). Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July-August 2010. *Euro Surveill*, **15** (34): 19644.
- PAPA A, KONTANA A, TSENGOULI K (2015). Phlebovirus infections in Greece. *J Med Virol*, **87**: 1072–1076.
- PAUL, L.M.; CARLIN, E.R.; JENKINS, M.M.; TAN, A.L.; BARCELLONA, C.M.; NICHOLSON, C.O.; MICHAEL, S.F.; ISERN, S (2016). Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. *Clin. Transl. Immunol.* **5**, e117
- PETTERSSON JH, FIZ-PALACIOS O (2014). Dating the origin of the genus Flavivirus in the light of Beringian biogeography. *J. Gen. Virol*, **95**: 1969-1982.
- PEYREFITTE CN, DEVETAKOV I, PASTORINO B, VILLENEUVE L, BESSAUD M, STOLIDI P, DURAND F (2005). Toscana virus and acute meningitis, France. *Emerg. Infect. Dis*, **11**(5): 778.
- PFEFFER M, DOBLER G (2010). Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasites & vectors*, **3**(1): 35.
- POWERS AM, BRAULT AC, TESH RB, WEAVER SC (2000). Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *Journal of General Virology*, **81**(2): 471-479.

- PUNDA-POLIC V, MOHAR B, DUH D, BRADARIC N, KORVA M, FAJS L, SAKSIDA A, AVSIC-ZUPANC T (2012). Evidence of an autochthonous Toscana virus strain in Croatia. *J. Clin. Virol.* **55**, 4–7.
- RADDA A (1971). Antibodies against group A and B Arboviruses in domestic animals from Turkey. *EU Tip Fak Mec*, **10**:227-229.
- RAMBAUT A (2009). FigTree version 1.4 [bilgisayar programı] <http://tree.bio.ed.ac.uk>
- RAPPOLE JH, Hubalek Z (2003). Migratory birds and West Nile virus. *J Appl Microbiol* **94**: 47S-58S.
- REED KD, MEECE JK, HENKEL JS, SHUKLA SK (2003). Birds, migration and emerging zoonoses: West Nile virus, Lyme disease, influenza A and enteropathogens. *Clin. Med. Res*, **1** (1): 5-12.
- REISEN WK (2017). Chapter 2: Epidemiology. In *Arthropod Borne Diseases*, Ed.: Marcondes C.B. Switzerland, p:7-34.
- RIJKS JM, KIK ML, SLATERUS R, FOPPEN RPB, STROO A, IJZER J, GRÖNE A, KOOPMANS M, VAN DER JEUGD H, REUSKEN C (2016). Widespread Usutu virus outbreak in birds in the Netherlands. *Eurosurveillance*, **21**(45).
- RODHAIN F, PETTER JJ, ALBIGNAC R, COULANGES P, HANNOUN C (1985). Arboviruses and lemurs in Madagascar: experimental infection of Lemur fulvus with yellow fever and West Nile viruses. *The Am J Trop Med Hyg.*, **34** (4): 816-822.
- ROMERO-BREY I, BARTENSCHLAGER R (2016). Endoplasmic reticulum: the favorite intracellular niche for viral replication and assembly. *Viruses*, **8**: E160.
- RONQUIST F, HUELSENBECK JP (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**: 1572-1574.
- RUIZ M, CHAVES L, HAMER G, SU T, BROWN W, WALKER E, HARAMIS L, GOLDBERG T, KITRON U (2010). Local impact of temperature and precipitation on West Nile virus infection in Culex species mosquitoes in northeast Illinois, USA. *Parasit Vectors*, **3**: 19.
- SANCHEZ-SECO MP, ECHEVARRÍA JM, HERNÁNDEZ L, ESTÉVEZ D, NAVARRO-MARÍ JM, TENORIO A (2003). Detection and identification of Toscana and other phleboviruses by RT-nested-PCR assays with degenerated primers. *Journal of medical virology*, **71**(1): 140-149.
- SCHERRET JH, POIDINGER M, MACKENZIE JS, BROOM AK, DEUBEL V, LIPKIN WI, HALL RA (2001). The relationships between West Nile and Kunjin viruses. *Emerg Infect Dis*, **7**(4), 697.
- SCHMALJOHANN H, LIECHTI F, BRUDERER B (2007). Songbird migration across the Sahara: the non-stop hypothesis rejected!. *Proc Biol Sci*, **274**:735-9.
- SCHMALJOHN CS, NICHOL ST (2007). Bunyaviridae. In: Knipe, D.M, Howley, P.M.(Eds.), *Fields Virology*. 5th edition. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 1741-1789.

- SCREATON G, MONGKOLSAPAYA J, YACOUB S, ROBERTS C (2015). New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nat. Rev. Immunol*, **15**: 745-759
- SEIDOWSKI D, ZIEGLER U, VON RÖNN JAC, MÜLLER K, HÜPPOP K, MÜLLER T, FREULING C, MÜHLE R-U, NOWOTNY N, ULRICH RG, NIEDRIG M, GROSCHUP MH (2010). West Nile Virus Monitoring of Migratory and Resident Birds in Germany. *Vector-Borne Zoonotic Dis*, **10**: 639-647.
- SERTER D (1980). Present status of arbovirus seroepidemiology in the Aegean region of Turkey. *Zbl Bakt*, **S9**:155-161.
- SHEPHERD AJ, SWANEPOEL R, LEMAN PA, SHEPHERD SP (1987). Field and laboratory investigation of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus (Nairovirus, family Bunyaviridae) infection in birds. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **81**(6): 1004-1007.
- SHEPHERD AJ, SWANEPOEL R, CORNEL AJ, MATHEE O (1989). Experimental studies on the replication and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in some African tick species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**: 326–331.
- SHEPHERD, A.J, SWANEPOEL, R, SHEPHERD, S.P, LEMAN, P.A, MATHEE, O, (1991). Viraemic transmission of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus to ticks. *Epidemiol. Infect.* **106**: 373–382.
- SHERIFI K, CADAR D, MUJI S, ROBAJ A, AHMETI S, JAKUPI X, EMMERICH P, KRÜGER A (2014). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Clades V and VI (Europe 1 and 2) in Ticks in Kosovo, 2012. *PLoS Negl Trop Dis* **8**(9): e3168
- SHERIFI K, REXHEPI A, ROBAJ A, HAMIDI A, BEHLULI B, MUSLIU A, EMMERICH P (2016). A Survey of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Livestock in Republic of Kosova. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, **22**(2).
- SIMONS JF, HELLMAN U, PETTERSSON RF (1990). Uukuniemi virus S RNA segment: ambisense coding strategy, packaging of complementary strands into virions, and homology to members of the genus Phlebovirus. *J. Virol*, **64**: 247–255.
- SMITHBURN KC, HUGHES TP, BURKE AW, PAUL JH (1940). A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg*, **20**: 471–492.
- SPENGLER JR, BERGERON E, ROLLIN PE (2016). Seroepidemiological studies of crimean-Congo hemorrhagic fever virus in domestic and wild animals. *PLoS Negl Trop Dis*, **10** (1): e0004210.
- STAMATAKIS, A (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, **30**(9): 1312-1313.
- STEELE KE, LINN MJ, SCHOEPP RJ, KOMAR N, GEISBERT TW, MANDUCA RM, SMITH J (2000). Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York. *Veterinary Pathology*, **37**(3), 208-224.
- SUREAU P, KLEIN JM (1980). Arboviruses in Iran (author's transl). *Med. Trop. (Mars)*, **40**: 549-554.



- SWANEPOEL R, LEMAN PA, BURT FJ, JARDINE J, VERWOERD DJ, CAPUA I, BRUCKNER GK, BURGER WP (1998). Experimental infection of ostriches with Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *Epidemiol Infect*, **121**: 427–432.
- SWEET BH, SABIN AB (1954). Properties and antigenic relationships of hemagglutinins associated with the dengue viruses. *J. Immunol*, **73**: 363–373.
- TAMBA M, BONILAUDI P, BELLINI R, CALZOLARI M, ALBIERI A, SAMBRI V, DOTTORI M, ANGELINI P (2011). Detection of Usutu virus within a West Nile virus surveillance program in Northern Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **11**(5): 551-557.
- TATEM AJ (2009). The worldwide airline network and the dispersal of exotic species: 2007–2010. *Ecography*, **32**: 94–102.
- TELMADARRAIY Z, GHIASI SM, MORADI M, VATANDOOST H, ESHRAGHIAN MR, FAGHIHI F, ZAREI Z, HAERI A, CHINIKAR S (2010). A survey of Crimean-Congo haemorrhagic fever in livestock and ticks in Ardabil Province, Iran during 2004-2005. *Scand J Infect Dis*, **42**: 137–141.
- TESH RB, SAIDI S, GAJDAMOVIC SJ, RODHAIN F, VESENJAK-HIRJAN J (1976). Serological studies on the epidemiology of sandfly fever in the Old World. *Bulletin of the World Health Organization*, **54**: 663-74.
- TESH RB, PAPAEVANGELOU G (1977). Effect of insecticide spraying for malaria control on the incidence of sandfly fever in Athens, Greece. *Am J Trop Med Hyg*. **26**(1): 163-6.
- TESH RB, DUBOISE SM (1987). Viremia and immune response with sequential phlebovirus infections. *Am J Trop Med Hyg*, **36**: 662-8.
- THIRION L, BICHAUD L, SOURIS M, MARY C, PIARROUX R, LAMBALLERIE X De (2011). Epidemiologic Relationship between Toscana Virus Infection and Leishmania infantum Due to Common Exposure to Phlebotomus perniciosus Sandfly Vector. *PLoS neglected tropical diseases*, **5**(9): e1328.
- TONBAK S, AKTAS M, ALTAY K, AZKUR AK, KALKAN A, BOLAT Y, DUMANLI N, OZDARENDELI A (2006). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: Genetic analysis and tick survey in Turkey. *J Clin Microbiol* **44**: 4120–4124.
- TUNCER P, YESILBAG K, ALPAY G, DINCER E, GIRISGIN AO (2014). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever infection in domestic animals in Marmara region, Western Turkey. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, **61**(19): 49-53.
- TURAN T, İŞİDAN H, İREHAN B, ATASOY MO (2017). Doğu Anadolu Bölgesi'nde Bazı Memeli Türlerinde Batı Nil Virüs Enfeksiyonunun Seroepidemiolojik Olarak İncelenmesi. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, **7**(1).
- TURELL MJ (2007). Role of ticks in the transmission of Crimean Congo hemorrhagic fever virus. In: Ergonul OW, Whitehouse CA, editors. *Crimean Congo hemorrhagic fever: a global perspective*, vol **1**. Dordrecht, The Netherlands: Springer;. p. 144e54.

- TURELL MJ, O'GUINN ML, DOHM DJ, JONES JW (2001a). Vector competence of North American mosquitoes (Diptera: Calicidae) for West Nile virus. *J Med Entomol* **38**: 130-133.
- TURELL MJ, SARDELIS MR, O'GUINN ML (2001b). Potential vectors of West Nile virus in North America. *Current Topics Microbiol Immunol*, **267**:241- 252.
- VALASSINA M, VALENTINI M, PUGLIESE A, VALENSIN PE, CUSI MG (2003). Serological survey of Toscana virus infections in a high-risk population in Italy. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**: 483-484.
- VALIAKOS G, TOULOUDI A, IACOVAKIS C, ATHANASIOU L, BIRTSAS P, SPYROU V, BILLINIS C (2011). Molecular detection and phylogenetic analysis of West Nile virus lineage 2 in sedentary wild birds (Eurasian magpie), Greece, 2010. *Eurosurveillance* **16**: 3-6.
- VAZQUEZ A, SANCHEZ-SECO MP, RUIZ S(2010). Putative new lineage of West Nile virus, Spain. *Emerg Infect Dis*, **16**,3:549-552.
- VAZQUEZ A, SÁNCHEZ-SECO MP, PALACIOS G, MOLERO F, REYES N, RUIZ S, FIGUEROLA J (2012). Novel flaviviruses detected in different species of mosquitoes in Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **12**(3): 223-229.
- VERANI P, CIUFOLINI MG, NICOLETTI L, BALDUCCI M, SABATINELLI G, COLUZZI M, (1982). Ecological and epidemiological studies of Toscana virus, an arbovirus isolated from *Phlebotomus*. *Ann Inst Super Sanita*, **18**: 397-9.
- VERANI P, CIUFOLINI MG, CACIOLLI S, RENZI A, NICOLETTI L, SABATINELLI G (1988). Ecology of viruses isolated from sand flies in Italy and characterized of a new Phlebovirus (Arbia virus). *Am J Trop Med Hyg*, **38**: 433-9.
- WALTER CT, BARR JN (2011). Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *J. Gen. Virol.* **92**: 2467-2484.
- WANG Y, DUTTA S, KARLBERG H, DEVIGNOT S, WEBER F, HAO Q, KOTAKA M (2012). Structure of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein: superhelical homooligomers and the role of caspase-3 cleavage. *J Virol*, **86**(22): 12294-12303.
- WEAVER SC (2006). Evolutionary influences in arboviral disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, **299**:285-314.
- WEAVER SC, BARRETT AD (2004). Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature Reviews Microbiology*, **2**(10): 789.
- WEBSTER JL, STAPLEFORD KA (2017). Arbovirus adaptation: roles in transmission and emergence. *Current Clinical Microbiology Reports*, **4**(3): 159-166.
- WEISSENBOCK H, BAKONYI T, ROSSI G, MANI P, NOWOTNY N ( 2013). Usutu virus Italy, 1996. *Emerg. Infect. Dis.* **19**: 274-277.
- WELSCH S, MILLER S, ROMERO-BREY I, MERZ A, BLECK CK, WALTHER P, FULLER SD, ANTONY C, KRIJNSE-LOCKER J, BARTENSCHLAGER R (2009). Composition and three-

dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* **5**: 365–375.

WESTAWAY EG, BRINTON M.A, GAIDAMOVICH S, HORZINEK MC, IGARASHI A, KAARIAINEN L, LVOV DK, PORTERFIELD JS, RUSSELL PK, TRENT DW (1985). Flaviviridae. *Intervirology*, **24**: 183–192.

WHEELER SS, LANGEVIN SA, BRAULT AC, WOODS L, CARROLL BD & REISEN WK (2012). Detection of persistent West Nile virus RNA in experimentally and naturally infected avian hosts. *Am J Trop Med Hyg* **87**: 559–564.

WODAK E, RICHTER S, BAGÓ Z, REVILLA-FERNÁNDEZ S, WEISSENBOCK H, NOWOTNY N, WINTER P (2011). Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009. *Veterinary microbiology*, **149**(3-4): 358-366.

YEN YC, KONG LX, LEE L, ZHANG YQ, LI F, CAI BJ, GAO SY (1985). Characteristics of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus (Xinjiang strain) in China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**: 1179–1182.

YESILBAG, K, AYDIN, L, DINCER, E, ALPAY, G, GIRISGIN, A. O, TUNCER, P, OZKUL, A. (2013). Tick survey and detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in tick species from a non-endemic area, South Marmara region, Turkey. *Experimental and applied acarology*, **60**(2): 253-261.

ZEHENDER G, EBRANATI E, SHKJEZI R, PAPA A, LUZZAGO C, GABANELLI E, LO PRESTI A, LAI A, REZZA G, GALLI M, BINO S, CICCOCCHI M (2013). Bayesian phylogeography of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Europe. *PLoS One*, **8**: 1-9.

ZELLER HG, CORNET JP, CAMICAS JL (1994). Experimental transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by west African wild ground-feeding birds to *Hyalomma marginatum rufipes* ticks. *Am J Trop Med Hyg*, **50**:676–81.

ZELLER HG, CORNET JP, DIOP A, CAMICAS JL (1997). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Ticks (Acari: Ixodidae). and Ruminants: Field Observations of an Epizootic in Bandia, Senegal (1989-1992). *J Med Entomol*, **34**: 511–516.

ZGURSKAYA GN, BEREZIN V, SMIRNOVA S, CHUMAKOV M (1971). Investigation of the question of Crimean hemorrhagic fever virus transmission and interepidemic survival in the tick *Hyalomma plumbeum plumbeum* Panzer (In English: NAMRU3-T911). In: Chumakov, M. (Ed.), *Viral Hemorrhagic Fevers Crime Hemorrhagic Fever, Omsk Hemorrhagic Fever, Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome*, **19 Tr Inst Polio Virus Entsef Akad Med Nauk SSSP**, pp. 217e220

ZHANG B, DONG H, ZHOU Y, SHI PY (2008). Genetic interactions among the West Nile virus methyltransferase, the RNA-dependent RNA polymerase, and the 5' stem-loop of genomic RNA. *J. Virol.* **82**: 7047–7058.

ZIEGLER U, JÖST H, MÜLLER K, FISCHER D, RINDER M, TIETZE DT, DANNER K, BECKER N, SKUBALLA J, HAMANN H, BOSCH S, FAST C, EIDEN M, SCHMIDT-CHANASIT J, GROSCHUP MH (2015). Epidemic spread of Usutu virus in southwest Germany in 2011 to

2013 and monitoring of wild birds for Usutu and West Nile viruses. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **15**(8): 481-488.

ZIMINA YV, BIRULYA N, BEREZIN V, ZALUTSKAYA L, POVALISHINA TP, STOLBOV D, (1965). Materials on Zoologico-Parasitologic Characteristics of Crimean Hemorrhagic Fever in Astrakhan Oblast (In English: NAMRU3eT197), pp. 288e295. *Sborn Tr. Inst. Polio Virus, Encef. Akad. Med. Nauk. USSR*, Med. Mosc



## EKLER

### Ek-1 Etik Kurul Kararı



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

**TOPLANTI TARİHİ** : 10/02/2016  
**TOPLANTI NO** : 2016-3  
**DOSYA NO** : 2016-19  
**KARAR NO** : 2016-3-22

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Aykut Özkul'un yaptığı ve araştırmacı olarak Uzm.Vet.Hek.Sabri Hacıoğlu'nun katıldığı "Samsun ve Hatay illerindeki Göçmen Kuşlarda Önemli Bazı Viral Zoonozların Araştırması" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılması oy birliğiyle karar verilmiştir.



Hayvan Türü : Yabani Kuş Türleri  
Hayvan Sayısı : 100  
Geçerlilik Süresi : 01/04/2016-01/04/2017

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

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA Tel: 0 (312) 212 60 40 / 2064 Faks: 0 (312) 212 60 49

	Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı			
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Fatma Aysun ÇOSKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	

Ek-2 Bakanlık İzini



**T.C.**  
**ORMAN VE SU İŞLERİ BAKANLIĞI**  
**Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü**

**Sayı :** 72784983-488.04-86035  
**Konu:** Araştırma İzinleri

20.04.2016

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE**  
**(Veteriner Fakültesi Dekanlığı)**  
**ANKARA**

**İlgi :** ANKARA ÜNİVERSİTESİ'NİN 25.03.2016 tarihli ve 2777 sayılı yazısı

Üniversiteniz Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Aykut ÖZKUL tarafından yürütülecek olan "Samsun ve Hatay İllerindeki Göçmen Kuşlarda Önemli Bazı Zooteknik Virüslerin Araştırılması" başlıklı proje kapsamında araştırmacı personelin yürütmesi planlanan arazi çalışmaları ile ilgili Bilimsel Araştırma İzin Başvurusu Genel Müdürlüğümüz yetki ve sorumlulukları çerçevesinde incelenmiş olup, buna göre;

- Çalışmaların sahada bulunan flora, fauna, doğal ve kültürel değerlerin yanı sıra ekosistem bütünlüğüne de zarar vermeyecek şekilde yapılması,
- Arazi çalışması öncesinde ve arazide yapılacak her türlü çalışma ile ilgili Orman ve Su İşleri Bakanlığının ilgili İl Şube Müdürlüklerine bilgi verilmesi, korunan alanlarda yapılacak çalışmalarda mihmandar bulundurulması
- Arazi çalışmalarının yapılacağı yerin il merkezlerinde Valiliğe, ilçelerde ise Kaymakamlığa bilgi verilmesi,
- Çalışmalar kapsamında toplanacak örneklerde temsil edici yeterlilikte miktarın aşılması ve bu örneklerin Genel Müdürlüğümüz onayı alınmadan yurtdışına çıkarılmaması,
- Araştırma ara ve sonuç raporlarının basılı ve dijital ortamda birer kopyasının Genel Müdürlüğümüze ve ilgili Bölge Müdürlüklerine gönderilmesi,

koşuluyla bahse konu çalışmaların yapılması Genel Müdürlüğümüzce uygun görülmüş olup, izin belgesi ekte gönderilmektedir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

**Mustafa AKINCIOĞLU**  
**Bakan a.**  
**Genel Müdür Yardımcısı**

**EKLER :**  
1- Bir Takım Araştırma İzni

**DAĞITIM :**  
Gereği:  
Ankara Üniversitesi Rektörlüğüne

**Bilgi:**  
XI. Bölge Müdürlüğü  
VII. Bölge Müdürlüğü

Güvenli Elektronik İmza  
Aslı ile Aynıdır  
Mine KÖKDEMİR  
Büro Personeli

**Bu evrak 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu'na göre elektronik olarak imzalanmıştır.**  
**Evrak doğrulama adresi: <http://ebys.ormansu.gov.tr/Dogrulama.aspx?d=eYSI>**

---

Adres : Alparslan Türkeş Cad. No 71 Beştepe 06560 Yenimahalle - ANKARA  
Telefon : 03122075594  
e-posta : ydagasan@cob.gov.tr

Ayrıntılı Bilgi : Yakup DAĞAŞAN Uzman  
Fax :  
Elektronik Ağ : [www.ormansu.gov.tr](http://www.ormansu.gov.tr)

## ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

Adı: Sabri

Soyadı: HACIOĞLU

Doğum yeri ve tarihi: Kırcaali, 03.12.1985

Uyruğu. T.C.

Medeni durumu: Evli

Askerlik durumu: Yaptı

İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji

Anabilim Dalı, 0312 3170315

### II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden-eskiye doğru)

2009-2011 Yüksek Lisans, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji

Anabilim Dalı

2004-2009 Lisans, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

2000-2004 İzmir Kız Lisesi

Yabancı dili: İngilizce

### III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden-yeniye doğru)

2011 Uzman Veteriner Hekim

2009 Veteriner Hekim

#### IV- Mesleki Deneyimi

2016- Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Virolojik Teşhis Lab.

2013-2016 Çankırı Kızılırmak İlçe Tarım Orman Müdürlüğü

2011-2012 Türk Silahlı Kuvvetleri Gemlik Gıda Kontrol Araştırma Merkezi

#### VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

AKINER MM, ÖZTÜRK M, BAŞER AB, GÜNAY F, HACIOĞLU S, BRINKMANN A, EMANET N, ALTEN B, ÖZKUL A, NITSCHKE A, LINTON YM, ERGÜNAY K (2019). Arboviral screening of invasive Aedes species in northeastern Turkey: West Nile virus circulation and detection of insect-only viruses. *PLoS neglected tropical diseases*, **13**(5), e0007334.

BRINKMANN A, DİNÇER E, POLAT C, HEKİMOĞLU O, HACIOĞLU S, FÖLDES K, ÖZKUL A, ÖKTEM İBA, NITSCHKE A, ERGÜNAY K. (2018). A metagenomic survey identifies Tamdy orthonairovirus as well as divergent phlebo-, rhabdo-, chu- and flavi-like viruses in Anatolia, Turkey. *Ticks and tick-borne diseases*, **9**(5), 1173-1183

YAZICI Z, TAMER C, GUMUSOVA S, OZAN E, HACIOĞLU S, ÖZKUL A, ALBAYRAK H (2018). Serological Signs of West Nile Virus Infection in Horse Serum Samples Collected for Equine Infectious Anemia Virus screening in the Northeastern Turkey: Traces of Past. *Pak Vet J.* 10.29261/pakvetj/2018.083

ÇİZMECİ Ş, HACIOĞLU S, AŞKAROĞLU HH, GÜNAY B, ERTÜRK A, AKSOY E, GÜLYAZ V, ORUÇ E (2018) Egzotik Hayvan Hastalıkları El Kitabı, Tarım ve Orman Bakanlığı



DİNÇER E, BRİNKMANN A, HEKİMOĞLU O, HACIOĞLU S, FÖLDES K, KARAPINAR Z, POLAT PF, OĞUZ B, ORUNÇ KILINÇ Ö, HAGEDORN P, ÖZER N, ÖZKUL A, NITSCHKE A, ERGÜNAY K (2017). Generic amplification and next generation sequencing reveal Crimean-Congo hemorrhagic fever virus AP92-like strain and distinct tick phleboviruses in Anatolia, Turkey. *Parasites & vectors*, **10**(1), 335.

HACIOĞLU S, DİNÇER E, ISLER CT, KARAPINAR Z, ATASEVEN VS, ÖZKUL A, ERGUNAY K (2017). A snapshot avian surveillance reveals West Nile virus and evidence of wild birds participating in Toscana virus circulation. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **17**(10), 698-708.

HACIOĞLU S, ÖZKUL A. (2017). Türkiye'de Koyunlarda Görülen Endemik Bazı Virus Enfeksiyonları. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences-Internal Medicine-Special Topics*, **3**(1), 24-29.

ERGUNAY K, KARAGUL A, ABUDALAL A, HACIOĞLU S, US D, ERDEM Y, ÖZKUL A (2015). Prospective investigation of the impact of West Nile Virus infections in renal diseases. *Journal of medical virology*, **87**(10), 1625-1632.

ÖZKUL A, ERGUNAY K, KOYSUREN A, ALKAN F, ARSAVA E. M, TEZCAN S, EMEKDAS G, HACIOĞLU S, TURAN M, US D. (2013). Concurrent occurrence of human and equine West Nile virus infections in Central Anatolia, Turkey: the first evidence for circulation of lineage 1 viruses. *International Journal of Infectious Diseases*, **17**(7), e546-e551.

ERGUNAY K, AYDOĞAN S, İLHAMİ ÖZCEBE O, ÇİLEK EE, HACIOĞLU S, KARAKAYA J, ÖZKUL A, US D. (2012). Toscana virus (TOSV) exposure is confirmed in blood donors from Central, North and South/Southeast Anatolia, Turkey. *Zoonoses and public health*, **59**(2), 148-154.

## **Bildiriler**

DİNÇER E, HEKİMOĞLU O, HACIOĞLU S, FÖLDES K, KARAPINAR Z, POLAT PF, OĞUZ B., KILINÇ ÖÖ, ÖZKUL A, ERGÜNAY K (2017). Detection of AP92-related CCHFV strains in field-collected ticks from Mediterranean and Eastern Anatolia. 2nd International Conference on Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Selanik,2017, Sözlü Sunum

HACIOĞLU S, OZAN E, ERGUNAY K, ÖZKUL A (2017). Role of wild birds and domestic ruminants in local CCHFV epidemiology in Turkey, 2nd International Conference on Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Selanik,2017, Sözlü Sunum

HEKİMOĞLU O, DİNÇER E, HACIOĞLU S, FOLDES K, POLAT PF, OZER N, OZKUL A, ERGUNAY K (2017) A cross-sectional surveillance reveal tick phleboviruses in Mediterranean Anatolia, Turkey. One Health 9th Tick and Tick-borne Pathogen Conference & 1st Asia Pacific Rickettsia Conference, Australia, 2017, Poster,

AKKUTAY YOLDAR Z, HACIOĞLU S, TEZCAN ÜLGER S (2017) Serological Investigation of WNV Infection Among Purebred Arabian Race Horses in Turkey, ICAVST, Makedonya, 2017, Sözlü Sunum

HACIOĞLU S, CIZMECI SG, DUYUM A, UZAR M, KARAYEL HACIOĞLU I (2017) Investigation of Some Agents Causing Diarrhea in Ruminants in Mid-Anatolia, ICAVST, Makedonya 2017, Poster

HACIOĞLU S, MOHAMMED ALI H, AKYOL A, YILMAZ E, ERGUNAY K, ÖZKUL A (2015). Perinatal West Nile Virus Infection in a Foal in Turkey; ESVV 2015, Poster

HACIOĞLU S, DINCER E, ERGÜNAY K, ÖZKUL A (2016). Evidence of wild birds participating in Toscana virus dissemination and perpetuation, European Congress of Virology, 2016, Poster

## **VII- Bilimsel Etkinlikleri**

### **Ödüller**

The European Society for Veterinary Virology, Young Researcher Travel Grant, 2016

### **Projeleri**

Vektör Kaynaklı Viral Hayvan Hastalıklarının Tespiti, Araştırılması ve Erken Uyarı Sisteminin Oluşturulması, Yardımcı Araştırmacı, TAGEM 2016-

## **VIII- Diğer Bilgiler**

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve Katıldığı eğitim seminerleri

The Pirbright Institute, PPRV Training Course, 08-17 Nisan 2019.

Akreditasyon ve TS EN ISO/IEC 17025:2012 ve TS EN ISO/IEC 17025:2017 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği için Genel Şartlar Standardı Eğitimi- TÜRKAĞ, 22-24.10.2018

