

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANKARA BÖLGESİNDE BATI NİL VİRUSU VE
TOSKANA VİRUS VEKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bio. Serra ÖRSTEN

Mikrobiyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2013

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANKARA BÖLGESİNDE BATI NİL VİRUSU VE TOSKANA
VİRUS VEKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bio. Serra ÖRSTEN

Mikrobiyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ






TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Koray ERGÜNAY

ANKARA
2013

Anabilim Dalı :Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
 Program :Mikrobiyoloji
 Tez Başlığı :Ankara Bölgesinde Batı Nil Virus ve Toskana Virus
 Vektörlerinin Araştırılması

Öğrenci Adı-Soyadı :Serra Örsten
 Savunma Sınavı Tarihi :28.06.2013

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Cumhuri Özkuyumcu (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi)	
Tez danışmanı:	Doç. Dr. Koray Ergünay (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi)	
Üye:	Prof. Dr. Dürdal Üs (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi)	
Üye:	Prof. Dr. Ahmet Pınar (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi)	
Üye:	Prof. Dr. Salih Bülent Alten (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi)	

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.


 Prof. Dr. Ersin FADILLOĞLU
 Müdür

TEŞEKKÜR

Eğitimimin ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle bana destek olan tez danışmanım Doç.Dr. Koray Ergünay'a,

Tez çalışması için örneklerin sağlanmasında her türlü imkanı sunan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Prof.Dr. Bülent Alten, Uzm.Dr. Özge Erişöz Kasap ve Araş.Gör. Filiz Günay'a,

Eğitimim süresince, bilgi ve desteğini hiç esirgemeyen Prof.Dr. Cumhuriyet Özkuyumcu'ya,

Tez çalışması süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyerek tezin gelişimine katkıda bulunan Prof.Dr. Aykut Özkul'a,

Çalışmamın her aşamasındaki katkılarından dolayı sevgili arkadaşım Araş.Gör.Dr. Murat Öcal ve teknisyen İrfan Atmaca'ya,

Eğitimim süresince dostluklarıyla bana destek olan asistan arkadaşlarım ve sevgili arkadaşım Duygu Deniz Kazancı'ya,

Bilgilerinden faydalandığım değerli hocalarıma,

Tecrübelerini, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen sevgili teyzem Prof.Dr. Sevinç Özkan Altınır ve sevgili ablam Yar.Doç.Dr.Seda Örsen Esirgen'e

Her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen sevgili anne ve babama teşekkür ederim.

ÖZET

ÖRSTEN S. Ankara Bölgesinde Batı Nil virusu ve Toskana virus vektörlerinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2013. Batı Nil virusu (BNV) ve Toskana virus (TOSV), duyarlı kişilerde ateşli hastalık ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonu etkeni olabilen viruslardır. Bu virüslerin insana bulaşması, vektör rolü oynayan sivrisinek ve kum sineklerinin kan emmesi yoluyla gerçekleşir. Ülkemiz, her iki virus için de endemik bölgede yer almaktadır ve vektör rolü oynayabilecek türlerin varlığı ortaya konulmuştur. Yapılan çalışmalar BNV ve TOSV'un Ankara ilinde aktivitesini göstermiştir. Bu çalışmada Ankara bölgesinde BNV ve TOSV için vektör özelliğine sahip sivrisinek ve kum sineklerinin araştırılması ve vektörlerde BNV ve TOSV saptanması amaçlanmıştır. Çalışma 2012 yılı Temmuz-Eylül aylarında yapılmış; 6 bölgede belirlenen 19 lokalitede standart örnekleme gerçekleştirilmiştir. Örneklerin işlenmesi standart yöntemlerle yapılmış; BNV antijenlerinin saptanması için ticari bir immünokromatografik test, BNV ve TOSV/phlebovirus nükleik asitlerinin saptanması için de "nested" PCR yöntemleri uygulanmıştır. Çalışma süresince toplanan 1006 örneğin %23.75'ini sivrisinekler, %76.25'ini kum sinekleri oluşturmuştur. Sivrisineklerde tür dağılımları %74.5 *C.pipiens*, %20.9 *An.maculipennis*, %2.1 *An.claviger*, %1.6 *Culiseta annulata* ve %1 *C.theileri* olarak izlenmiştir. Örnekleme tarihi, lokalite ve türlere göre oluşturulmuş 65 havuzda BNV antijen ve nükleik asit incelemeleri yapılmış ve negatif olarak saptanmıştır. Tür tayini yapılan 384 erkek kum sineği *P.papatasi* (%36.2), *P.halepensis* (%27.3), *P.major s.l.* (%19.3), *P.sergenti* (%8.9), *P.perfiliewi* (%4.4), *P.simici* (%2.6), *P.tobbi* (%0.8) ve *Sergentomyia* sp. (%0.6) olarak belirlenmiş; 383 dişi kumsineği örneğinde TOSV/phlebovirus nükleik asitleri bulunmamıştır. Araştırmada BNV ve TOSV vektörü olan türlerin varlığı saptanmış ancak virüslara yönelik çalışmalar negatif olarak izlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Batı Nil Virus, BNV, Toskana Virus, TOSV, sivrisinek, kumsineği, Ankara

ABSTRACT

Orsten S. Investigation of West Nile virus and Toscana virus Vectors in Ankara Region. Hacettepe University Institute of Health Sciences, MSc, thesis in Microbiology, Ankara, 2013. West Nile Virus (WNV) and Toscana virus (TOSV) may cause febrile diseases and central nervous system infections and even severe meningoencephalitis in susceptible individuals. Major transmission route is via blood sucking of infected mosquitoes/sandflies, acting as arthropod vectors. Turkey is located in the endemic region for these viruses and activity of sandfly/mosquito species with vector competence have been detected. The circulation of WNV and TOSV in Ankara province have also been previously reported. The aim of this study is to identify mosquito and sandfly species that may act as WNV and TOSV vectors in Ankara region and detection of viral infections in vector arthropods. Sampling was carried out during July-September 2012 in 19 localities in 6 regions. The specimens were processed via standard protocols and subjected to WNV antigen detection via a commercial immunochromatographic assay and WNV/TOSV/phlebovirus nucleic acid detection via nested PCR assays. A total of 1006 specimens were collected which include 23.75% mosquitoes and 76.25% sandflies. Species distribution in mosquitoes were observed as 74.5% *C.pipiens*, 20.9% *An.maculipennis*, 2.1% *An.claviger*, %1.6 *Culiseta annulata* and 1% *C.theileri*. Virus antigens and RNA could not be detected in 65 mosquito pools formed according to the species, date and sampling site. Species distribution in 384 male sandflies were noted as *P.papatasi* (36.2%), *P.halepensis* (27.3%), *P.major s.l.* (19.3%), *P.sergenti* (8.9%), *P.perfiliewi* (4.4%), *P.simici* (2.6%), *P.tobbi* (0.8%) and *Sergentomyia* sp. (0.6%). A total of 383 female sandflies evaluated individually for TOSV/phlebovirus RNA were negative. Although species established as WNV and TOSV vectors have been identified, infections were not detected in mosquitoes or sandflies in this study.

Key words: West Nile Virus, WNV, Toscana Virus, TOSV, mosquito, sandfly, Ankara

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Batı Nil Virusu	3
2.1.1 Tarihçe	3
2.1.2 Sınıflandırma	4
2.1.3 Virion Yapısı, Genom ve Replikasyon	6
2.1.4 Yaşam Döngüsü	7
2.1.5 Patogenez, Klinik Bulgular ve Tanı	9
2.1.6 Epidemiyoloji, Korunma ve Kontrol	11
2.1.7 Türkiye'deki Durum	13
2.2 Toskana virus ve Diğer Phleboviruslar	16
2.2.1 Tarihçe	16
2.2.2 Sınıflandırma	17
2.2.3 Virion Yapısı, Genom ve Replikasyon	18
2.2.4 Yaşam Döngüsü	20

2.2.5 Patogenez, Klinik Bulgular ve Tanı	21
2.2.6 Epidemiyoloji, Korunma ve Kontrol	23
2.2.7 Türkiye'deki Durum	25
3.GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1 Sivrisinek ve Kum Sineklerinin Örneklenmesi	29
3.2 Örneklerin Homojenizasyonu ve RNA Saflaştırılması	32
3.3 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	33
3.4 Sivrisinek Örneklerinde Batı Nil Virusu RNA'sının Araştırılması	34
3.5 Sivrisinek Örneklerinde Batı Nil Virusu Antijenlerinin Araştırılması	36
3.6 Kum sineği Örneklerinde Phlebovirus-Toskana Virus RNA'sının Araştırılması	37
4. BULGULAR	40
4.1 Toplanan Örneklerde Sayı ve Dağılım	40
4.2 Toplanan Sivrisinek Örneklerinde Virus İncelemeleri	46
4.3 Toplanan Kum Sineği Örneklerde Phlebovirus-TOSV İncelemeleri	48
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	63
7. KAYNAKLAR	66

SİMGE VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BNV	Batı Nil virusu
CDC	Centers for Disease Control
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ER	Endoplazmik Retikulum
JEV	Japon Ensefaliti virusu
IFA	Immunofluorescence assay
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
PCR	Polymerase chain reaction
PRNT	Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SFSV	Sandfly fever Sicilian Virus
SFNV	Sandfly fever Naples virus
SFTV	Sandfly fever Turkey virus

ŞEKİLLER

	SAYFA
Şekil 2.1 Batı Nil virusu kökenlerinin tüm genom dizilerinin filogenetik analizi	5
Şekil 2.2 Batı Nil virus genomu ve kodlanan yapısal ve yapısal olmayan proteinlerin şematik gösterimi	6
Şekil 2.3 Batı Nil virusunun doğadaki yaşam döngüsü	8
Şekil 2.4 Ülkemizde Batı Nil virusu seroaktivitesi saptanan iller	15
Şekil 2.5 Phlebovirus S segmenti nükleotid dizilimine göre filogenetik ilişkiler	18
Şekil 2.6 Phlebovirus virion yapısının şematik gösterimi	19
Şekil 2.7 TOSV'un doğadaki yaşam döngüsü	21
Şekil 2.8 Eski Dünyada TOSV ve diğer ateşli hastalık etkeni olan Phlebovirusların yaygınlığı	24
Şekil 2.9 Ülkemizde Phlebovirus aktivitesi saptanan iller	28
Şekil 3.1 Sivrisinek ve kum sineği örnekleme yapılan ilçe ve bölgeler	29
Şekil 3.2 Sivrisinek ve kum sineği örnekleme için ışık tuzaklarının yerleştirilmesi	31
Şekil 3.3 BNV PCR ikinci turu amplikonlarının agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi	36
Şekil 3.4 "VecTest" BNV ticari antijen saptama testinin uygulama şeması	37
Şekil 3.5 Pan-Phlebovirus PCR ikinci turu amplikonlarının agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi	39
Şekil 4.1 Örnekleme süresince toplanan sivrisinek ve kum sineği örneklerinin aylara göre dağılımı	40

Şekil 4.2 Örnekleme süresince toplanan sivrisineklerin bölgelere göre dağılımı	41
Şekil 4.3 Örnekleme süresince toplanan kum sineklerinin bölgelere göre dağılımı	42

TABLOLAR

	SAYFA
Tablo 2.1 Avrupa birliği ve bazı komşu lkelerde 1990-2010 yılları arası saptanan Batı Nil virusu aktivitesi	13
Tablo 3.1 Sivrisinek ve kum sineği örnekleme yapılan bölgeler ve zellikleri	30
Tablo 3.2 İki turlu BNV PCR için kullanılan primer dizileri ve viral genomdaki yerleşimleri	35
Tablo 3.3 İki turlu BNV PCR için karışım içeriği ve reaksiyon koşulları	35
Tablo 3.4 İki turlu Pan-Phlebovirus PCR için kullanılan primer dizileri ve viral genomdaki yerleşimleri	38
Tablo 3.5 Pan-Phlebovirus “nested PCR” karışım içeriği ve reaksiyon koşulları	38
Tablo 4.1 rnekleme bölgesine göre sivrisineklerin dağılımı	44
Tablo 4.2 rnekleme zamanına göre sivrisineklerin dağılımı	44
Tablo 4.3 Tür tayini yapılan erkek kum sineklerinin örnekleme bölgelerine göre dağılımı	45
Tablo 4.4 Tür tayini yapılan erkek kum sineklerinin örnekleme zamanına göre dağılımı	45
Tablo 4.5 rnekleme bölgeleri 1 ve 2 kaynaklı sivrisinek havuzları ve zellikleri	46
Tablo 4.6 rnekleme bölgesi 3 kaynaklı sivrisinek havuzu ve zellikleri	47
Tablo 4.7 rnekleme bölgesi 4, 5 ve 6 kaynaklı sivrisinek havuzları ve zellikleri	47

Tablo 4.8 Virus incelemesinde kullanılan dişi kum sineklerinin
örnekleme bölgelerine ve zamanına göre dağılımı

48

1. GİRİŞ

Günümüzde kan emen eklem bacaklı vektörlerle taşınan hastalıklar, yeniden ortaya çıkan enfeksiyonlar olarak tüm dünyada önemli halk sağlığı sorunları sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunların en önemlileri arasında yer alan ve arboviruslar tarafından oluşturulan hastalıklar; ayrıca sıtma, leishmaniasis gibi vektör organizmalarla taşınan diğer birçok hastalık, daha önce hiç görülmedikleri ülkelerde görülmeye başlamış ya da kontrol altında oldukları ülkelerde insidans artışı son yıllarda dikkat çekici düzeye gelmiştir.

Bu durum, global nüfus artışı, kontrolsüz şehirleşme gibi demografik faktörler; modern ulaşım, çeşitli sosyal değişiklikler; alan kullanımı, yeni sulama teknikleri gibi tarımsal aktiviteler; ormanların tahrip edilmesi, hastalık etkenlerinde oluşan genetik değişiklikler; taşıyıcı vektör türlerinin değişen dağılımları ve global iklim değişiklikleri gibi pek çok faktörle ilişkili görülmektedir. Böylece, önceden bölgesel ve "egzotik" olarak kabul edilen birçok virus; bunları taşıyan vektörler aracılığıyla yeni coğrafik alanlara girmekte, hatta epidemiler oluşturmaktadır.

Bu durumun dikkat çekici örnekleri arasında Batı Nil Virusu'nun 1999 yılında Yeni Dünya'ya geçerek hızla yayılması ve önemli sağlık ve çevre sorunları oluşturması; ayrıca önce vektör sivrisinek türü *Aedes albopictus*'un, ardından Chikungunya virusunun Güney Avrupa'da yerleşmesi sayılabilir. Ülkemizde ise ilk olguların tanımlandığı 2002 yılından bu yana klinik olgular saptanmaya devam eden, dramatik hastalık tablosu nedeniyle kamuoyunun da yoğun olarak ilgisini çekmiş olan Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virusu enfeksiyonları, vektör kaynaklı viral enfeksiyonların değişen epidemiyolojisi açısından önemli bir örnektir. Görüldüğü gibi benzer özellikler gösteren ve vektörleri ülkemizde yaygın olan diğer arboviral enfeksiyonlar konusunda bilimsel veri elde edilmesi, toplum sağlığı açısından bir zorunluluk olarak karşımıza çıkmaktadır.

Türkiye, coğrafi konumu, klimatolojik ve ekolojik özellikleri nedeniyle vektör kaynaklı birçok virus ve vektörlerinin yaşam döngülerini devam ettirebilecekleri uygun özellikler taşımakta, ayrıca klinik açıdan önemli birçok arboviral hastalık için endemik olarak kabul edilen bir bölgede bulunmaktadır. Buna karşın, vektörlerle bulaşan viral enfeksiyonlar konusunda ülkemiz kaynaklı veriler oldukça sınırlıdır.

Vektör kaynaklı hastalıkların belirli bir bölgede varlığı ve yayılımının saptanması, ayrıca potansiyel olarak bölgeye giriş yapabilecek diğer patojenlerin öngörülebilmesi ve gerekli korunma önlemlerinin zamanında alınabilmesi için, vektör rolü oynayan eklem bacaklı türleri ve dağılımı konusunda veri elde edilmesi kritik düzeyde önemlidir.

Bu çalışmada son yıllarda Ankara bölgesinde serosürveyans çalışmaları ve süregelen olgu bildirimleri ile aktivitesini sürdürdüğü bilinen Batı Nil virusu, Toskana virusu ve diğer phleboviruslar için vektör özelliği gösteren sivrisinek ve kum sineklerinin tanımlanması ve vektör türlerde ilgili virusların araştırılarak bazı genetik özelliklerinin saptanması amaçlanmıştır. Çalışmamız, Ankara bölgesinde konuyla ilgili en kapsamlı incelemedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Batı Nil Virusu

2.1.1 Tarihçe

Batı Nil virusu, ilk kez 1937 yılında Uganda'nın Batı Nil bölgesinde, ateşi olan bir kadın hastanın kanından izole edilmiştir (1). 1950'li yılların başında Akdeniz bölgesindeki çeşitli salgınlar sırasında, virusun epidemiyolojisi ve ekolojisi tanımlanmıştır (2). Kaydedilen ilk epidemi 1951 yılında İsrail'in Haifa kenti yakınlarında ortaya çıkmıştır (3). Salgın boyunca çeşitli klinik özellikleri ayrıntılı olarak ilk kez tanımlanmış ve temel özellikleri, ateş, baş ağrısı, miyalji, anoreksiya, abdominal ağrı ve kusma olarak belirlenmiştir. 1951 yılında başlayan kapsamlı bir BNV araştırması sonucunda, insanlardaki ve hayvanlardaki serosürveyansı ve vektör tanımlanması ile virusun epidemiyolojik ve klinik yönleri aydınlatılmıştır. 1957 yılında İsrail'deki bir salgın sırasında yaşlı hastalarda şiddetli nörolojik bulgulara neden olduğu saptanmıştır. Sonrasında 1962 yılında Fransa'da, 1974 yılında Güney Afrika'daki salgınlarda da menenjit veya ensefalit gelişen hastalar kaydedilmiştir (4,5). Yürütülen serosürveyans çalışmaları sonucunda çeşitli hayvanları enfekte edebildiği, özellikle BNV nötralizan antikörlerin kuşlarda yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir. 1960'lı yılların başında atlarda bulunduğu, semptomatik ve sıklıkla fatal seyrettiği saptanmıştır. 1990'lara gelindiğinde, nörolojik bulguların ön plana çıktığı Romanya (1996), Tunus (1997), İtalya (1998) ve İsrail (1998) salgınları bildirilmiştir (6). 1990'lı yılların ortalarına kadar Afrika, Asya, Orta Doğu ve Avrupa gibi doğu yarımküre (Eski Dünya) bölgelerinde benzer salgınlar ortaya çıkmıştır.

BNV'nun batı yarımküreye (Yeni Dünya) geçişi ilk kez 1999 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nin New York kentindeki salgın ile gerçekleşmiştir. 1999 yılı Ağustos ayının sonu itibariyle 59 hastada meningoensefalit ve flasid paralizi gelişimi raporlanmıştır. Aynı zaman diliminde

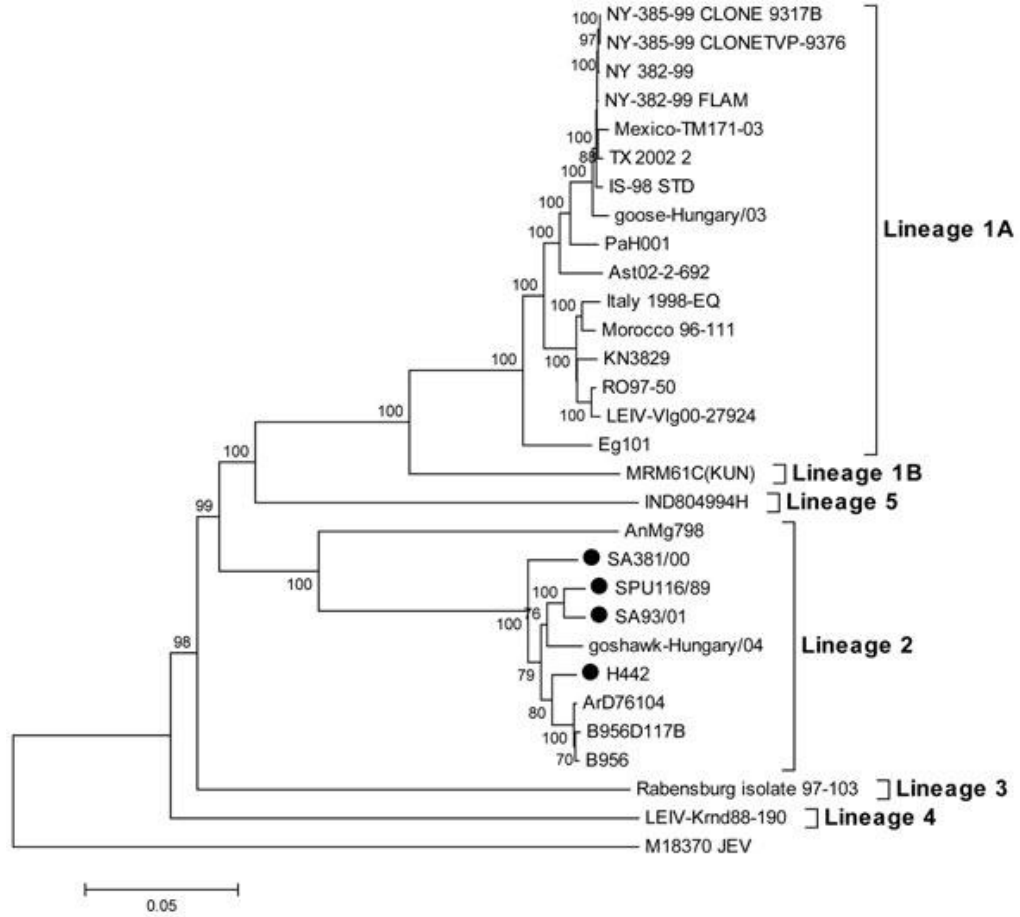
epizootik kuşlarda artan ölüm oranı dikkat çekmiş, analizler sonucu etken Batı Nil virusu olarak tanımlanmış ve eşzamanlı olarak İsrail'de ortaya çıkan virus suşuyla homolog olduğu gösterilmiştir (7). Batı Nil virusu, 2000-2002 yılları arasında ABD'de hızla yayılmış, 2.359 meningoensefalit olgusu ve 284 ölüm ile toplamda 4.156 BNV enfeksiyonu rapor edilmiştir. Bu, batı yarımkürede kaydedilen en büyük arboviral ensefalit salgını olmuştur (8). BNV günümüzde de Amerika kıtasında Kanada ve Güney Amerika'da yayılımını sürdürmektedir.

2.1.2 Sınıflandırma

Batı Nil virusu, *Flaviviridae* ailesi, *Flavivirus* cinsi, Japon ensefaliti virusu (JEV) serokompleksi içerisinde sınıflandırılan bir virustur. *Flaviviridae* ailesi içerisinde BNV'nun yanı sıra sarı humma, Dengue, kene ensefaliti gibi vektörle bulaşan birçok virus bulunmaktadır. Benzer olarak JEV serokompleksi içerisinde de BNV dışında Japon ensefaliti virusu (JEV), Alfuy virus (ALFV), Cacipacore virus (CPCV), Koutango virus (KOUV), St. Louis ensefaliti virusu (SLEV), Murray Valley ensefaliti virusu (MVEV), Usutu virus (USUV), Yaounde virus (YAOV) ve Kunjin virus yer almaktadır. Kunjin virus BNV'na antijenik ve genetik olarak benzerlik göstermesi sebebiyle 1999 yılında BNV'nun bir alt tipi olarak yeniden sınıflandırılmıştır (9).

Çeşitli kaynaklardan izole edilen BNV suşlarının dizi ve filogenetik analizleri, tüm dünyada izlenen 2 ana virus genotipi ("lineage", köken) olduğuna işaret etmektedir. Bunlardan genotip 1; Avrupa, Asya, Kuzey Afrika, Amerika kıtası ve Avustralya 'da saptanan izolatları (Kunjin virusu) kapsamaktadır. Genotip 1'de sınıflandırılan izolatların farklı subtipler/varyantlar halinde dağılım göstermesi (subtip A: çoğu Avrupa, Asya ve Amerika izolatu, subtip B: Kunjin virus, subtip C: Hindistan izolatları) dikkati çekmektedir. Genotip 2 ise klasik olarak Sahara altı Afrika ve Madagaskar'da bulunan izolatları içermektedir. Genotip 1'e bağlı semptomatik hastalık ve ölümlerin genotip 2'ye göre daha sıklıkla izlenmesi, bu genotipin virülansının daha yüksek olduğu yorumlarına yol açmıştır. Genotip 2 ise düşük virülans gösteren Afrika'ya özgül bir genotip olarak kabul edilmiştir (10-12). Ancak genotip 2 içinde sınıflandırılan izolatların

Çek Cumhuriyeti-Avusturya bölgesinde çeşitli kuş türlerinde saptanması ve yüksek patojen virusların varlığının gösterilmesi, her iki ana genotip içerisinde düşük ve yüksek patojen izolatların bulunduğu işaret etmektedir (13-16). BNV'nin tanımlanan 2 ana genotipine ek olarak, Avrupa ve Asya'da en az 5 farklı genotipin bulunduğu ortaya konulmuştur. En son İspanya'dan rapor edilen bu yeni genotiplerin virülansı ve insan patojeni olarak önemi henüz açıklanmış değildir (13,17-19). Ancak güncel çalışmalarda, Avrupa'da endemik bölgelerde farklı genotiplerin aynı anda dolaşımında olabileceği gösterilmiştir (13). Amerika kıtasında da yeni bir genotipin baskın olarak saptandığı bildirilmiştir (20,21).

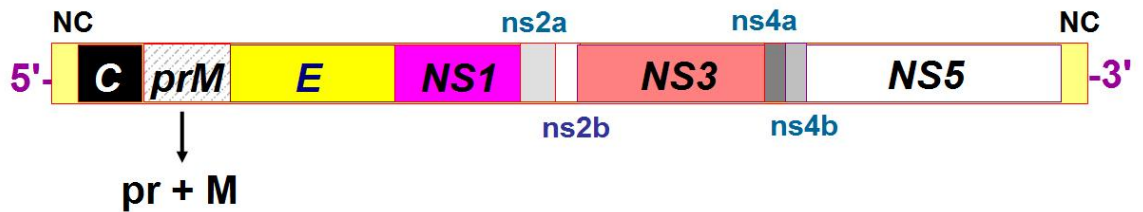


Şekil 2.1 Batı Nil virusu kökenlerinin tüm genom dizilerinin filogenetik analizi (22).

2.1.4 Virion Yapısı, Genom ve Replikasyon

Batı Nil virusu, zarflı, ikozahedral nükleokapsidli yaklaşık 50 nm büyüklüğünde, pozitif polariteli, tek iplikli bir RNA virusudur. Yaklaşık 12.000 baz çiftinden oluşan genomun 5' ve 3' uçlarında protein kodlamayan bölgeler (non-coding region, NC) bulunmaktadır. Virusun genomu üç yapısal [kapsid (C), membran öncülü (prM) ve zarf (E)] ve yedi yapısal olmayan (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B VE NS5) protein kodlamaktadır (26) (Şekil 2.2).

Virusun yapısal proteinlerinden, C ana kapsid proteinidir ve genomik RNA'yı bağlamaktadır. prM, virusun bir araya gelişi sırasında erken füzyonu önlemenin yanı sıra E proteininin olgunlaşmasına da katkı sağlamaktadır. E proteini ise virusun hedef hücreye tutunması, füzyonu ve bir araya gelmesi aşamalarında rol almaktadır. Bunun yanı sıra E proteini virusun serotip özgüllüğünü belirlemekte ve nötralizan antikörlerin ana hedefini oluşturmaktadır(27, 28).



Şekil 2.2 Batı Nil virusu genomu ve kodlanan yapısal-yapısal olmayan proteinlerin şematik gösterimi (29).

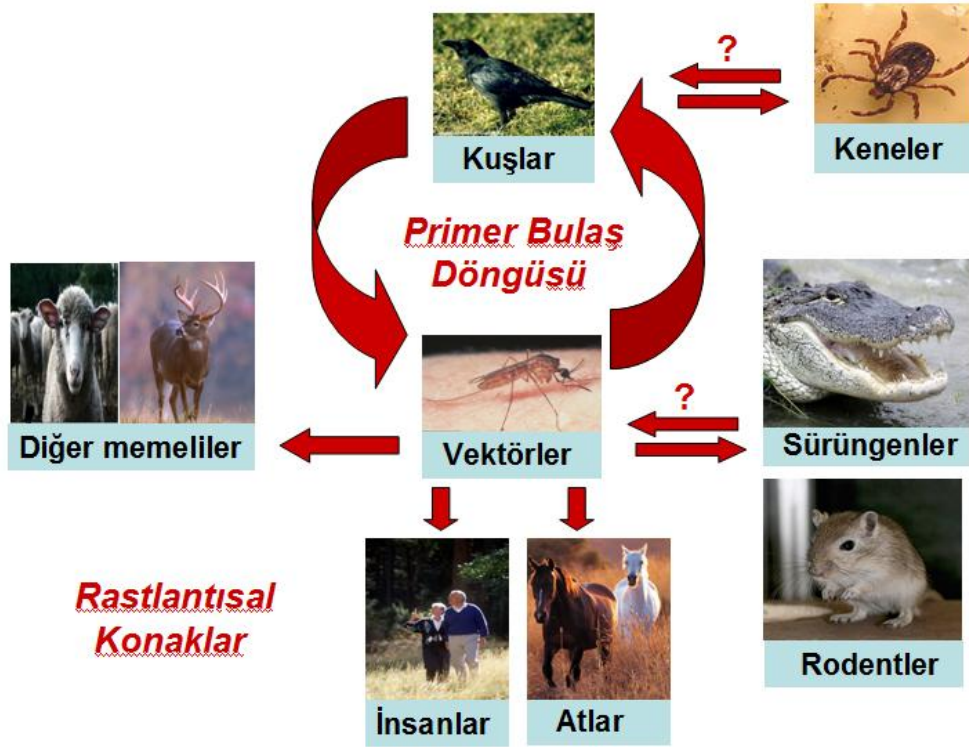
Virusun yapısal olmayan proteinlerinin temel işlevi, viral replikasyon ve transkripsiyonu düzenlemek ve konağın antiviral yanıtını modüle etmektir. Bu proteinlerden NS1, viral replikaz için kofaktör aktivitesi göstermektedir. NS2A virusun bir araya gelişinde rol almasının yanı sıra interferon yanıtını baskılamaktadır. NS2B, NS3'ün proteolitik aktivitesi için kofaktör görevi görmektedir. NS3 ise proteaz, NTPaz ve helikaz aktivitesine sahiptir. NS4A endoplazmik retikulumun (ER) modifikasyonu ve hızlı yayılımdan sorumluyken,

NS4B, interferon yanıtını bloke etmektedir. NS5 ise RNA-bağımlı RNA polimeraz enzimi ve virusun replikaz enzimidir (30) (Şekil 2.2).

BNV replikasyonu, virusun hücre yüzeyindeki özgül reseptöre tutunmasıyla başlamaktadır. Ancak BNV'nin hücre yüzeyinde kullandığı reseptörler tam olarak bilinmemekle beraber, in vitro koşullarda hücre yüzeyinde bağlandığı moleküller yüzey lektinlerinden DC-SIGN, DC-SIGNR ve integrin $\alpha_v\beta_3$ olarak belirtilmiş, ancak nöronlar gibi patogeneizde önemli hücrelere girişte kullanılan reseptör henüz kesin olarak gösterilememiştir. Hücre reseptörüne tutunmanın ardından reseptöre bağımlı endositoz mekanizmasını kullanarak hücre içerisine alınır. E proteinindeki pH'ya bağlı konformasyonel değişiklik sonucu virus zarfı ile endozomal membranın füzyonu gerçekleşir ve ardından nükleokapsid sitoplazmaya geçer. Pozitif polariteli tek iplikli genomik RNA, mRNA görevi yapar ve ER ile ilişkili membran sisteminde virus, replikaz enzimini kullanarak genoma komplementer negatif polariteli RNA sentezler ve bu molekülü kalıp olarak kullanarak yeni pozitif polariteli viral RNA'ların oluşmasını sağlar. Sentezlenen yeni RNA'lar ya viral proteinlerin sentezini sürdürür ya da kapsid içerisine paketlenir. Virusun olgunlaşması ER'da gerçekleşmekte ve buradan tomurcuklanan olgunlaşmamış partiküller prM proteini içermektedir. Trans-golgi ağında geçişi sırasında prM proteini parçalanır, olgun M proteini içeren enfektif virion oluşur ve ekzositoz ile hücreyi terk eder (30).

2.1.6 Yaşam Döngüsü

Batı Nil virusunun, virus doğadaki devamını kuşlar ve ornitofilik sivrisinekler arasında gerçekleşen bir döngü sağlamaktadır. Kuşlar virusun primer konağı olup, yüksek viremi düzeyi uzun süre korunmasına karşın enfeksiyon sıklıkla asemptomatik seyretmektedir. İnsanlar ve atlar gibi diğer omurgalılarda vireminin düşük ve kısa süreli seyretmesi sonucu bu canlılar son konak (*dead-end host*) olarak kabul edilmektedir (31).



Şekil 2.3 Batı Nil virusunun doğadaki yaşam döngüsü.

Virus farklı ekolojik ve davranış özellikleri gösteren 60 civarında sivrisinek türünde gösterilmiş olmasına karşın bunların tamamının bulaşmada önemli rol oynadığı kesin değildir (32,33). Avrupa'da 4, Afrika ve Amerika'da 11 farklı sivrisinek cinsinden (*Culex*, *Ochlerotatus*, *Aedes*, *Anopheles*, *Coquilletidia*, *Aedemomyia*, *Mansonia*, *Mimomyia*, *Psorophora*, *Culiseta* ve *Uranoteania*) ve Akdeniz bölgesinde (İsrail, Mısır ve Cezayir'de) çoğunlukla *Culex* cinsi (*Culex antennatus*, *Culex univittatus* ve *Culex pipiens*) sivrisineklerden virus izole edilmiştir (34). *Culex* cinsi sivrisineklerin, virusun yayılmasındaki en etkin vektör olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu cins sivrisineklerde virusun doğal ve deneysel olarak vertikal geçişi gösterilmiştir (34). Batı Nil virusunun bulaş döngüsünde kenelerin de rolü olabileceğine dair birçok çalışma yapılmıştır. Virus, yumuşak (*Argasidae*, *Argas* spp.) ve sert (*Ixodidae*, *Hyalomma* spp.) kenelerden izole edilmiştir ancak bu yolun virusun epidemiyolojisine etkilerinin kısıtlı olduğu düşünülmektedir (34) (Şekil 2.3).

Kanatlılar, BNV için en önemli rezervuardır ve yüksek düzeyde viremi oluşturur. Saha ve laboratuvar çalışmaları ile birçok kanatlı türünün BNV enfeksiyonuna duyarlı olduğu gösterilmiştir (32,35,36). Enfeksiyonun enzootik olduğu eski dünyada kanatlılarda BNV enfeksiyonu belirgin bir semptom ya da mortalite oluşturmaz. Buna karşın BNV enfeksiyonları, İsrail ve Amerika kıtasında, karga ailesinde (*Corvidae*) sınıflandırılan türler başta olmak üzere kanatlılarda önemli düzeyde mortalite ile seyretmiş, çevrede toplu kuş ölümlerinin gözlenmesinin bölgesel virus aktivitesine işaret ettiği saptanmıştır (32,37,38). Virusun kanatlılara bulaşması en belirgin olarak vektör sivrisinekler aracılığıyla gerçekleşir. Buna ek olarak, oral ve fekal-oral yolun da virusun dağılımına katkıda bulunduğunu gösteren kanıtlar vardır (39). Epidemiyolojik ve filogenetik veriler, virusun eski dünyada farklı bölgeler arasındaki dağılımında göçmen kuşların etkili olduğuna işaret etmektedir. Göçmen olmayan, ancak belirli bir bölgede yaşayan kuş türlerinin ise, bölgesel BNV aktivitesinin sürdürülmesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (40,41).

Çeşitli memeli türleri de BNV ile enfekte olmasına ve klinik belirti göstermesine karşın, viremi düzeyinin vektör sivrisinekleri enfekte edecek düzeyde olmaması nedeniyle son konak olarak tanımlanırlar. BNV enfeksiyonu en sık olarak insanlar ve atlarda saptanmaktadır (34). Ek olarak diğer memeliler (köpek, kedi, ayı, domuz, geyik, rakun, tavşan vb.), amfibianlar ve sürüngenler (kurbağa, timsah), rodentler ve yarasalarda da BNV enfeksiyonları saptanmıştır (34,42-48). Bunların çoğunun, virusun yaşam döngüsüne etkilerinin sınırlı olduğu düşünülmesine rağmen, sürüngenlerin uzun süreli viremi oluşturarak virusun kış aylarında hayatta kalmasını sağlayarak amplifikasyona katkısı bulunması muhtemeldir (44,45) (Şekil 2.3).

2.1.7 Patogenez, Klinik Bulgular ve Tanı

BNV'nin konakta devamlılığını sağlaması ve hastalık oluşturabilmesi, hedef hücrelerini enfekte etme ve immün yanıtta kaçabilme başarısına bağlıdır. BNV'nin vektör ile konağa inokülasyonu sonucu ilk replikasyon deri

Langerhans hücrelerinde gerçekleşmektedir. Langerhans hücrelerinin lenf nodlarına göçü ve ulaşmasının ardından viremi oluşmaktadır. Viremi sırasında dalak ve böbrek gibi periferik organların enfeksiyonu görülmektedir (30). Enfekte kişilerde viremi, hastalık semptomlarının ortaya çıkmasından 2 gün önce başlar ve yaklaşık bir hafta sonrasına kadar devam etmektedir (24). İmmün yanıt etkisiyle serum ve organlardan temizlenmesine rağmen konağın immün yanıtından kaçan viruslar bazı hastalarda merkezi sinir sistemi enfeksiyonuna sebep olmaktadır. Virusun kan-beyin bariyerini aşma mekanizması tam olarak aydınlatılamasa da endotel hücrelerinde çeşitli sitokinlerin etkisiyle geçirgenliğin arttığı düşünülmektedir (30). BNV merkezi sinir sisteminde beyin, beyin sapı ve medulla spinalis'te bulunan nöronları enfekte etmektedir. Bu hücrelerde dejenerasyon, yapı ve fonksiyon kaybı ile apoptoz görülmektedir (24).

Batı Nil virusu enfeksiyonlarında, maruziyet sonrası inkübasyon süresi 3-15 gün arasında değişmektedir (49). Batı Nil enfeksiyonu çoğu olguda asemptomatik seyretmektedir (50). Buna karşın semptomatik seyreden kişilerde genellikle; grip benzeri semptomlar, ani ateş yükselmesi, baş ağrısı, miyalji, halsizlik, iştahsızlık, mide bulantısı ve kusma olduğu bildirilmektedir. Bazı durumlarda makülopapüler veya roseolar döküntü gözlenebilmektedir (49,50). Batı Nil virusu ile enfekte olan hastaların %1'den azında menenjit, ensefalit veya meningoensefalit gibi nörolojik semptomlar görülebilmektedir. Özellikle yaşlı hastalar nörolojik semptomların gelişmesi açısından daha duyarlıdır. Nadir olarak fulminant hepatit, pankreatit ve miyokardit de saptanmaktadır (34).

BNV enfeksiyonlarının tanısında virusun izolasyonu, viral antijenler ya da nükleik asidin saptanması ve virusa karşı oluşan özgül immün yanıtın gösterilmesi yaklaşımları uygulanmaktadır. İnsanlardaki semptomatik enfeksiyonların tanısı ya da çeşitli hayvanlarda sürveyans amaçlı çalışmalarda, amaca uygun yaklaşımlar tercih edilmektedir (50). Virusun izolasyonu, hücre kültürlerinde üretilen diğer viruslarda olduğu gibi BNV için de altın standart yöntemdir. Ancak yüksek viremi izlenen vektörler ve kuşlar dışında izolasyon çalışmaları genellikle olumlu sonuç vermemektedir (50-52). Viral RNA'nın RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; ters transkripsiyonlu

polimeraz zincir tepkimesi) yöntemiyle saptanması tanı ve tarama amaçlı uygulamalarda sık olarak yararlanılan bir yaklaşımdır (52). Viral genomun farklı bölgelerini hedef alan primer/prob setleri, ayrıca standart/"nested" RT-PCR ve standart/gerçek zamanlı RT-PCR yaklaşımları uygulanmaktadır. Viral RNA'nın saptanması genel olarak analitik duyarlılığı çok yüksek olan bir tanı yaklaşımıdır (52-54). BNV'ye bağlı enfeksiyonların tanısında sıklıkla serolojik testlerle özgül antikorların varlığının tespiti yaklaşımı uygulanmaktadır (50). BNV antikorlarının saptanması için enzim temelli immünolojik test (ELISA), indirekt floresan antikor testi (IFAT), plak redüksiyon nötralizasyon testi (PRNT) gibi yöntemler kullanılmaktadır. BNV enfeksiyonlarının serolojik tanısında Flaviviruslar arasında izlenen çapraz reaksiyonlar güçlük yaratabilmektedir. Böyle durumlarda antikor özgüllüğünün PRNT ile doğrulanması gerekmektedir (55,56). Vektör sivrisinekler ve kanatlılarda tarama çalışmalarında kullanılmak üzere, viral antijenlerin saptandığı çeşitli ticari test sistemleri de bulunmaktadır (57-59).

2.1.8 Epidemiyoloji, Korunma ve Kontrol

Batı Nil enfeksiyonu, vektör aracılığı ile bulaşan virus enfeksiyonları arasında dünyada en yaygın görülen arboviral enfeksiyondur. Coğrafi olarak dağılımının bu kadar genişlemesine iklim değişikliklerinin yanı sıra insan aktivitelerinin de katkısı bulunduğu düşünülmektedir. Artan taşımacılık (insan, hayvan, bitki vs.), vektör kontrol programları, şehirleşme projeleri ve askeri aktiviteler etkisi olduğu düşünülen faktörlerdendir (60).

Batı Nil virusunun, kuşlara bulaşması çoğunlukla enfekte sivrisineğin kan emmesi sırasında gerçekleşir. Ek olarak kuşlar arasında oral ve fekal-oral bulaşlar olduğu da gösterilmiştir (39). Özellikle göçmen kuşlar aracılığı ile dağılımı genişleten virus, göçmen olmayan kuşlarla da bulunduğu bölgede devamlılığını sağladığı düşünülmektedir. Virusun insan ve atlara bulaşında da en etkin yol enfekte sivrisineğin kan emmesi olmaktadır. Bunun yanı sıra kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu, organ transplantasyonu, transplasental yol ve anne sütü ile de bulaşın meydana geldiği gösterilmiştir (30).

BNV insidansı Kuzey Amerika, Avrupa ve Akdeniz havzasında ılıman iklime sahip bölgelerde mevsimsel özellik gösterir ve en yüksek virus aktivitesi temmuz-ekim ayları arasında izlenir (34,40). Amerika Birleşik Devletleri'nde virusun güneye yayılımıyla birlikte insan olgularının saptandığı süre genişlemiş ve nisan-aralık aylarını da içine almaya başlamıştır (40). Güney Afrika'da ise bulaşma, yılın ilk ilkbahar ve yaz yağmurları ile artış göstermektedir (5).

Eski dünyada BNV'ye bağlı enfeksiyonlar 50 yılı aşkın bir süredir saptanmakta ve vektör sivrisinekler, at, insan ve diğer çeşitli konaklardan Afrika, Avrupa, Akdeniz ve Ortadoğu, Asya'nın çeşitli diğer bölgeleri ve Avustralya'dan (Kunjin virus) rapor edilmektedir. İlk zamanlarda düşük patojeniteye sahip bir ajan olarak kabul edilen BNV'nin etken olduğu ve ensefalit olgularının izlendiği epidemiler, 1951-54 ve 1957 yıllarında İsrail, 1962-63 yıllarında Fransa ve 1974 Güney Afrika saptanmıştır. Takip eden yıllarda Akdeniz havzasında saptanan belli başlı BNV epidemileri Cezayir, Fas, Tunus, Romanya, Çek Cumhuriyeti, İsrail, Rusya ve Fransa'dan rapor edilmiştir (32,40,61,62,63). Son olarak daha önceden diğer konaklarda duyarlı virusun varlığı tanımlanmış olan İtalya ve Macaristan'da insan BNV olguları saptanmış; 2010 yılı temmuz-ağustos aylarında ise Yunanistan'dan ilk kez BNV'nin etken olduğu bir salgın bildirimi yapılmıştır (64-67) (Tablo 2.1). 1999 yılından önce batı yarıkürede rastlanmayan BNV, 1999'da önce New York şehrinde saptanmış, daha sonra hızla Amerika Birleşik Devletleri'nde yayılarak kuzeyde Kanada ve Güney Amerika'ya ulaşmıştır (63,68,69).

BNV enfeksiyonlarında özgül bir antiviral tedavi bulunmamakta, semptomların şiddetine göre destekleyici tedavi yaklaşımları uygulanmaktadır. In vitro çalışmalarda ribavirin, alfa interferon ve pirazidin nükleotidlerinin antiviral aktivitesi saptanmış olmasına karşın, bu bileşiklerin klinik kullanımına ilişkin çalışma bulunmamaktadır. Tedavi ve profilaksi amacıyla hiperimmün serum uygulamasının etkinliği ile ilgili veriler çelişkili, kontrollü klinik çalışmalar yetersizdir. İnsanlarda kullanım ruhsatı almış bir aşı bulunmamaktadır. Enfeksiyonun önlenmesinde en önemli nokta, duyarlı kişilerle enfekte sivrisineklerin temasının, kişisel korunma önlemleri ve vektör kontrol programları ile önlenmesidir (32,50).

Tablo 2.1 Avrupa Birliği ve bazı komşu ÷lkelerde 1990-2010 yılları arası saptanan Batı Nil virusu aktivitesi (*: Sivrisineklerde BNV saptanması)

÷lke	Yıl	Türler/Klinik Semptomlar		
		İnsan	At	Kuş
Cezayir	1994	var		
Avusturya	2008			bilinmiyor
Hırvatistan	2001-2002		yok	
Çek Cumhuriyeti*	1997	var		
	2004-2006			yok
Fransa*	2000		var	
	2003-2004-2006	var	var	
Yunanistan	2010*	var		
Macaristan	2003-2008	var		
İsrail	1998-1999		var	var
	2000	var		
İtalya*	1998	yok	var	yok
	2008-2009	var	var	yok
Fas	1996-2003		var	
Polonya	2006			yok
Portekiz	1971*			
	2004*	var		
Romanya	1996	var	var	var
Rusya	1999-2005-2006	var		
İspanya	2003-2005			yok
	2004	var		
Tunus	1997	var		

2.1.9 Türkiye'deki Durum

Türkiye, BNV için endemik kabul edilebilecek bir coğrafyada bulunmaktadır. Ayrıca ÷lkemiz, coğrafi konumu ve iklimsel özellikleri nedeniyle, hem vektör türlerinin hem de birçok farklı kuş türünün yaşamasına olanak sağlamaktadır. ÷lkemizde BNV için vektör kapasitesi bulunan çeşitli sivrisinek türlerinin varlığı bilinmektedir (70).

Batı Nil virusunun Türkiye'deki varlığına ilişkin ilk veri 1971 yılında Ankara ve Hatay illerinde yapılan çalışmada koyunların BNV'ye karşı nötralizan antikör varlığı saptanmasıyla elde edilmiştir (71). 1980 yılında Ege bölgesinde yapılan bir çalışmada 1074 kişinin %29.1'inde BNV antikörleri saptanmış, bu sonucun %74'lük bir bölümü de nötralizasyon testi ile doğrulanmıştır (72). 2007 yılında Güneydoğu Anadolu'da Şanlıurfa ve Siverek bölgelerinde de %9.4 oranında BNV nötralizan antikör varlığı gösterilmiştir (73). Diğer bir çalışmada ise Hatay, Adana, Antalya, Muğla, İzmir, Şanlıurfa, Bursa ve Ankara da bulunan 10 farklı ilden toplanan örnekler incelenmiş; büyükbaş hayvanlarda %4, köpeklerde 37.7%, atlarda %13.5, katırlarda %2.5, insanlarda %20.4 ve koyunlarda 1% oranlarında BNV nötralizan antikörleri gösterilmiş, incelenen bütün bölgelerde BNV maruziyeti saptanmıştır (74). Kuzey ve Orta Anadolu bölgesinde kan donörlerinde yapılan bir seroprevalans çalışmasında ise Ankara, Konya, Yozgat ve Sivas illerinde yaşayan sağlıklı kan donörlerinin %0.56'sında BNV nötralizan antikörleri varlığı gözlenmiştir (75) (Şekil 2.4.).

çalışmada sivirisineklerde virus varlığı doğrulanamamış; Kızılırmak deltası ve Karadeniz bölgesinde yapılan çalışmalarda ise doğada yaşayan kuş türleri ve sert kenelerde virus saptanmamıştır (85-87).

2.2 Toskana Virus ve Diğer Phleboviruslar

2.2.1 Tarihçe

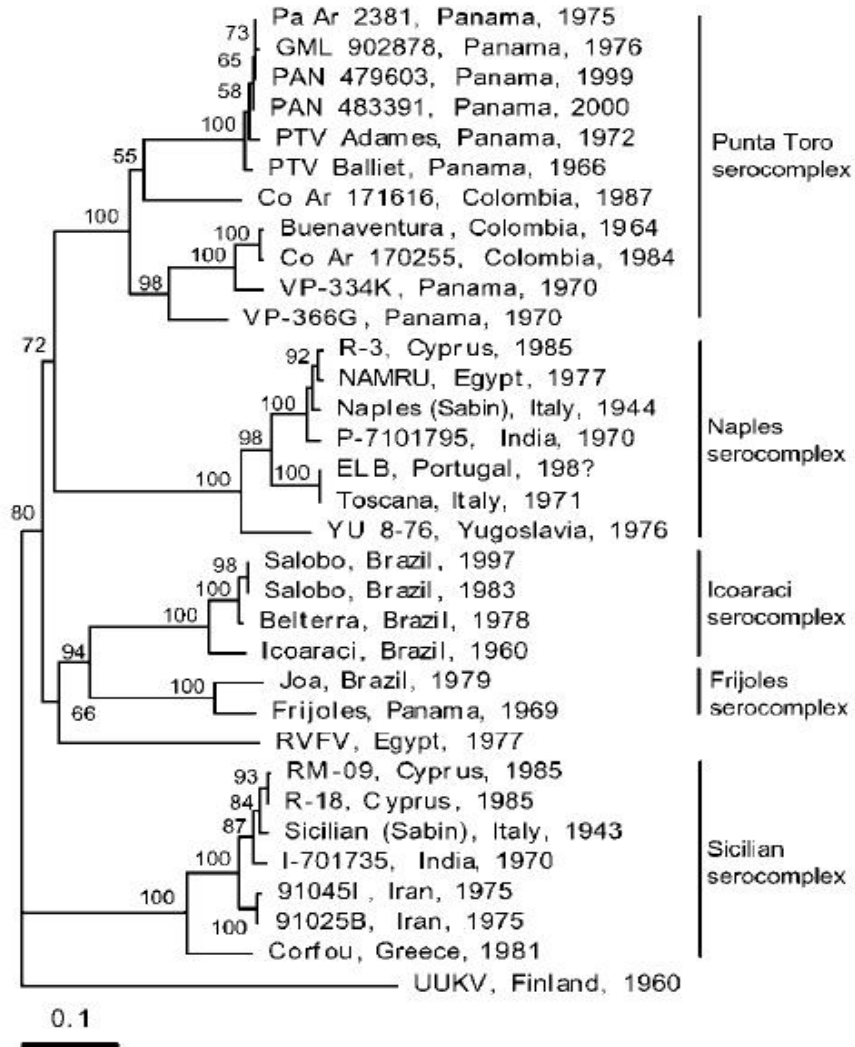
Kum sineği ateşinin ("*Phlebotomus*" ateşi), Avusturya ordusunda 1909 yılında izlenen bir epidemide fark edildiği, bulaştırılabildiği ve filtre edilebilen bir ajanın bu epidemiye neden olduğu saptanmıştır (88). 1941 yılında Mısır'da askeri birlikleri etkileyen diğer bir salgın ortaya çıkmış, II. Dünya Savaşı sırasında da Kuzey Afrika ve Akdeniz'e giden Amerikan ve İngiliz askeri birliklerinde yüksek enfeksiyon oranları görülmüştür (89). Ardından sivillerde de, özellikle turistik amaçla Orta Avrupa ve eski Sovyetler Birliği'ne seyahat öyküsü olan kişilerde enfeksiyonun ortaya çıktığı bildirilmiştir (90). *Phlebovirus*lara bağlı en büyük salgının, 1948 yılında Sırbistan'da ortaya çıktığı bildirilmiş, sonrasında Kuzey Afrika, Ortadoğu ve Orta Asya'da da salgınlara sebep olduğu gösterilmiştir (91). II. Dünya Savaşı sırasında çıkan epidemide Sabin, serolojik olarak farklılık gösteren 2 ajan izole etmiş; bunlar "sandfly fever" Sicilya virusu (SFSV) ve "sandfly fever" Napoli virusu (SFNV) olarak tanımlanmıştır (88). Sonrasında benzer yapısal ve genomik özellikler gösteren birçok virus izole edilmiş ve *Bunyaviridae* ailesi içerisinde yer alan *Phlebovirus* cinsine dahil edilmiştir.

Toskana virus (TOSV) ise, ilk kez 1971 yılında İtalya'da izole edilmiş, 1980 yılında ise *Phlebovirus* cinsi içerisinde yerleştirilmiştir. TOSV'un SFNV ile antijenik benzerlik gösterdiği saptanmıştır (92,93). TOSV sonrasında İtalya'nın farklı bölgelerinde *Phlebotomus perfilliewi* türü kum sineklerinden ve *Pipistrellus kuhli* türü yarasanın beyninden izole edildiği bildirilmiştir (94). Takip eden çalışmalarda TOSV'un insanlarda ortaya çıkan nörolojik hastalıklarla ilişkili olduğu ortaya konularak kum sineği ateşi etkenleri arasında nörotropizm gösteren tek virus olarak tanımlanmıştır (92). TOSV endemik bölgelerde

özellikle bahar ve yaz aylarında insanlarda izlenen viral aseptik menenjit etkenleri arasında en önde gelenlerden birisi olmaya devam etmektedir (95).

2.2.2 Sınıflandırma

TOSV ve kum sineği ateşi etkeni olan diğer phleboviruslar, *Bunyaviridae* ailesinin *Phlebovirus* cinsinde sınıflandırılmaktadır. Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi'nin 9. raporuna göre, *Phlebovirus* cinsinde yer alan 68 farklı izolat, 9 virus grubu veya serokompleks (SFNV, Salehabad, "Rift Valley" fever, Uukuniemi, Bujaru, Candiru, Chilibre, Frijoles ve Punta Toro) olarak gruplandırılmakta, SFSV ise ayrı bir serokompleks olarak önerilmektedir (96). Phlebovirus serokompleksleri arasında genetik yakınlık ve serolojik çapraz reaksiyonlar değişen oranlarda izlenmekte, ayrı serokomplekste yer alan viruslar arasında ise belirgin çapraz reaksiyonlar izlenmektedir. TOSV, önerilen gruplardan SFNV serokompleksi içinde yer almakta, SFSV ise, kendi adı verilen ayrı bir serokomplekste bulunmaktadır (97). TOSV'un coğrafi dağılım farklılığı gösteren iki genotipi saptanmıştır. Bunlardan A genotipi Fransa'nın bir kısmı ve İtalya kökenli izolatları kapsarken, B genotipi İspanya ve Fransa'da dolaşımda bulunmaktadır. Aynı bölgede birden fazla genotipin bulunabildiği de rapor edilmiştir. TOSV genotipleri arasında virülans ya da klinik özellikler açısından belirgin bir farklılık henüz bildirilmemiştir (95, 98).

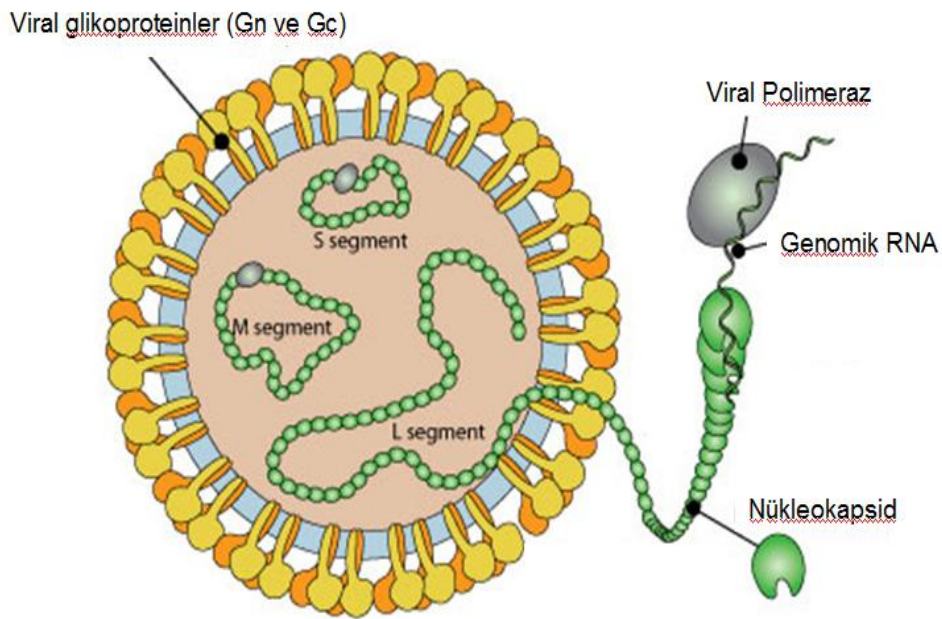


Şekil 2.5 Phlebovirus S segmenti nükleotid dizilimine göre filogenetik ilişkiler. TOSV, Napoli serokompleksinde izlenmektedir (97).

2.2.3 Virion Yapısı, Genom ve Replikasyon

Diğer phleboviruslarla benzer şekilde TOSV, 80-120 nm büyüklüğünde, ikozahedral simetridir, heliksel nükleokapsid içeren zarflı bir virustur. Viral genom nükleokapsid proteinleri tarafından korunan 3 parça negatif polariteli ya da ambisens tek iplikli RNA'dan ("Large" L - 6.5-8.5 kb; "Medium" M - 3.2-4.3 kb ve "Small" S - 1.7-1.9 kb) meydana gelir. Bunlardan S segmenti, 1869 nükleotitten

oluşmakta ve 2 protein (N protein-nükleokapsid protein ve NSs protein-yapısal olmayan protein) kodlamaktadır. M segmenti ise 4215 nükleotitten meydana gelmekte ve tek bir protein kodlamaktadır. Bu protein post-translasyonel modifikasyon ile 30 kDa'luk NSm yapısal olmayan proteinine ve 65 kDa'luk zarf glikoproteinleri Gn ve Gc'ye dönüştürülmektedir. L segmenti ise, yaklaşık 6400-6700 nükleotit uzunluğunda olup, 239 kDa'luk viral RNA bağımlı RNA polimerazı kodlamaktadır. Genomik segmentlerin uç bölgelerinin identik sekanslara (3'-UGUGUUUC ve komplementer 5' dizileri) sahip olduğu gösterilmiştir (99). Bu bölgelerin replikasyon, transkripsiyon ve genom paketlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir (100,101).



Şekil 2.6 Phlebovirus virion yapısının şematik gösterimi (<http://viralzone.expasy.org/>'dan uyarlanmıştır)

TOSV'un her üç genom segmentini kullanarak kodladığı proteinler nükleokapsid (N), viral polimeraz (L), zarf glikoproteinleri Gn ve Gc, yapısal olmayan ve viral replikasyonda rol alan proteinler NSs ve NSm şeklindedir. Bunlardan N, L ve NSs proteinleri, virion yapısında da saptanmaktadır (92,100).

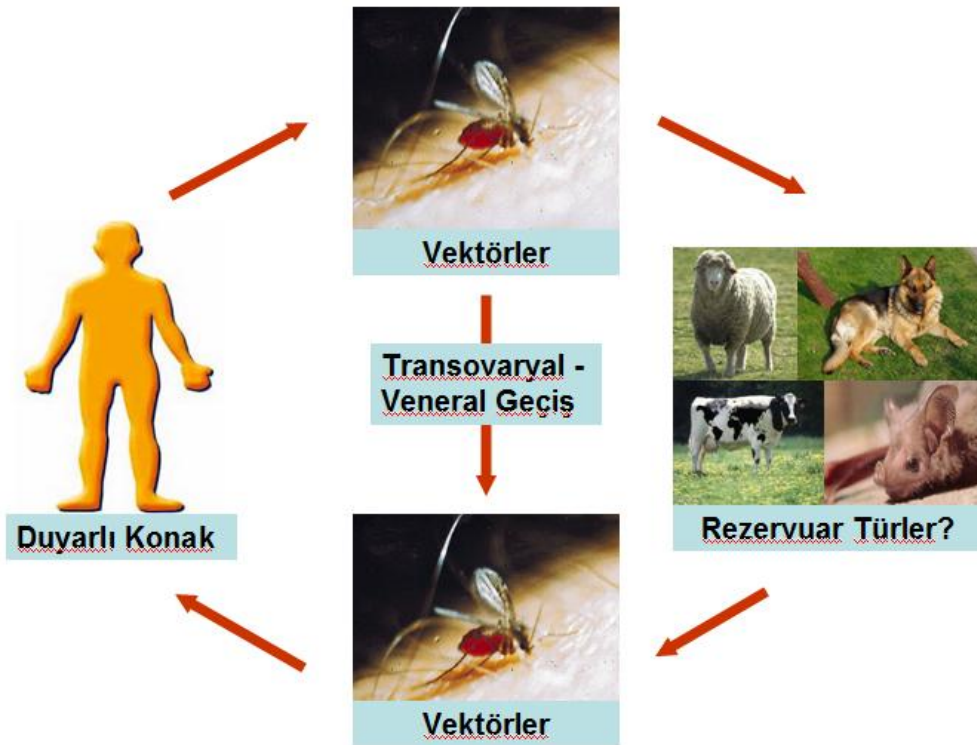
TOSV replikasyonu, virusun Gn-Gc zarf glikoprotein dimerlerinin hücre membranı ile etkileşime geçip, endositoz yoluyla hücreye girişiyle başlamaktadır. Viral zarfın endozom membranıyla asit ortamda birleşmesinin ardından nükleokapsid soyulması gerçekleşir ve genom segmentlerini içeren ribonükleoproteinler sitoplazmaya geçer. Sonrasında sitoplazmada replikasyon, transkripsiyon ve translasyon aşamaları izlenir. Virusa ait transkripsiyon, viral RNA polimerazın her segmentte bulunan promotör bölgeleri tanıyıp bağlanması ile başlar ve identik sekansların oluşturduğu saç tokası yapısı ile sonlanır. S segmenti ambisens strateji ile transkripsiyona uğrar, hem genomik hem antigenomik RNA protein sentezinde kalıp olarak kullanılır. M segmentinin transkripsiyonu sonucu oluşan poliprotein, hücresel proteazlar tarafından parçalanarak Gn ve Gc proteinleri oluşturulur. Golgi aygıtında gerçekleşen olgunlaşma sonrasında olgun virus partiküllerini taşıyan veziküller oluşur. Bu veziküllerin plazma membranıyla füzyonu sonucu virus hücreden ayrılır (101).

2.2.5 Yaşam Döngüsü

Phlebovirusların doğadaki devamlılığı, yeni dünyada *Lutzomyia*, eski dünyada *Phlebotomus* cinslerinde bulunan kum sinekleri ile sağlanmaktadır. Birçok phlebovirus, *Phlebotomus* cinsi kum sineklerden izole edilmiştir ve kum sineklerinin viruslar için vektör özelliği taşıdığı deneysel olarak gösterilmiştir (102). Diapozda bulunan *P.perniciosus* larvalarında da TOSV varlığı gösterilmiştir (102).

Genel olarak phleboviruslar bugüne kadar insan ve kum sineklerinden izole edilebilmiştir. Sadece TOSV'un ilk izolasyonu, omurgalılardan *P.kuhli* türü yarasalardan yapılmıştır. İnsan dışı omurgalılarda TOSV ve diğer phleboviruslara karşı oluşmuş antikorlar saptanmasına karşın, bu türlerin virusun yaşam döngüsüne belirgin bir katkısının olmadığı düşünülmektedir. Phlebovirusların duyarlı konaklara bulaşması dışı kum sineklerinin kan emmesi sonucunda meydana gelir. İnsan ve diğer omurgalılarda geçici süreli görece düşük düzeyde viremi izlenmesi nedeniyle, kum sineklerini yeniden enfekte edebilme yetenekleri sınırlıdır (103). Bu nedenle ara konak ya da rezervuar rolü

oyunmaları güçtür (103). Vektör kum sineklerinin inaktif olduğu sonbahar ve kış dönemi boyunca virusların hayatta kalmalarını sağlayan alternatif mekanizmaların varlığı muhtemeldir. Phleboviruslar, kan emmeyen erkek kum sineklerinden de izole edilebilmektedir. Yapılan çalışmalar, kum sineklerinin transovaryal (vertikal) ve veneral (horizontal) yollarla enfekte olabildiğini göstermiştir. Bu mekanizma veya alternatif yolların, phlebovirus ve TOSV'un yaşam döngülerine olan katkıları henüz kesin olarak açıklanmamıştır (104, 105, 106).



Şekil 2.7 TOSV'un doğadaki yaşam döngüsü.

2.2.6 Patogenez, Klinik Bulgular ve Tanı

TOSV, diğer phleboviruslardan belirgin nörotropizmi, insanda nörovirülans ve merkezi sinir sistemi tutulumu göstermesi ile ayrılmaktadır. Genel olarak phlebovirusların patogenezinin aydınlatılması için kullanılacak

uygun hayvan modelleri bulunmamaktadır. Benzer şekilde TOSV'un da deneysel olarak inoküle edildiği yeni doğan ya da erişkin farelerde herhangi bir semptom meydana getirmediği; ancak nörovirülsü artırılmış izolatların apoptotik mekanizmalarla nöron kaybı ve enfekte farelerin ölümüne neden olabileceği gösterilmiştir. Hayvan deneylerinde TOSV'un derialtına verilmesinden 6 gün sonra viral antijenler ve RNA nöral dokunun yanı sıra dalak ve lenf nodlarındaki makrofaj ve dendritik hücrelerde tespit edilmiş, ancak 15. günde beyinde viral RNA saptanmamıştır (101). Bu sonuçlar, virusun merkezi sinir sistemine lenfoid organların enfeksiyonunu takiben makrofaj ya da dendritik hücrelerle ulaştığını işaret etmekte fakat sonrasında enfeksiyonun immün mekanizmalarla kontrol altına alınıp, temizlendiğini göstermektedir (107).

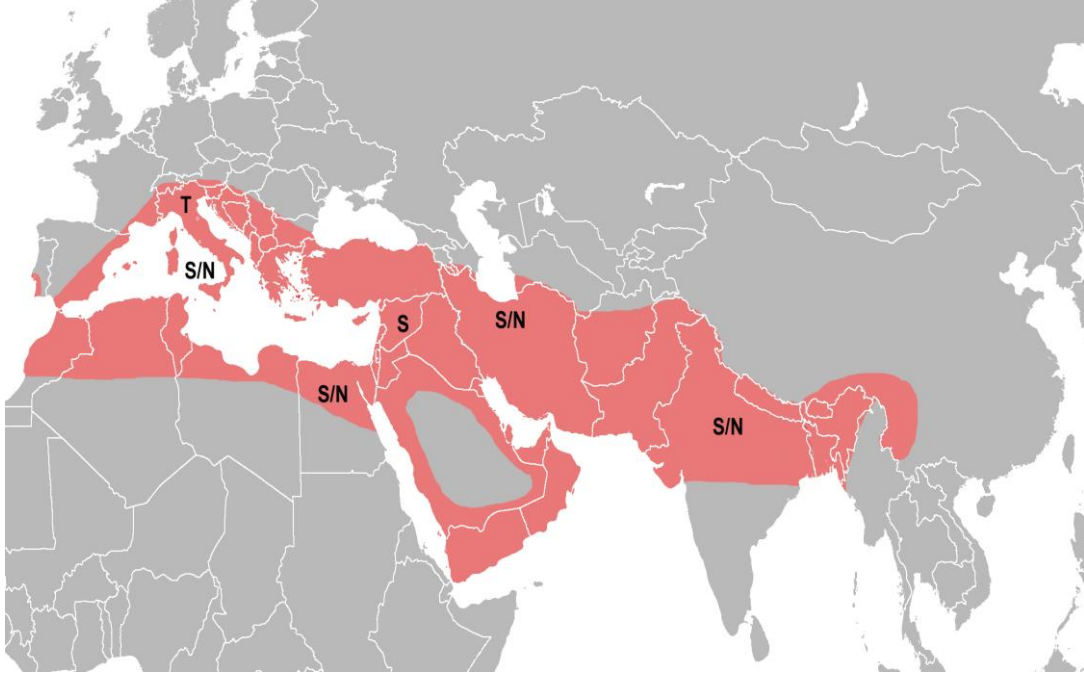
SFSV ve SFNV başta olmak üzere çeşitli phleboviruslar, kum sineği ateşi (tatarcık humması, 3 günlük ateş, flebotom ateşi yakarca ateşi) olarak adlandırılan ateşli hastalığın etkenleridir (94). TOSV enfeksiyonlarında da ateşli hastalık izlenebilmekle birlikte, virusun nörotropizmi nedeniyle aseptik menejit, meningoensefalit ya da ensefalit şeklinde merkezi sinir sistemi tutulumu da ortaya çıkabilmektedir (92, 108, 109, 110, 111). Phlebovirus enfeksiyonlarında inkübasyon süresi birkaç gün ile 15 gün arasında değişen bir aralık göstermektedir. Genellikle semptomatik dönemi takiben 7-10 gün içerisinde, TOSV enfeksiyonu sonucu merkezi sinir sistemi tutulumu ortaya çıkmazsa iyileşme ile sonuçlanmaktadır. Phleboviruslara bağlı ateşli hastalık tablosu (39-40 °C'ye çıkabilen) yüksek ateş, baş ağrısı, myalji-artralji, makülopapüler döküntü, fotofobi, retroorbital ağrı, bulantı-kusma gibi gastrointestinal belirtilerle karakterizedir. Enfeksiyon semptomatik seyredebileceği gibi asemptomatik enfeksiyon ve serokonversiyon da izlenebilir. Kum sineği ateşinde semptomlar kendi kendini sınırlayıcı özelliktedir ve ateş 2-4 günde düşer; ancak TOSV enfeksiyonlarında meningeal ve nörolojik belirtiler ateşli dönemi takip edebilir. Merkezi sinir sistemi tutulumu diğer viral ensefalitlere göre daha hafif seyirli olmakla birlikte bazı olgularda ağır klinik tablolar ve nörolojik-psikiyatrik sekeller oluşabildiği rapor edilmektedir (108, 112). TOSV enfeksiyonlarında nadir de olsa lenfadenopati, hepatosplenomegali, böbrek tutulumu, disemine intravasküler koagülasyon, kanama eğilimi ve epididimoorşit bildirilmiştir (95).

Phlebovirus enfeksiyonlarının tanısında virusun izolasyonu, viral nükleik asidin saptanması ve virusa karşı oluşan özgül immün yanıtın gösterilmesi yaklaşımları mümkündür. Ancak virusun kısa süreli viremi oluşturması nedeniyle BNV'de de olduğu gibi viral RNA'nın saptanabilmesi, semptomatik hastalığın sadece ilk günlerinde söz konusu olabilmektedir. Virus izolasyonu uygulamalarına ise düşük duyarlılığı ve rutin tanı laboratuvarlarında uygulanmasının pratik olmaması nedeniyle tanı amaçlı nadiren başvurulmaktadır (95). Viral RNA'nın saptanmasında viral genomun farklı segmentlerini hedef alan primer/prob setleri kullanılarak standart/"nested" RT-PCR ve standart/gerçek zamanlı RT-PCR yaklaşımları uygulanabilmektedir. Phlebovirus-TOSV enfeksiyonlarında özgül tanıda sıklıkla serolojik testlerle virüslere karşı oluşan antikorların saptanması yaklaşımı uygulanmaktadır. Kompleman birleşmesi, hemagglutinasyon önlenim, virus nötralizasyonu gibi standart virolojik testlerin yanı sıra ELISA, IFAT, immünokromatografik testler de antikorların saptanmasında kullanılabilir. Ancak özellikle aynı serokompleks içerisinde yer alan virus izolatları arasında çapraz reaksiyonlar belirgin olarak izlenmekte ve serolojik test sonuçlarının değerlendirilmesini güçleştirmektedir (92,95).

2.2.7 Epidemiyoloji, Korunma ve Kontrol

Phleboviruslara bağlı enfeksiyonlar, Akdeniz çevresi, Güney Avrupa, Ortadoğu, Kuzey Afrika ve Asya kıtasının batı kısımlarında izlenmektedir. Virüslerin bulaşması, *Diptera* takımı *Psychodidae* ailesi *Phlebotominae* alt ailesinde sınıflandırılan dişi kum sineklerinin kan emmesi yoluyla olur (94). Kişiden kişiye diğer yollarla doğrudan ya da dolaylı olarak bulaşma bildirilmemiştir. SFSV ve SFNV için vektör kum sineği *Phlebotomus papatasi*, TOSV için vektörler ise *Phlebotomus perniciosus* ve *Phlebotomus perfilliewi* dir. Adı geçen virüsler, farklı coğrafi bölgelerde ilgili kum sineklerinden izole edilmiştir. Virüslerin dolaşımında olduğu ve hastalıkların görüldüğü bölgeler, vektör dağılımı ile örtüşmektedir. Amerika kıtasında ise Alenquer, Chagres, Candiru ve Punta Toro virüsleri ateşli hastalık olgularında saptanmıştır (94).

Phleboviruslara bağlı hastalıklar, vektör kum sineklerinin aktif olduğu aylarda (mayıs-ekim) ortaya çıkar, sporadik olguların yanı sıra epidemiler oluşturur (94).



Şekil 2.8 Eski dünyada TOSV ve diğer ateşli hastalık etkeni olan phlebovirusların yaygınlığı. T: Toskana virus, (TOSV); S: Sicilya virus (SFSV); N: Napoli virus (SFNV) (<http://www.enivd.de>'den uyarlanmıştır).

Özellikle SFNV ve SFSV, vektörleri olan *P. papatası*'nin geniş dağılım göstermesi nedeniyle oldukça yaygın görülmektedirler (59). SFSV aktivitesi varlığına ilişkin bulgular Bangladeş, Hindistan, Etiyopya, Sudan, Yunanistan, Kıbrıs, Irak, Cezayir, Suudi Arabistan, Somali, Tunus, Pakistan, İnan, Türkmenistan, Tajikistan, Özbekistan, Azerbaycan ve Moldavya, Balkan yarımadası, Fransa ve Portekiz'den rapor edilmiştir (94,113). İtalya'da ilk kez saptanmasının ardından TOSV'un İspanya, Fransa, Portekiz, Kıbrıs, Slovenya ve Yunanistan'da da dolaşımda olduğu gösterilmiştir. Özellikle İtalya'da yaz döneminde izlenen viral menenjitlerin önemli bir kısmının etkeni TOSV olmaktadır (94). Bunun dışında Tunus, Cezayir ve Malta'da da virus aktivitesine

işaret eden kanıtlar bulunmaktadır (92,95). Endemik ülkelerde TOSV seroprevalansı %16-26 olarak rapor edilmekte, antikor seroreaktivitesinin yaşla birlikte artış gösterdiği izlenmektedir (95,114,115). Ormancılık alanında çalışmak gibi vektör maruziyeti ihtimalini artıran meslek gruplarında ise TOSV antikorlarının prevalansı %77'e kadar çıkabildiği rapor edilmiştir (92).

Phleboviruslarla enfeksiyon sonucu türe özgül bağışıklık gelişir ve reenfeksiyonları önler. Ancak farklı bir virus serotipi için çapraz korunma sözü konusu değildir (94). Endemik bölgelerde duyarlı kişilerde izlenen enfeksiyonlar kadar, phlebovirus ve TOSV enfeksiyonları, seyahatle ilişki enfeksiyonları arasında da önemli yere sahiptir ve yeni olgu bildirimleri sürmektedir (116,117).

Kum sineği ateşinin klasik etkenleri olan SFSV ve SFNV, ayrıca meningoensefalit etkeni olan TOSV dışında, çeşitli flebotom türlerinde bazı diğer phlebovirus izolatları da tanımlanmıştır (Kıbrıs virusu, Korfu virusu, Massilia virusu, Granada virusu, Punique virusu ve bazı isimlendirilmemiş izolatlar) (118). Bu virusların bazılarının (özellikle Kıbrıs virusu), SFSV/SFNV gibi ateşli hastalık tablosu oluşturduğuna ilişkin kanıtlar bulunmasına rağmen, insanda enfeksiyon etkeni olarak rolleri açık değildir (119, 120).

TOSV de diğer phlebovirus enfeksiyonlarının tedavisinde önerilen, klinik etkinliği kanıtlanmış standart bir tedavi rejimi bulunmamaktadır. Ağır ateşli hastalık izlenen olgular ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarında destekleyici tedavi uygulanır. Ribavirin, alfa interferon ve diğer bazı bileşiklerin virus replikasyonunu baskılama özellikleri gösterilmiştir. Özgül aşuların bulunmadığı Phlebovirus enfeksiyonlarında korunma amacıyla en etkin uygulamalar kişisel tedbirler ve vektör kontrolü olarak karşımıza çıkmaktadır (94, 113).

2.2.8 Türkiye'deki Durum

Ülkemizin farklı iklim ve ekolojik özelliklere sahip bölgelerde *Phlebotomus* cinsine ait çeşitli kum sineği türlerin yayılımı izlenmektedir. Aralarında sık olarak izlenen phleboviruslar SFSV-SFNV ve TOSV'un vektörleri olan *P.papatasi* ve

P.perfiliew'nin de bulunduğu birçok kum sineği türü Ege, Akdeniz, İç Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Marmara Bölgeleri başta olmak üzere ülkemizde yayılım göstermektedir (99). Phlebovirusların Türkiye'de aktivitelerine ilişkin bilgiler de, diğer vektör kaynaklı viral enfeksiyonlara göre daha erken olarak ortaya konulmuştur. Yayımlanmış ilk bildirim, Antalya ilinde 1955 yılında 50 sağlıklı erişkinden elde edilen serum örneklerinde saptanan SFSV ve SFNV için sırasıyla %22 ve %62 oranlarında nötralizan antikordur (121). Ege bölgesi kaynaklı 1074 serum örneğinin ise %0.84 SFSV, %13.9 SFNV'ye karşı nötralizan antikor varlığı, 1980 tarihli bir çalışmada bildirilmiştir (72). İlk kum sineği ateşi olgu bildirimini ise Türkiye'de turist olarak bulunduktan sonra ülkesine dönen 15 yaşında kadın olguya ait seyahatle ilişkili enfeksiyon raporudur (122). Menenjit bulguları ile takip edilen bu olgu, ELISA ve immüblot testleri ile SFSV olarak tanımlanmıştır. 2003 yılında Aydın ili Akbük ve Olukbaşı kasabalarında bölgede kum sineği ateşini düşündüren ateşli hastalık salgınının ardından yapılan incelemede ise, önceki TOSV ve SFNV maruziyetleri incelenen örneklerin sırasıyla %55 ve %17.5'inde doğrulanmış, ancak akut hastalık olgusuna rastlanmamıştır (76). Bu rapor ülkemizde TOSV aktivitesine işaret eden ilk bulgudur.

İzmir, Adana ve Ankara illerinde 2007-2008 yıllarında meydana gelen ve kum sinekleri ile bağlantılı görünen ateşli hastalık salgınlarında etkilenen olgular phleboviruslar açısından araştırılmış; çalışmaların sonucunda SFSV ve Kıbrıs virusu'na benzerlik gösteren bir phlebovirus varyantı, "Sandfly Fever" Türkiye Virusu (SFTV) tanımlanmıştır (123). SFTV'nin S segmentinin nükleotid dizisi, Kıbrıs virusuna %98 homoloji gösterirken, M ve kısmi L segmentleri ise SFSV'ye sırasıyla %91.1 ve %95.5 homolog olarak izlenmiştir. Bu virusun etken olduğu enfeksiyonların, SFSV ile ortaya çıkan klasik kum sineği ateşine göre daha ağır seyrettiği, belirgin trombositopeni, lökopeni ve karaciğer enzimlerinde yükselmeler izlendiği saptanmıştır (124). SFTV ile ilgili tek serosürveyans çalışmasında etkene maruziyet Ankara ve Konya illerinde sağlıklı kan donörlerinde gösterilmiştir (125). Takip eden yıllarda SFTV'nin özellikle Ankara ilinde aktivitesini sürdürdüğü gözlenmiş (126); hastalıktan etkilenen kişilerin

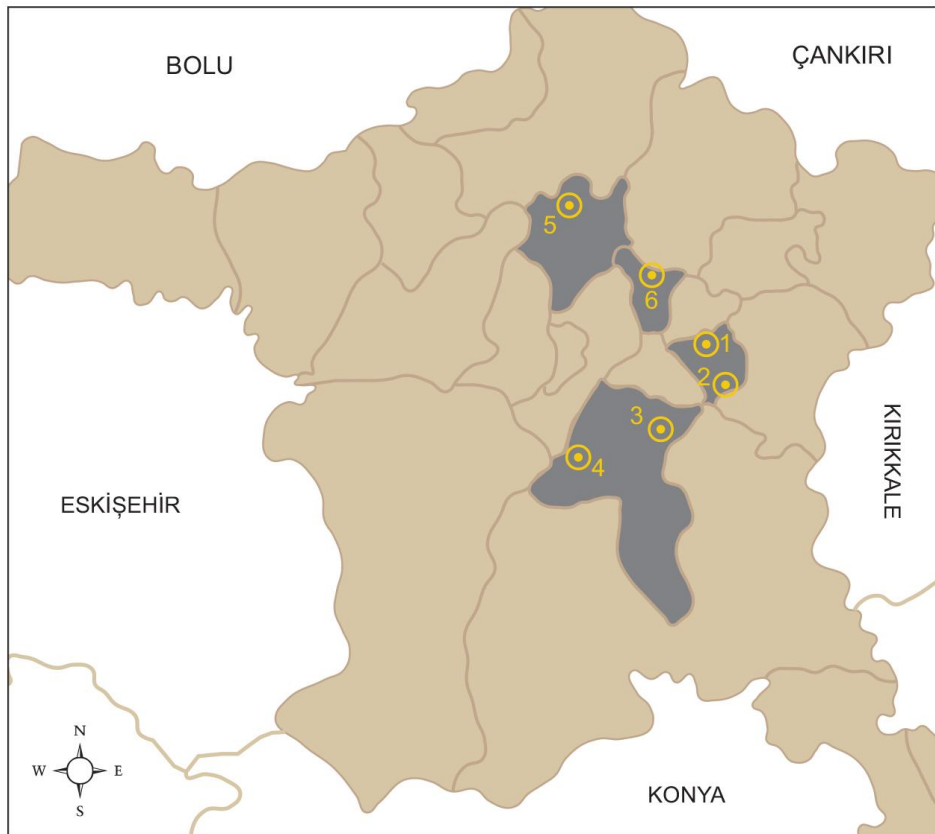
yoğunlaştığı bölgelerde yapılan bir entomolojik çalışma ile *P.major* s.l. türü kum sineklerinde virus saptanarak bulaşmadan sorumlu vektör tanımlanmıştır (127). SFTV enfeksiyonlarının bazı olgularda nörotropik özellik göstererek ensefalit bulguları ile seyredebileceği, Güneydoğu Anadolu bölgesi kaynaklı bir olgu raporu ile ilk kez gösterilmiştir (128).

Ülkemizden rapor edilen ilk doğrulanmış TOSV enfeksiyonu olguları, 2009 yılında nedeni bilinmeyen merkezi sinir sistemi enfeksiyonu saptanan olgularının incelenmesi ile Ankara ilinden bildirilmiştir (125). Bu çalışmada Ankara, Konya ve Eskişehir illerinden 16 akut enfeksiyon olgusu viral RNA saptanması ile tanımlanmış, olguların ağırlıklı olarak menenjit bulguları ile izlendiği ortaya konmuştur. Virusa ait S ve L kısmi segmentlerinden elde edilen kısmi diziler, Türkiye'de bulunan TOSV izolatlarının, İtalya ve Fransa'nın bir bölümünde bulunan TOSV genotip A suşlarına yakınlığını ortaya koymuştur. Aynı çalışmada sağlıklı kan donörleri de araştırılmış, Ankara, Konya, Eskişehir ve Zonguldak illerinde ikamet eden donörlerde TOSV'a ek olarak SFSV ve SFNV maruziyetleri de doğrulanmıştır. Takip eden bir başka serosürveyans çalışmasında, TOSV maruziyeti Ankara iline ek olarak az sayıda örnek incelenmekle birlikte Kırıkkale, Çorum, Kastamonu, Samsun, Mardin, Van, Gaziantep, Urfa, Adıyaman, Hatay, Mersin illerinde yaşayan kan donörlerinde gösterilmiştir (129). Bu çalışmada TOSV maruziyetinin yaş ile artış gösterdiği saptanarak erkek cinsiyet, dış ortamda çalışma, kırsal alanda ikamet etme ve çevrede sık olarak sivrisinek/kum sineği izlenmesi, virusa maruziyet açısından risk faktörleri olarak tanımlanmıştır. Ankara ve İzmir illerinde ağırlıklı olarak menenjit bulguları ile seyreden muhtemel TOSV olguları 2010 yılında da bildirilmiştir (76). Aynı yılda Kırıkkale ilinde 20 kişiyi etkileyen bir ateşli hastalık salgınında 11 olguda SFSV/SFNV IgM antikoru saptanmış, (130). Kahramanmaraş ilinde ortaya çıkan bir diğer salgında ise etken olarak SFSV gösterilmiştir (131). Trakya bölgesinde Edirne ve Kırklareli illerinde de TOSV olguları, 2012 yılında ilk kez rapor edilmiştir (132). Tüm bu veriler SFSV-SFNV ve yerel varyant SFTV'ye ek olarak TOSV enfeksiyonlarının da ülkemizde yaygın olarak görüldüğüne işaret etmektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Sivrisinek ve Kum Sineklerinin Örneklenmesi

Çalışmada kullanılacak sivrisinek ve kum sineklerinin toplanması amacıyla, Ankara ili çevresinde 2012 yılı yaz sezonu içerisinde arazi çalışmaları yapılmıştır. Örnek toplanması için İmrahor (Bölge 1), Yakupabdal (Bölge 2), Örencik (Bölge 3), Tulumtaş (Bölge 4), Kazan (Bölge 5) ve Ovacık (Bölge 6) ilçe ve semtleri belirlenmiştir. Önceki incelemelerde sivrisinek ve kum sineği yayılımı olduğu belirlenen bölgeler ayrıca BNV ya da Phlebovirus enfeksiyonu olguları ile ilişkili bölgeler ve çevreleri örnekleme dahil edilmiştir. Küresel konumlama sistemi (GPS) ile örnekleme yapılan lokalitelerin konum bilgileri kayıt altına alınmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Sivrisinek ve kum sineği örnekleme yapılan ilçe ve bölgeler

Örnekleme, seçilen 6 bölgede yer alan toplam 19 lokalitede gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.1). Örnekleme yapılması amacıyla belirlenen evler, her bir lokalitede bölgenin genel özelliklerini yansıttığı için seçilmiştir. Ayrıca evler seçilirken, özellikle kum sineklerinin üreme ve dinlenme ortamını oluşturan ahır, kümes gibi alanlara sahip olmalarına dikkat edilmiştir.

Tablo 3.1 Sivrisinek ve kum sineği örnekleme yapılan bölgeler ve özellikleri

Bölge	Lokalite	Koordinat (K)	Koordinat (D)	Yükseklik (m)	Semt/İlçe	Ortalama Sıcaklık		
						Temmuz	Ağustos	Eylül
Bölge 1	L1	0491902	4416905	913	Mamak	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C
	L2	0491723	4416962	900	Mamak	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C
Bölge 2	L3	0495418	4409289	1318	Çankaya	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C
	L4	0495936	4409341	1381	Çankaya	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C
Bölge 3	L5	0485859	4403754	1024	Gölbaşı	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C
	L6	0485995	4403852	1024	Gölbaşı	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C
	L7	0485995	4403852	1024	Gölbaşı	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C
Bölge 4	L8	0470013	4401019	1252	Gölbaşı	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C
	L9	0469996	4401264	1244	Gölbaşı	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C
	L10	0470449	4401062	1247	Gölbaşı	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C
Bölge 5	L11	0467812	4439334	841	Kazan	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C
	L12	0467812	4439334	841	Kazan	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C
	L13	0467812	4439334	841	Kazan	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C
Bölge 6	L14	0483739	4428882	976	Keçiören	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C
	L15	0483739	4428882	976	Keçiören	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C
	L16	0483637	4428858	1005	Keçiören	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C
	L17	0485636	4428940	988	Keçiören	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C
	L18	0485636	4428940	988	Keçiören	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C
	L19	0485636	4428940	988	Keçiören	23.5 °C	23.3 °C	18.7 °C

Örnekleme 3-6 Temmuz, 31 Temmuz - 3 Ağustos ve 7-8 Eylül tarihlerinde, toplam 10 gün olacak şekilde yapılmıştır. Örneklemede CDC

standart minyatür ışık tuzakları ("air-actuated gate" v.1.30 ile donatılmış Model 1012; John W. Hock Company, Gainesville, ABD) kullanılmıştır. Işık tuzakları, organizmaların uzaktan dikkatini çekebilmekte ve birçok farklı organizmayı aynı anda örnekleme imkanı vermektedir. Örnekleme yapılan günlerde ışık tuzakları, saat 17.00'den sonra, özellikle ahır ve kümes içleri başta olmak üzere, tezek alanları ve odunluk gibi ayrılan bölgelere, yerden 1,5 m. yükseklikte olacak şekilde asılmıştır (Şekil 3.2). Takip eden günün sabahında tuzakta bulunan örnekler toplanmış; tuzak bataryaları yenilenmiş ve bir sonraki günün sabahına kadar yerinde bırakılmıştır. Son örnekleme tarihinin ertesi gününde tuzaklar, örneklerle birlikte yerinden alınmıştır. Örnekleme amacıyla kullanılan bütün malzemeler, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Ekoloji Anabilim dalı tarafından temin edilmiştir.



Şekil 3.2 Sivrisinek ve kum sineği örnekleme için ışık tuzaklarının yerleştirilmesi (A: Bölge 1 Lokalite 1, B: Bölge 1 Lokalite 2)

Her örnekleme sonunda yakalanan sivrisinek ve kum sineği örnekleri, buz aküleri kullanılarak canlı olarak Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Ekolojik Bilimler Araştırma Laboratuvarına (EBAL) nakledilmiş, cinsiyete göre ayrımları yapılmış, lokalite, yer ve tarihlerine göre gruplandırılmıştır. Tüm sivrisinekler, yayınlanmış anahtarlar ile morfolojik olarak tür düzeyinde tanımlanmış (132,133), ardından lokalite ve tarihlere göre 1-18 birey içerecek şekilde havuzlanmıştır. Dişi kum sineklerinin morfolojik tanımlanması cins düzeyinde yapıldıktan sonra her birey eppendorf tüplerine ayrılmış, erkek bireyler ise tür tayini için %96'lık etanol içersine alınmıştır. Kum sineklerinin morfolojik incelemelerinde de yayınlanmış anahtarlar kullanılmış (134,135,136), tüm sivrisinek ve kum sineği örneklerinin morfolojik incelemeleri EBAL'de uzmanlar gözetiminde yapılmıştır. Virolojik incelemeler için sivrisinek havuzları ve dişi kum sinekleri buz içerisinde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarına nakledilmiş ve diğer işlemlere kadar - 80°C'de saklanmıştır.

3.2 Örneklerin Homojenizasyonu ve RNA Saflaştırılması

Sivrisinek havuzları buz üzerinde fosfat tamponu içerisinde, 1-5 adet 4.5 mm çaplı çelik bilyeler; kum sinekleri ise hacimlerinin yaklaşık 3 katı olacak şekilde eklenen 1.0 mm'lik düzensiz kenarlı demir tozu eklenerek vortekslenmek suretiyle (Velp Rx3, İtalya) homojenize edilmiştir. Tüm örnekler 4.000 rpm'de 4 dakika santrifüjlenerek (Hettich Mikro12-24, Almanya) süpernatant alıktolanarak RNA saflaştırması ve antijen saptanması amacıyla kullanılmıştır.

Homojenize edilen örneklerde RNA saflaştırma işlemleri, ticari bir spin kolon nükleik asit ekstraksiyon kiti olan "High Pure Viral Nucleic Acid Kit " (Roche Diagnostics, Almanya) ile üretici talimatları doğrultusunda yapılmıştır:

- 1.200 µl hacmindeki her örneğe, poli(A) taşıyıcı RNA solüsyonu ve proteinaz K içeren 200 µl bağlanma solüsyonu [*Binding Buffer (BB)*]; 6 M guanidin-

- HCL, 10 mM üre, 10 mM Tris-HCL, %20 Triton X-100, pH: 4.4 (25°C)] eklenerek karıştırılmıştır.
- 2.Ardından ısı bloğunda 72°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
 - 3.İnkübasyon sonrasında tüpler spin santrifüj edilmiştir. Santrifüjü takiben 100 µl BB eklenerek tüplere aktarılmış ve 1 dakika süreyle 12.000 rpm'de santrifüj uygulanmıştır.
 - 4.Tüplere 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı solüsyon [*Inhibitor Removal Buffer*; saf alkolde 5 M guanidin-HCL, 20 mM Tris-HCL, pH: 6.6 (25°C)] eklenmiş ve 1 dakika süreyle 12.000 rpm'de santrifüj uygulanmıştır.
 - 5.Sonrasında 450 µl yıkama solüsyonu [*Wash Buffer (WB)*; saf alkolde 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCL, pH: 7.5 (25°C)] ile örnekler iki kez yıkanmıştır.
 - 6.Önceden ısı bloğunda ısıtılmış ayrıştırma solüsyonundan 50 µl [*Elution Buffer*; 10 mM Tris-HCL, pH: 8.5 (25°C)] eklenmiş ve 1 dakika süreyle 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
 - 7.Elde edilen nükleik asitler +4 °C'de bir sonraki işleme kadar saklanmıştır.

3.3 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Komplementer DNA (cDNA) sentezi, ticari bir sistem olan "Thermo Scientific RevertAid® First Strand cDNA Synthesis Kit" ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda, homojenizasyon ve nükleik asit saflaştırılması sonucunda elde edilen total RNA kullanılarak yapılmıştır:

- 1.Total RNA'dan 6 µl, 1 µl randomize hegzamer primerler (100 µM, 0.5 µg/µl) ile buz üzerinde karıştırılmış; üzerine 6 µl nükleaz içermeyen su eklenerek son hacim 13 µl'ye tamamlanmıştır.
- 2.Hazırlanan karışım 70°C'de 5 dakika inkübe edilmiş ve sonrasında buza alınmıştır.
- 3.Buz üzerinde 5 x "Reaction Buffer" (250 mM Tris-HCL, pH: 8.3; 250 mM Tris-KCL, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT)'dan 4µl, 10 mM dNTP karışımından (deoksi adenin, guanin, sitozin ve timin trifosfatlar içeren) 2 µl ve "M-MuLV Reverse Transcriptase" enziminden (200 u/µL) 1 µl eklenmiştir.
- 4.Karışım 25 °C'de 5 dakika, 42°C'de 60 dakika olacak şekilde inkübe edilmiş; 70°C'de 5 dakika tutularak reaksiyon sonlandırılmıştır.
- 5.Hazırlanmış olan cDNA'lar ileri işlemlere devam edilecekse +4°C'de, değilse -20°C'de saklanmıştır.

3.4 Sivrisinek Örneklerinde Batı Nil Virusu RNA'sının Araştırılması

Oluşturulan sivrisinek havuzlarında BNV RNA'sının saptanması amacıyla viral zarf glikoproteinlerini hedefleyen iki turlu ("nested") PCR protokolü uygulanmıştır (137). Bu amaçla PCR karışımı örnek başına, 2.0 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTP ve her bir primerden 10 pmol içerecek şekilde 1.5 ml'lik ependorf tüpünde PCR karışımı hazırlanmıştır (Tablo 3.3). Örnek sayısına göre hazırlanan karışım, vorteks cihazında hafifçe karıştırılıp 3000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildikten sonra, her bir örneğe ait ve üzerinde numaraları yazılı steril 0.2 ml'lik PCR tüplerine 27 µl olacak şekilde paylaştırılmıştır. Daha sonra üstlerine 3'er µl DNA örneği konulup ısı döngü cihazına (Techne® TC-3000, Techne Inc., ABD) yerleştirilmiştir (Tablo 3.2). PCR protokolünün birinci ve ikinci turları aynı karışım içeriği ve sıcaklık döngüleri ile gerçekleştirilmiştir. İkinci tur

PCR karışımında nükleaz içermeyen su 20.3 µl'ye çıkarılmış, ikinci tur primerleri ve ilk turdan 1 µl örnek ile amplifikasyona alınmıştır.

Tablo 3.2 İki Turlu BNV PCR için Kullanılan Primer Dizileri ve Genomdaki Yerleşimleri (138).

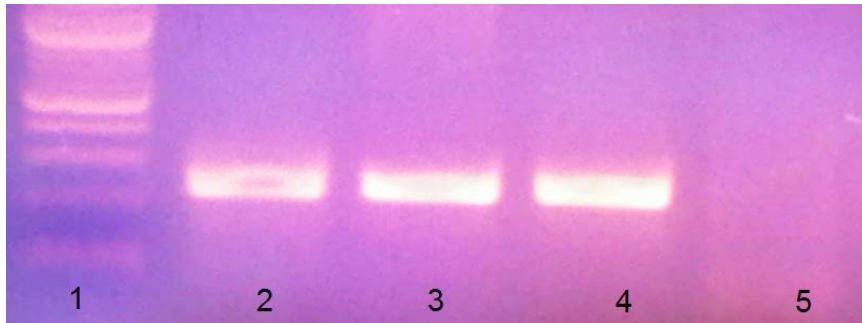
1. Tur	5' - ACC ACC TAC TGT GGA GTC- 3'	(1401-1419 nt)
	5' - TTC CAT CTT CAC TCT ACA CT - 3'	(1845-1825 nt)
2. Tur	5' - GCC TTC ATA CAC ACT AAA - 3'	(1485-1504 nt)
	5' - CCA ATG CTA TCA CAG ACT - 3'	(1732-1713 nt)

Tablo 3.3 İki turlu BNV PCR için karışım içeriği ve reaksiyon koşulları

Bileşenler		Koşullar
10X Tampon	3 µl	94°C' de 5 dakika 94°C' de 30 saniye 55°C' de 1 dakika 72°C' de 1 dakika 72°C' de 10 dakika 40 döngü
MgCl ₂	2 µl	
dNTP	1 µl	
Primer1	1 µl	
Primer2	1 µl	
Taq Polimeraz	0.3 µl	
DdH ₂ O	18.3 µl	
Kalıp DNA	3 µl	
Toplam hacim	30 µl	

PCR ürünlerin görüntülenmesi için %2'lik agaroz jelde elektroforez yöntemi uygulanmıştır. Bunun için 0.8 gr agaroz 40 ml 1X Tris asetat -EDTA (TAE) [50x TAE: 242 gr Tris baz + 57.1 ml asetik asit + 100 ml 0.5M EDTA (pH: 8) + 600 ml distile su → pH 7.8'e ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve 50 kat sulandırılarak kullanılmıştır] solüsyonu ile karıştırılıp mikrodalga fırında (Arçelik MD551, Türkiye) homojen şeffaf hale gelinceye kadar ısıtılmıştır. Tarakların yerleştirildiği jel tepsinde dökülmeden önce 2 µl

etidyum bromür solüsyonu (10 mg/ml) eklenmiş, jel katılaşıncaya kadar oda ısısında bekletilmiş; daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek PCR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirilmiştir. PCR işlemi tamamlanarak 4°C'de bekletilen örneklerden 5'er µl alınarak parafilm üzerinde 1 µl yükleme tamponu (100 mg Orange G + 55 ml gliserol + 45 ml 1x TAE ile hazırlanmış stok solüsyondan) ile iyice karıştırılmıştır. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra örnekler 100 Volt'luk doğru akımda (Owl Lightning Volt OSP-300, ABD) 30 dakika yürütülmüştür. Elektroforez sonrası jel görüntüleme cihazında (Biospectrum 500 Imaging System, İngiltere) ultraviyole ışık altında incelenmiştir. İkinci tur sonucu beklenen yaklaşık 248 nükleotidlik ampikonların izlendiği örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir. Vero hücrelerinde (ATCC CCL81) üretilmiş BNV NY99-4132 izolatı, örneklerle aynı saflaştırma işlemlerine alınarak PCR çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 3.3).



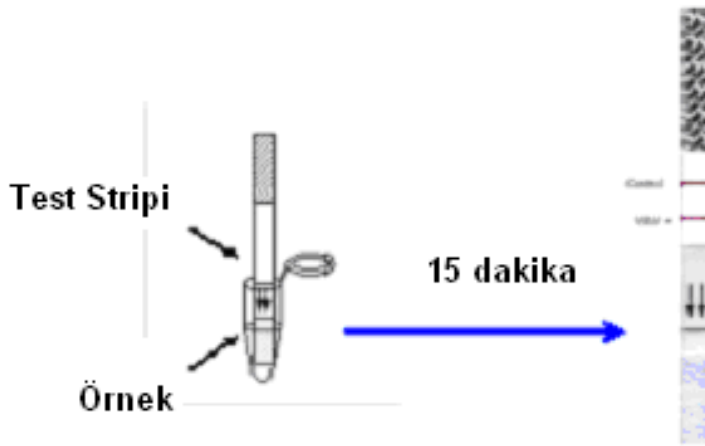
Şekil 3.3 BNV PCR ikinci turu ampikonlarının agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi (1: Moleküler ağırlık belirteci "100 bp ladder", 2-4 pozitif kontrollere (248bp), 5: negatif kontrol)

3.5 Sivrisinek Örneklerinde Batı Nil Virus Antijenlerinin Araştırılması

Toplanan sivrisinek örneklerinde BNV antijenlerinin araştırılması amacıyla "VecTest® West Nile Virus (WNV) Antigen Assay" adlı ticari sistem, üretici firmanın talimatları doğrultusunda kullanılmıştır (Şekil 3.4) .

1. Önceden homojenizasyon işlemi uygulanan sivrisinek havuzları, kit içerisinde bulunan tüplere, her biri 250 µl olacak şekilde ayrılmıştır.

2. Tüplerin üzerine 250 µl "Grinding Solution" eklenmiş ve 1 dakika süreyle vortekslenmiştir.
3. Kit içerisinde bulunan "test strip"leri tüplere yerleştirilmiş ve 15 dakika beklenmiştir.
4. Süre sonunda toplanan "test strip"leri, örnek resimle karşılaştırılıp, test sonuçları belirlenmiştir.



Şekil 3.4 "VecTest® BNV ticari antijen saptama testinin uygulama şeması

3.6 Kum Sineği Örneklerinde Phlebovirus-Toskana Virus RNA'sının Araştırılması

Toplanan dişi kumsineği bireylerinde TOSV ve diğer phlebovirusların saptanması amacıyla, Phlebovirus cinsinin tüm üyelerini amplifiye edebilme özelliğine sahip, virusun L genomik segmentinde yer alan RNA polimeraz genini hedefleyen bir Pan-Phlebovirus PCR yaklaşımı uygulanmıştır (93).

Bu amaçla örnek başına 2.0 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTP ve her bir primerden 10 pmol içerecek şekilde 1.5 ml'lik ependorf tüpünde PCR karışımı hazırlanmıştır (Tablo 3.5). Örnek sayısına göre hazırlanan karışım, vorteks cihazında hafifçe karıştırılıp 3000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildikten sonra, her bir örneğe ait ve üzerinde numaraları yazılı steril 0.2 ml'lik PCR tüplerine 27 µl olacak şekilde paylaştırılmıştır. Daha sonra üstlerine 3'er µl DNA örneği

konulup ısı döngü cihazına (Techne TC-3000, ABD) yerleştirilmiştir (Tablo 3.2). PCR protokolünün birinci ve ikinci turları aynı karışım içeriği ve sıcaklık döngüleri ile gerçekleştirilmiştir. İkinci tur PCR karışımında nükleaz içermeyen su 20.3 µl'ye çıkarılmış, ikinci tur primerleri ve ilk turdan 1 µl örnek ile amplifikasyona alınmıştır.

Tablo 3.4 İki Turlu Pan-Phlebovirus PCR için Kullanılan Primer Dizileri ve Viral genomdaki yerleşimleri (93).

1. Tur	5' - ATGGARGGITTTGTIWSICIICC - 3'	(2047-2069 nt)
	5' - AARTTRCTIGWIGCYTTIARIGTIGC - 3'	(2600-2575 nt)
2. Tur	5' - WTICCIAAICCIYMSAARATG - 3'	(2074-2094 nt)
	5' - TCYTCYTRTTYTTRARRTARCC - 3'	(2318-2296 nt)

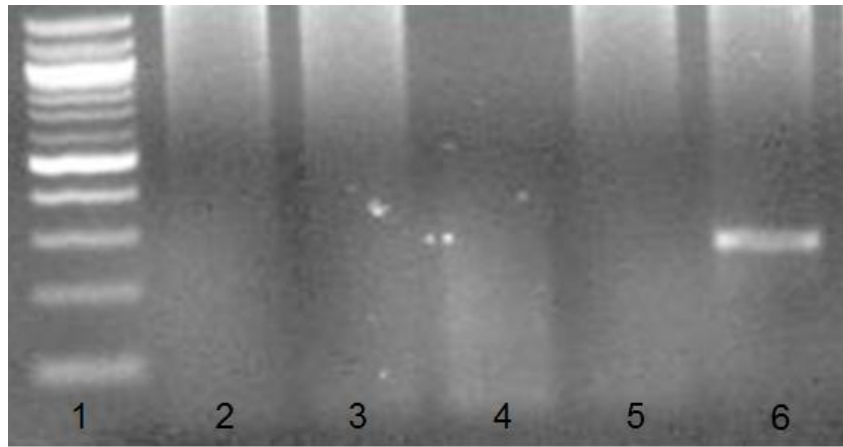
I:İnozin, Y:C/T, R:A/G, W:G/C, M:A/C

Tablo 3.5 Pan-Phlebovirus "nested PCR" karışım içeriği ve reaksiyon koşulları

Bileşenler		Koşullar
10X Tampon	3 µl	95°C' de 5 dakika 95°C' de 30 saniye 44°C' de 1 dakika 72°C' de 1 dakika 72°C' de 3 dakika 40 döngü
MgCl ₂	2 µl	
dNTP	1 µl	
Primer1	1 µl	
Primer2	1 µl	
Taq Polimeraz	0.3 µl	
ddH ₂ O	18.3 µl	
Kalıp DNA	3 µl	
Toplam hacim	30 µl	

PCR ürünlerinin görüntülenmesi için %2'lik agaroz jelde elektroforez yöntemi uygulanmıştır. Bunun için 0.8 gr agaroz 40 ml 1X TAE -EDTA solüsyonu ile karıştırılıp mikrodalga fırında homojen şeffaf hale gelinceye kadar ısıtılmıştır. Tarakların yerleştirildiği jel tepsisine dökülmeden önce 2 µl etidyum bromür solüsyonu (10 mg/ml) eklenmiştir. Jel katılaşıncaya kadar oda ısısında

bekletilmiş; daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek PCR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirilmiştir. PCR işlemi tamamlanarak 4°C'de bekletilen örneklerden 5'er µl alınarak parafilm üzerinde 1 µl yükleme tamponu (100 mg "Orange G" + 55 ml gliserol + 45 ml 1x TAE ile hazırlanmış stok solüsyondan) ile karıştırılmıştır. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklenmiştir. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra örnekler 100 Volt'luk doğru akımda (Owl Lightning Volt OSP-300, ABD) 30 dakika yürütülmüştür. Elektroforez sonrası jel görüntüleme cihazında (Biospectrum 500 Imaging System, İngiltere) ultraviyole ışık altında incelenmiştir. İkinci tur sonucu beklenen yaklaşık 244 nükleotidlik amplikonların izlendiği örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir. Vero hücrelerinde (ATCC CCL81) üretilmiş standart TOSV izolatu TOSV ISS.Phl.3, örneklerle aynı saflaştırma işlemlerine alınarak PCR çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 3.5).

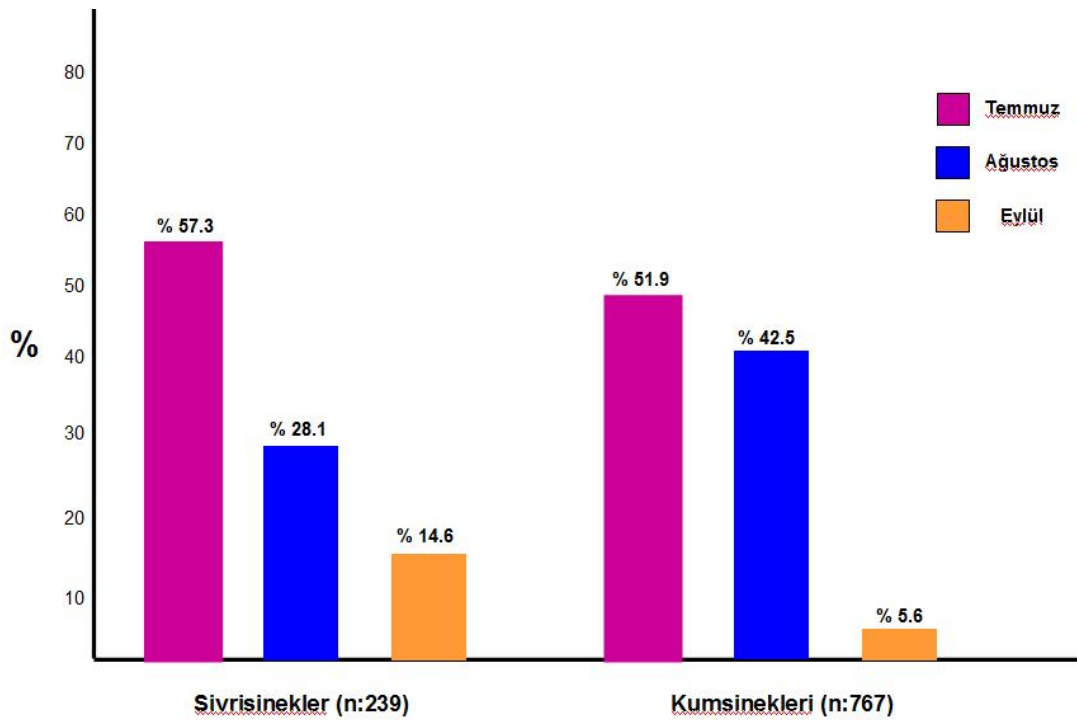


Şekil 3.5 Pan-Phlebovirus PCR ikinci turu amplikonlarının agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi (1: Moleküler ağırlık belirteci "100 bp ladder", 2-4: negatif örnekler, 5: negatif kontrol; 6: pozitif kontrol (244bp)).

4. Bulgular

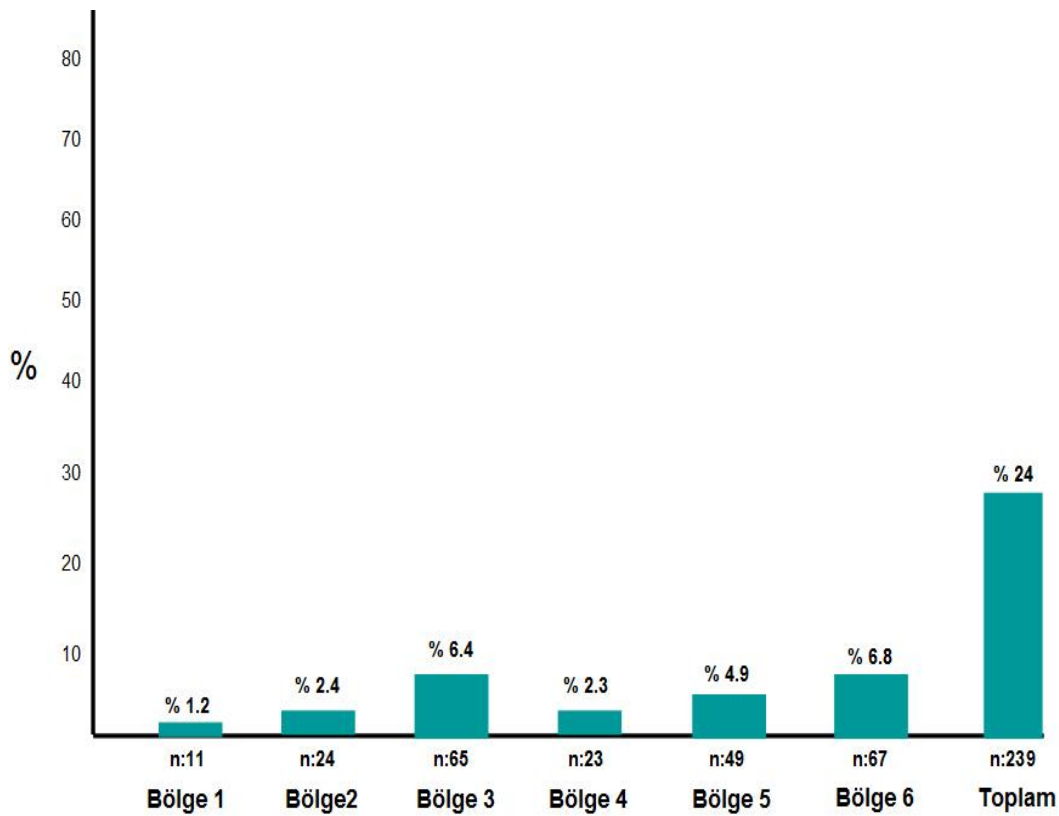
4.1 Toplanan Örneklerde Sayı ve Dağılım

2012 yılında Ankara ilinde belirlenen 19 lokaliteden, 10 günlük süre boyunca yapılan örnekleme sonucunda, 239 (%23.75) adet sivrisinek ve 767 adet (%76.25) kum sineği olmak üzere toplam 1006 örnek toplanmıştır. Temmuz ayı süresince örneklenen toplam sivrisinek ve kum sineği sayısı sırasıyla 137 (%57.3) ve 398 (%51.9), Ağustos ayı süresince örneklenen toplam sivrisinek ve kum sineği sayısı 67 (%28.1) ve 326 (%42.5), Eylül ayı süresince örneklenen toplam sivrisinek ve kum sineği sayısı ise 35 (%14.6) ve 43 (%5.6) olarak saptanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Örnekleme süresince toplanan sivrisinek ve kum sineklerinin aylara göre dağılımı

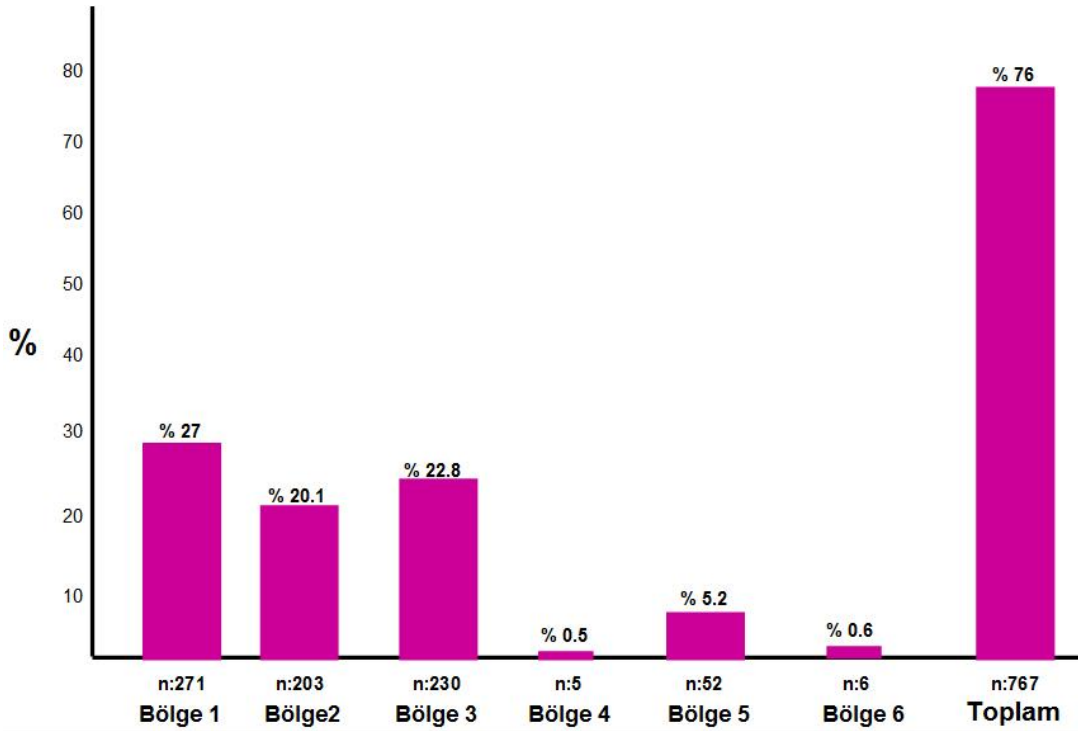
Örnekleme süresince toplanan 1006 sivrisinek ve kum sineğinin 295'i (%29.3) Bölge 3, 282'si (%28) Bölge 1, 227'si (%22.6) Bölge 2, 101'i (%10) Bölge 5, 73'ü (%7.3) Bölge 6 ve 28'i (%2.8) Bölge 4'de yer alan lokalitelerden toplanmıştır. Bölgelere göre sivrisinek ve kumsineği sayıları Şekil 4.2. ve 4.3.'de verilmektedir.



Şekil 4.2 Örnekleme süresince toplanan sivrisineklerinin bölgelere göre dağılımı

Örnekleme sezonu boyunca toplanan 239 sivrisineğin cinsiyet dağılımları 61 erkek (%25.5) ve 178 dişi (%74.5) olarak tespit edilmiştir. Morfolojik tür tayini sonucunda, toplanan örneklerin 5 farklı türe ait oldukları tespit edilmiş; en yaygın olarak tespit edilen türün *Culex pipiens* (178/239, %74.4) olduğu belirlenmiş, bunu sırasıyla *Anopheles maculipennis* (50/239, %20.9), *Anopheles claviger* (5/239, %2.1), *Culiseta annulata* (4/239, %1.6) ve *Culex theileri* (2/239,

%1) takip etmiştir. Sivrisinek örneklerinin bölge ve örnekleme zamanında göre dağılımları Tablo 4.1 ve 4.2'de verilmektedir (sayfa 44).



Şekil 4.3 Örnekleme süresince toplanan kum sineği örneklerinin bölgelere göre dağılımı

Örnekleme sezonu boyunca toplanan 767 kum sineğinin cinsiyet dağılımı 383 (%49.9) dişi, 384 (%50.1) erkek olarak izlenmiştir. Morfolojik tür tayinleri sonucunda erkek bireylerde toplamda 8 farklı tür saptanmış ve bunların içinde de en yaygın olan türün *Phlebotomus papatasi* (139/384, %36.2) olarak belirlenmiştir. Bunu sırasıyla *Phlebotomus halepensis* (105/384, %27.3), *Phlebotomus major* s.l. (74/384, %19.3), *Phlebotomus sergenti* (34/384, %8.9), *Phlebotomus perfiliewi* (17/384, %4.4), *Phlebotomus simici* (10/384, %2.6), *Phlebotomus tobbi* (3/384, %0.8) ve *Sergentomyia* sp. (2/384, %0.6) takip etmiştir. Kum sineği örneklerinin bölge ve örnekleme zamanında göre dağılımları Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'da verilmektedir.

Tablo 4.1 Örnekleme bölgesine göre sivrisineklerin dağılımı

Bölgeler	Bölge 1				Bölge 2				Bölge 3				Bölge 4				Bölge 5				Bölge 6				Toplam	
	♀	♂	#	%	♀	♂	#	%	♀	♂	#	%	♀	♂	#	%	♀	♂	#	%	♀	♂	#	%	#	%
<i>Cx. pipiens</i>	5	3	8	72.7	4	1	5	20.8	47	1	48	73.8	3	0	3	13	42	5	47	96	18	49	67	100	178	74.5
<i>A. maculipenni</i>	3	0	3	27.3	13	0	13	54.2	17	0	17	26.2	14	1	15	65.2	2	0	2	4	0	0	0	0	50	20.9
<i>A. claviger</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	5	21.8	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2.1
<i>Cl. annulata</i>	0	0	0	0	4	0	4	16.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1.7
<i>Cx. theileri</i>	0	0	0	0	2	0	2	8.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.8
Toplam	8	3	11	100	23	1	24	100	64	1	65	100	22	1	23	100	44	5	49	100	18	49	67	100	239	100

Tablo 4.2 Örnekleme zamanına göre sivrisineklerin dağılımı

Türler	Temmuz				Ağustos				Eylül				Toplam	
	♀	♂	#	%	♀	♂	#	%	♀	♂	#	%	#	%
<i>Cx. pipiens</i>	53	52	105	77	36	5	41	61	29	3	32	91	178	74.5
<i>A. maculipennis</i>	26	1	27	20	20	0	20	30	3	0	3	9	50	20.9
<i>A. claviger</i>	5	0	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2.1
<i>Cl. annulata</i>	0	0	0	0	4	0	4	6	0	0	0	0	4	1.7
<i>Cx. theileri</i>	0	0	0	0	2	0	2	3	0	0	0	0	2	0.8
Toplam	84	53	137	100	62	5	67	100	32	3	35	100	239	100

Tablo 4.3 Tür tayini yapılan erkek kum sineklerinin örnekleme bölgelerine göre dağılımı

Türler	Bölge 1		Bölge 2		Bölge 3		Bölge 4		Bölge 5		Bölge 6		Toplam	
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
<i>P. papatasi</i>	11	9.3	25	20.2	103	83.1	0	0	0	0	0	0	139	36.2
<i>P. major s.l.</i>	59	49	14	11.3	1	0.8	0	0	0	0	0	0	74	19.3
<i>P. tobbi</i>	2	1.6	0	0	1	0.8	0	0	0	0	0	0	3	0.8
<i>P. perfiliewi</i>	3	2.5	0	0	1	0.8	0	0	12	100	1	100	17	4.4
<i>P. halepensis</i>	1	0.8	85	68.5	16	12.9	3	100	0	0	0	0	105	27.3
<i>P. simici</i>	9	7.5	0	0	1	0.8	0	0	0	0	0	0	10	2.6
<i>P. sergenti</i>	33	28	0	0	1	0.8	0	0	0	0	0	0	34	8.9
<i>Sergentomyia sp.</i>	2	1.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.5
Toplam	120	100	124	100	124	100	3	100	12	100	1	100	384	100

Tablo 4.4 Tür tayini yapılan erkek kum sineklerinin örnekleme zamanına göre dağılımı

Türler	Temmuz		Ağustos		Eylül		Toplam	
	#	%	#	%	#	%	#	%
<i>P. papatasi</i>	83	40.3	50	29.9	6	54.6	139	36.2
<i>P. major s.l.</i>	47	22.8	23	13.8	4	36.4	74	19.3
<i>P. tobbi</i>	1	0.5	2	1.2	0	0	3	0.8
<i>P. perfiliewi</i>	14	6.8	3	1.8	0	0	17	4.4
<i>P. halepensis</i>	19	9.2	85	50.9	1	9	105	27.3
<i>P. simici</i>	8	3.9	2	1.2	0	0	10	2.6
<i>P. sergenti</i>	32	15.5	2	1.2	0	0	34	8.9
<i>Sergentomyia sp.</i>	2	1	0	0	0	0	2	0.5
Toplam	206	100	167	100	11	100	384	100

4.2 Toplanan Sivrisinek Örneklerinde Virus İncelemeleri

BNV saptanması için tür tayini sonrası sivrisinekler tarih, lokalite ve tür dağılımlarına göre havuzlanarak toplam 65 havuz halinde incelemeye alınmıştır. Virus araştırılması için incelenen havuzların birey sayısı ve diğer özellikleri Tablo 4.5, 4.6 ve 4.7'de verilmektedir. İncelenen tüm havuzlar BNV antijenleri ve viral RNA açısından negatif olarak izlenmiştir.

Tablo 4.5 Örnekleme bölgeleri 1 ve 2 kaynaklı sivrisinek havuzları ve özellikleri

Bölge	Havuz No	Lokalite	Tarih	Birey sayısı	Tür Dağılımı	Cinsiyet
1	1	L1	7/4/2012	2	Cx. pipiens	♀
	2	L1	7/31/2012	1	Cx. pipiens	♂
	3	L1	8/1/2012	1	Cx. pipiens	♀
	4	L1	9/7/2012	1	Cx. pipiens	♂
	5	L1	9/8/2012	1	Cx. pipiens	♂
	6	L2	7/5/2012	2	Cx. pipiens	♀
	7	L2	7/5/2012	3	An. maculipennis	♀
2	8	L3	7/6/2012	1	Cx. pipiens	♀
	9	L3	8/1/2012	1	Cx. pipiens	♂
	10	L3	9/7/2012	1	Cx. pipiens	♀
	11	L4	7/4/2012	1	Cx. pipiens	♀
	12	L4	7/31/2012	1	Cx. pipiens	♀
	13	L4	7/31/2012	5	An. maculipennis	♀
	14	L4	7/31/2012	3	Culiseta annulata	♀
	15	L4	8/1/2012	1	An. maculipennis	♀
	16	L4	8/1/2012	1	Culiseta annulata	♀
	17	L4	8/1/2012	2	Cx. theileri	♀
	18	L4	8/3/2012	6	An. maculipennis	♀
	19	L4	9/7/2012	1	An. maculipennis	♀

Tablo 4.6 Örnekleme bölgesi 3 kaynaklı sivrisinek havuzları ve özellikleri

Bölge	Havuz No	Lokalite	Tarih	Birey sayısı	Tür Dağılımı	Cinsiyet
3	20	L6	7/5/2012	3	Cx. pipiens	♀
	21	L6	7/5/2012	5	An. maculipennis	♀
	22	L6	7/6/2012	1	Cx. pipiens	♀
	23	L6	7/6/2012	1	An. maculipennis	♀
	24	L6	7/31/2012	10	Cx. pipiens	♀
	25	L6	7/31/2012	3	An. maculipennis	♀
	26	L6	8/1/2012	4	Cx. pipiens	♀
	27	L6	8/1/2012	1	An. maculipennis	♀
	28	L6	8/2/2012	2	An. maculipennis	♀
	29	L6	8/2/2012	8	Cx. pipiens	♀
	30	L6	8/3/2012	3	Cx. pipiens	♀
	31	L6	9/7/2012	1	Cx. pipiens	♂
	32	L6	9/7/2012	1	An. maculipennis	♀
	33	L7	7/3/2012	1	An. maculipennis	♀
	34	L7	7/4/2012	3	Cx. pipiens	♀
	35	L7	7/6/2012	7	Cx. pipiens	♀
	36	L7	7/31/2012	3	Cx. pipiens	♀
	37	L7	8/1/2012	3	Cx. pipiens	♀
	38	L7	8/2/2012	1	Cx. pipiens	♀
	39	L7	8/2/2012	2	An. maculipennis	♀
	40	L7	9/7/2012	1	Cx. pipiens	♀
41	L7	9/7/2012	1	An. maculipennis	♀	

Tablo 4.7 Örnekleme bölgeleri 4, 5 ve 6 kaynaklı sivrisinek havuzları ve özellikleri

Bölge	Havuz No	Lokalite	Tarih	Birey sayısı	Tür Dağılımı	Cinsiyet
4	42	L8	7/4/2012	8	An. maculipennis	♀
	43	L8	7/4/2012	1	An. claviger	♀
	44	L8	7/6/2012	3	An. maculipennis	♀
	45	L8	7/6/2012	4	An. claviger	♀
	46	L9	7/4/2012	1	Cx. pipiens	♀
	47	L9	7/4/2012	3	An. maculipennis	♀
	48	L9	7/5/2012	1	An. maculipennis	♂
	49	L10	7/4/2012	2	Cx. pipiens	♀
	5	50	L11	7/3/2012	1	An. maculipennis
51		L12	7/5/2012	3	Cx. pipiens	♂
52		L12	7/31/2012	2	Cx. pipiens	♂
53		L12	9/7/2012	12	Cx. pipiens	♀
54		L13	7/5/2012	10	Cx. pipiens	♀
55		L13	7/6/2012	1	An. maculipennis	♀
56		L13	8/2/2012	6	Cx. pipiens	♀
57		L13	9/7/2012	14	Cx. pipiens	♀
6	58	L14	7/6/2012	3	Cx. pipiens	♀
	59	L15	7/4/2012	16	Cx. pipiens	♂
	60	L16	7/5/2012	9	Cx. pipiens	♂
	61	L16	7/6/2012	2	Cx. pipiens	♀
	62	L18	7/4/2012	5	Cx. pipiens	♀
	63	L18	7/5/2012	18	Cx. pipiens	♂
	64	L18	7/6/2012	8	Cx. pipiens	♀
	65	L19	7/6/2012	6	Cx. pipiens	♂

4.3 Toplanan Kum sineği Örneklerinde Phlebovirus-TOSV İncelemeleri

Örnekleme sezonu boyunca toplanan 383 dişi kum sineği (383/767, %49.9), Phlebovirus ve TOSV RNA'sının saptanması amacıyla bireysel olarak işleme alınmıştır. İncelenen dişi kum sineklerinin bölge ve örnekleme zamanına göre dağılımı Tablo 4.8'de verilmektedir. İşlemler sonunda tüm örnekler viral RNA'lar açısından negatif olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4.8 Virus incelemesinde kullanılan dişi kum sineklerinin örnekleme bölgelerine ve zamanına göre dağılımı

Bölgeler	Lokalite	Temmuz		Ağustos		Eylül		Toplam	
		#	%	#	%	#	%	#	%
Bölge 1	L1	38	19.8	43	27.1	8	25.1	89	23.3
	L2	49	25.5	8	5.1	5	15.6	62	16.2
Bölge 2	L3	11	5.7	5	3.0	1	3.1	17	4.4
	L4	7	3.6	55	34.6	0	0	62	16.2
Bölge 3	L5	0	0	0	0	0	0	0	0
	L6	28	14.7	28	17.6	12	37.5	68	17.7
	L7	20	10.5	13	8.2	5	15.6	38	9.9
Bölge 4	L7	2	1	0	0.0	0	0.0	2	0.5
	L8	0	0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	L9	0	0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Bölge 5	L10	2	1	0	0	0	0	2	0.5
	L11	2	1	1	0.6	0	0	3	0.8
	L12	28	14.7	6	3.8	1	3.1	35	9.1
Bölge 6	L13	0	0	0	0	0	0	0	0
	L14	2	1	0	0	0	0	2	0.5
	L15	0	0	0	0	0	0	0	0
	L16	1	0.5	0	0	0	0	1	0.3
	L17	1	0.5	0	0	0	0	1	0.3
	L18	1	0.5	0	0	0	0	1	0.3
Toplam		192	100	159	100	32	100	383	100

5.TARTIŞMA

Sivrisinekler ve kum sinekleri, insan sağlığı açısından önemli birçok hastalığın yayılması ve bulaşmasında etkili olmaktadır. Sivrisinekler, Arthropoda şubesi, Insecta sınıfı, Diptera takımında yer alan *Culicidae* ailesi içerisinde incelenmektedir (139). *Culicidae* ailesinde yer alan alt familyalardan özellikle *Anophelinae* ve *Culicinae*, insan sağlığı açısından en önemli türleri içermektedir (140). *Culicinae* alt ailesinde *Aedes*, *Uranotaenia*, *Culiseta*, *Culex*, *Mansonia*, *Coquillettidia*, *Orthopodomyia* ve *Ochlerotatus* cinsleri yer alır (141, 142). *Culicidae* ailesinde sınıflandırılan sivrisinekler, yüksek adaptasyon ve yayılım yetenekleri, ayrıca populasyon yoğunluklarını etkin bir şekilde arttırabilme özellikleri sonucu dünyada, kutuplar hariç tüm bölgelerde bulunabilmektedirler (143,144,145). Sivrisinek türleri tropikal, subtropikal ve ılıman iklim kuşaklarında bulunan ölkelerde önemli halk sağlığı sorunları oluşturan sıtma ve filariasis gibi paraziter hastalıkların yanı sıra, birçok arbovirus enfeksiyonunda da vektör rolü oynamaktadır. Bunların arasında *Bunyaviridae* ailesinde sınıflandırılan Rift vadisi ateşi virusu, *Togaviridae* ailesinde sınıflandırılan Chikungunya virusu ve *Flaviviridae* ailesinde yer alan Sarı Humma, Deng ateşi, Japon Ensefaliti, St. Louis ensefaliti ve Batı Nil virusları en önemli etkenlerdir (32). Batı Nil Virusu (BNV), sivrisineklerle bulaşan diğer arboviral enfeksiyonlar arasında, 1999 yılında Amerika kıtasına virusun geçişi ile tüm dünyada en yaygın bulunan etken haline gelmiştir (32). Virusa maruz kalan kişilerin %15-20'sinde ateşli hastalık etkeni olan BNV; ileri yaş, altta yatan hastalık varlığı gibi risk faktörlerine sahip kişilerde önemli morbidite ve mortaliteyle sonuçlanabilen merkezi sinir sistemi enfeksiyonları meydana getirmektedir (50). BNV'nin doğadaki enzootik döngüsü ormanlık ya da sulak alanlarda göçmen ya da yerleşik yabancı kuşlar ve bunlardan kan emen ornitofilik sivrisinekler arasında devam eder. Şehirler ve daha kurak bölgelerde ise peri-domestik kuşlar ve insanların da aralarında bulunduğu diğer duyarlı memeli türlerine virus, farklı beslenme davranışları göstererek köprü vektör görevi yapan sivrisinekler türleri tarafından aktarılır (32).

Farklı sivrisinek türlerinin BNV ile enfekte olma ve virüsü bulaştırma etkinlikleri farklılık göstermektedir. Yapılan çalışmalar 11 cinste yer alan (*Culex*, *Ochlerotatus*, *Aedes*, *Anopheles*, *Coquilletidia*, *Aedemomyia*, *Mansonia*, *Mimomyia*, *Psorophora*, *Culiseta* ve *Uranoteania*) 65'i aşkın sivrisinek türünün BNV ile enfekte olabileceğine işaret etmektedir (34,146,147,148). Buna karşın *Culex* cinsi sivrisinekler tüm dünyada BNV bulaşmasından sorumlu primer vektör olarak kabul edilmektedir. Virusun replikasyonu ve duyarlı türlere bulaştırılması konusunda kompetan olarak izlenen *Culex* sivrisinekleri arasında *C.pipiens*, *C.tarsalis*, *C.quinquefasciatus*, *C.stigmatosoma*, *C.thriambus* ve *C.nigripalpus* sayılmaktadır (146, 148). Çeşitli *Culex* türlerinin BNV yayılmasındaki rolü, ilgili türün beslenme tercihleri, coğrafi ve ekolojik faktörlerle ilişkili olarak değişiklik göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde birçok kuş türü ve insandan kan emme özelliğine sahip *C.tarsalis*, BNV bulaşmasında daha etkin görünürken, Avrupa ülkelerinde *C.pipiens* öne çıkmaktadır (149, 150). BNV'nin belirli bir bölgede vektör tercihinde, o bölgede bulunan ve vektör kompetansı gösteren sivrisinek türlerinin yoğunluğu, bunların beslenebileceği konakların varlığı, ayrıca bölgenin coğrafi ve iklim özellikleri etkili olmaktadır. Klinik olarak önemli diğer flaviviruslardan Deng ateşi ve sarı humma viruslarının vektörü olan *Aedes* sivrisineklerinin de BNV ile enfekte olabileceği bilinmekle birlikte, bu türler virusun doğal şartlardaki yaşam döngüsünde primer vektör olarak kabul edilmemektedir (151, 152, 153, 154). BNV enfeksiyonları, virus replikasyonu için kompetans gösteren çeşitli türlere ait sivrisineklerin doğadan toplanan erkek bireylerinde de saptanabilmektedir. Bu durum, virusun vektör türlere geçişinde dişi sivrisineklerin viremik türlerden kan emmesinin yanı sıra vertikal geçiş potansiyeline de işaret etmektedir (155).

Avrupa, Orta Doğu ve Asya'da bulunan sivrisinek türlerinin arasında *C.pipiens* s.s., *C.theileri*, *C.modestus* s.s., *C.univittatus*, *Oc.caspius* ve *An.maculipennis* s.l., BNV için vektör özelliği gösteren türlerdir ve virusun buldukları bölgelerde bulaşmasında önemli rol oynadıkları kabul edilmektedir (62). Potansiyel vektör türlerde gerçekleştirilen birçok incelemeye ait sonuçlar, bu görüşü doğrular niteliktedir. Örneğin, İtalya'da insan salgınlarının ortaya

çıktığı bir bölgenin çevresinde saptanan uygun habitatlarda, *C. pipiens* ve *Oc. caspius* türü sivrisineklerde BNV saptanmış (156); takip eden çalışmalarda enfekte sivrisineklerin yayılım gösterdiği bölgelerin genişlediği dikkati çekmiştir (157, 158). Fransa'da yapılan araştırmalar, özellikle sulak bölgelerde bulunan BNV taşınmasında *C. modestus* ve *Oc. caspius*, buna karşın şehir ve çevresindeki kırsal alanlarda virus yayılımında daha çok *C. pipiens*'in sorumlu olduğu gösterilmiştir (159). İspanya'da ise BNV genomik RNA dizileri *C. perexiguus* türü sivrisineklerde saptanmış ve bulaşmada bu türün etkili olduğu düşünülmüştür (160). Komşu Portekiz'de ise *C. pipiens*, *C. theileri* ve *An. maculipennis* türlerinin insan BNV olgularının ortaya çıkışı ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (161). Rusya'da BNV ilişkili salgınların ortaya çıktığı Volgograd bölgesinde, şehirleşmiş alanlardaki bulaşmalarda *C. pipiens* öne çıkarken, şehir çevresi kırsal veya yarı kırsal bölgelerde ise *C. modestus*'un vektör olarak daha etkin rol oynadığı gözlenmiştir (162). *C. perexiguus*, *C. pipiens* ve *Oc. caspius* türleri de, İsrail'de sivrisinek ve olgu sayılarındaki mevsimsel değişikliklerden bağımsız olarak BNV bulaşmasına neden olan primer vektörler olarak saptanmıştır (163). BNV olguların 2009 yılında salgın halinde ortaya çıkışı ülkemizdeki salgınla benzerlikler taşıyan Yunanistan'da, olguların yoğunlaştığı bölgelerde yapılan örneklemelerde *C. pipiens* sivrisineklerinde virus saptanmıştır (164).

Çalışmamızda, 2009 yılından bu yana BNV olguları rapor edilen Ankara ilinde, vektör sivrisinekler araştırılmış ve toplanan örneklerde viral antijen ve nükleik asitler incelenmiştir. Bu çalışma seroprevalans bulguları ve semptomatik olgular ile virus aktivitesinin gösterildiği Ankara ilinde (74, 75), BNV vektörlerine yönelik gerçekleştirilmiş ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Çalışmamız kapsamında 2012 yılı yaz sezonu içerisinde, Temmuz-Eylül aylarında 10 gün süre ile 6 bölgede belirlenen toplam 19 lokalitede örnekleme yapılmıştır. Örneklemede standart ışık tuzakları kullanılmış; örnekleme dahil edilen bölgeler ise BNV ya da Phlebovirus enfeksiyonu olguları saptanan ve/veya sivrisinek-kum sineği yayılımı olduğu belirlenen yerler ve çevrelerini içerecek şekilde seçilmiştir.

Çalışmalar sonunda %25.5'i erkek ve %74.5'i dişi olmak üzere toplam 239 sivrisinek toplanmıştır. Morfolojik inceleme ile toplanan örneklerde tür dağılımı %74.4 *C.pipiens*, %20.9 *An.maculipennis*, %2.1 *An.claviger*, %1.6 *Culiseta annulata* ve %1 *C. theileri* olarak belirlenmiştir. BNV saptanması için toplanan sivrisinek örnekleri, tür tayinlerinin ardından örnekleme tarihi, lokalite ve türlere göre 1-18 birey içeren toplam 65 havuz halinde gruplandırılmıştır. Sivrisinek havuzları standart yöntemlerle işleme alınarak parçalanmış; elde edilen homojenatlarda ticari bir immünokromatografik BNV antijen testi (Vectest) ve "nested" PCR yöntemi ile BNV antijenleri ve RNA'sı araştırılmıştır. İncelenen havuzların tamamında viral antijen ve nükleik asitler negatif olarak izlenmiştir.

Türkiye'de saptanan 61 sivrisinek türü içinde, BNV için vektör özelliği taşıyan birçok tür de bulunmaktadır. Aralarında *C.pipiens* gibi yaygın bir BNV vektörünün de yer aldığı 13 *Culex* türü sivrisinek de bunlara dahildir (70). Bunların belli başlıları arasında incelenen her bölgede varlığı gösterilen *C.pipiens*, *C. hortensis*, *C. litinicus*, *C. martini*, *C. mimeticus*, *C. modestus*, *C. perexiguus*, *C. terrans*, *C. theileri*, *C. torrentium* ve *C. tritaeniorhynchus* sayılabilir (165). Ancak BNV vektörü olarak, virus varlığının çeşitli sivrisinek türlerde araştırıldığı çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Bunlardan ilki 2003-2004 yıllarında Şanlıurfa ilinde gerçekleştirilmiş, toplanan 6457 sivrisinek BNV varlığı açısından Vero hücre kültürü, Vectest ve gerçek zamanlı PCR ile değerlendirilmiştir (85). İncelenen örneklerin %56'sı *C.pipiens*, %24'ü *Ochlerotatus caspius*, %20'si *Aedes* spp. olarak tanımlanmıştır. Sivrisinekler 20-25 bireylik havuzlar oluşturulmak suretiyle gruplandırılmış, daha sonra 1150 örnek Vero hücrelerine inokülasyon, 2648 örnek Vectest, 2189 örnek gerçek zamanlı PCR, 470 örnek ise ise hem Vectest hem gerçek zamanlı PCR ile değerlendirilmiştir. Vectest ve PCR ile değerlendirilen bazı havuzlarda Vectest pozitifliği izlenmesine karşın, aynı örneklerin gerçek zamanlı PCR sonuçlarının negatif olması nedeniyle, izlenen reaktif sonuçlar yalancı pozitiflik olarak değerlendirilmiştir (85). Aynı çalışmada bölge sakinlerinde nötralizan antikor seroprevalansı %9.4 oranında saptanmıştır. 2010 yılında Manisa başta olmak

üzere özellikle Ege bölgesinde bulunan illeri etkileyen BNV salgını sonrası, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (o zamanki adıyla Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı) yürütücülüğünde gerçekleştirilen bir çalışmada; Manisa, Sakarya, Muğla ve Edirne illerinden haziran-ekim 2011 tarihleri arasında toplanan sivrisinekler, BNV açısından incelenmiştir. Muğla ilindeki 4 lokaliteden 2018, Edirne ilindeki 3 lokaliteden 1080, Manisa ilindeki 6 lokaliteden 820 ve Sakarya ilindeki 5 lokaliteden 780 olmak üzere 4698 örneğin incelendiği bu çalışmada en sık saptanan tür *C. pipiens* (%99.6) olarak izlenmiş; onu *Anopheles claviger* (15 örnek), *C. theileri* (2 örnek), *Culiseta longiareolate* (1 örnek) ve *Ochlerotatus* spp. (1 örnek) takip etmiştir. Tüm örneklerin 20-40 bireylik havuzlarda incelendiği bu çalışmada gerçek zamanlı PCR ve "nested" PCR ile test edilen havuzlarda BNV RNA'sı saptanmamıştır (166). Ülkemiz sivrisineklerde BNV nükleik asitleri ilk kez 2012 yılı Temmuz ayında Trakya bölgesi Edirne ili çevresinde 23 lokasyonda gerçekleştirilen bir saha çalışmasında saptanmıştır (167). Bu çalışmada incelenen 9261 sivrisineklerde izlenen türler *Ochlerotatus caspius* (%90.9), *Culex pipiens* (%4.7), *Anopheles pseudopictus* (%3) ve *Anopheles maculipennis* (%1.3) olarak rapor edilmiş; 232 havuz halinde flaviviruslar-BNV'ye ek olarak phlebovirus ve alfavirus ailelerinin de araştırıldığı bu çalışmada 37 havuzda (%15.9) BNV RNA'sı saptanmıştır. Pozitif havuzların %89.2'si *Oc.caspius*, %10.8'si *C.pipiens* bireylerinden oluşmuştur. Çalışmada bölgede bulunan BNV kökeninin "Lineage 1" olduğu ortaya konulmuş; sivrisinek türleri ve örnekleme istasyonları arasında viral nükleik asit dizileri arasında yüksek düzey homoloji saptanmıştır. Ülkemizde "Lineage 1" virusların varlığı, ilk kez İç Anadolu bölgesi Ankara ve Eskişehir illerinde 2011 yılında insan ve atlarda eş zamanlı olarak ortaya çıkan semptomatik enfeksiyonlar sırasında gösterilmiştir (168). Sivrisineklerde saptanan BNV dizileri, Ankara-Eskişehir illerinde izlenen BNV dizileri ile %94.00-96.34 homoloji göstermiştir.

Çalışmamızda sivrisineklerde BNV incelemeleri, virusun dolaşımı serosürveyans verileri ve olgu raporları ile doğrulanmış bir bölgede; saptanan olguların ikamet ettikleri bölgeler de kapsanarak yapılmış olmasına karşın,

pozitiflik saptanamamıştır. Bu durumun muhtemel nedenleri incelenirken, öncelikle BNV araştırılmasında kullanılan sistemler gözönüne alınmalı ve yalancı negatiflik olasılıkları değerlendirilmelidir. Bizim çalışmamızda, BNV antijenlerinin saptanması amacıyla, immündefüzyon temelli, koloidal altınla konjuge edilmiş monoklonal antikolar ile viral antijenlerin yakalanması esasına dayanan ticari bir sistem kullanılmıştır (169,170). Bu sistem, sivrisinekler ve kuş örneklerinde kullanılmak üzere optimize edilmiş, uygulama kolaylığı ve ek cihaz gerektirmemesi nedeniyle özellikle saha araştırmalarında yaygın olarak uygulanan, performans özellikleri iyi bilinen bir sistemdir (170). Testin özellikle kuş örneklerinde duyarlılığının hücre kültürü izolasyonunda yüksek, PCR yöntemleri ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu rapor edilmesine karşın, sivrisinek örneklerinde duyarlılığı PCR yöntemlerine göre daha düşük olarak bildirilmektedir (170). Bu yöntemle yanlış pozitiflikler de izlenebilmekte, elde edilen sonuçların PCR ve diğer yöntemlerle doğrulanması, mümkün olmadığı durumlarda ise yeniden örnekleme yapılması önerilmektedir. Aynı sistem 2003-2004 Şanlıurfa sivrisinek örneklerinin de değerlendirilmesinde kullanılmış, ancak saptanan pozitiflikler virus izolasyonu ya da PCR ile doğrulanamamıştır (85). Çalışmamızda viral nükleik asitlerin saptanması amacıyla virusun farklı "Lineage"larının amplifikasyonunu duyarlı olarak gerçekleştirebilen; kuşlar, sivrisinekler ve insan olgularında uygulama alanı bulmuş bir "nested" PCR sistemi kullanılmıştır (138). Viral genomda zarf glikoproteinlerini hedefleyen primerlerin iki türlü reaksiyon şeklinde kullanıldığı bu sistem, ülkemizde dizi verisi bulunan tüm PCR pozitif örneklerin saptanmasında kullanılmış; sivrisinek örneklerinde de virüsü amplifiye edebildiği gösterilmiş bir sistemdir. Ankara ve Eskişehir bölgelerinde saptanan olgularda da aynı protokol uygulanmıştır (84,168). Dolayısıyla, uygulanan saptama sisteminin dolaşımda bulunan virüslere düşük duyarlılık göstermesi çok düşük bir olasılıktır. Bilindiği gibi, moleküler analizlerde özellikle RNA'nın çalışılması söz konusu olan durumlarda, hedef molekülün DNA'ya göre daha düşük olan stabilitesi ve RNaz enzimleri, çalışmalarda yalancı negatif sonuçlara neden olabilmektedir. Bu durumun önlenmesi için çalışmamızda tüm sivrisinek bireyler, örneklendikleri gün buz aküleri ile canlı olarak laboratuvara ulaştırılmış, tür tayininin ardından -80°C'de

saklanmış, parçalama işlemleri RNaz içermeyen sarf malzemeleri kullanılarak, RNaz inhibitörü bulunan ticari solüsyonlar ve kitlerle yapılmıştır. Laboratuvarda hazırlanan ("in house") bir PCR metodu kullanılmasından dolayı, çalışılan her örnekte bir internal kontrol amplifikasyonu yapılmamıştır. Bununla birlikte, ortak amplifikasyon karışımları hazırlanarak, uygun pozitif ve negatif kontrollerle gerçekleştirilen PCR reaksiyonları sırasında bireysel örneklerin negatif olarak izlenmesi ihtimali gözardı edilebilir düzeydedir. Söz konusu parçalama ve saptama yaklaşımları, Trakya bölgesi kaynaklı sivrisineklerde başarılı bir şekilde uygulanmış ve BNV izolatlarını saptamıştır (171).

Çalışmamızda örnekleme süresince toplam 239 sivrisinek toplanmış, morfolojik incelemeler en sık saptanan türün (%74.4), önemli bir BNV vektörü olan *C. pipiens* olduğunu ortaya koymuştur (Tablo 4.1). En yüksek sayıda sivrisinek örneği Temmuz ayı sırasında toplanmış (n:137, Tablo 4.2), örnekleme bölgeleri arasında da farklılıklar izlenmiştir (Tablo 4.2). Çalışma süresi ve örnekleme istasyonu sayısı yeterli olmasına karşın, sezon boyunca toplanan sivrisinek örneğinin benzeri çalışmalarla karşılaştırıldığında görece az sayıda olduğu izlenmektedir (85,171). Bu durum, virusun vektörlerde saptanamamış olmasının da başlıca nedeni olarak değerlendirilmektedir. Çalışma planımız, hastalık etkenlerini taşıyan sivrisinek ve kum sineklerini saptayabilmek amacıyla yapılmıştır; bu nedenle bölgesel sivrisinek ekolojisi ve populasyonlar dinamikleri konusunda sınırlı düzeyde veri sağlayabilmektedir. Bununla beraber bölgede BNV vektörü olarak sivrisineklere yönelik ilk arazi çalışması olması ve olgularla ilişkili bölgelerde tür dağılımı konusunda bilgi sağlaması açısından değerlidir. Ankara ilinde çalışmamız başlamadan saptanan bir BNV olgusunun yaşam alanı ve çevresinde yapılan örnekleme çalışmasında sivrisinek örneği saptanamamıştır (84). Sivrisinek havuzlarında BNV saptanmasına etkili olduğu bilinen birçok ekolojik faktör bulunmaktadır. Modelleme çalışmaları da, örneklemenin yapıldığı ay ve incelenen bölgelerdeki bitki örtüsü, sulak alan ve yerleşim özelliklerinin, pozitif sivrisinek havuzlarının öngörülmesinde etkin olabileceğini göstermektedir. Belirli bir bölgede sivrisineklerde BNV saptanması, insan olgularının ortaya çıkması ya da sayısının artması açısından prediktif

özelliğe sahiptir (172). Ankara bölgesinde BNV vektörleri ve ekolojik özelliklerinin saptanabilmesi için, takip eden sezonlarda kapsamlı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Kum sinekleri Diptera dizisi Nematocera dizi bölümü *Psychodidae* ailesi Phlebotominae alt ailesinde sınıflandırılan, büyüklükleri 1-4 mm büyüklükte canlılardır. Léger ve Depaquit 'ye göre Yeni Dünya kum sinekleri *Hertigia*, *Warileya*, *Lutzomyia* ve *Brumptomyia* olmak üzere dört; Eski Dünya kum sinekleri ise *Chinius*, *Phlebotomus*, *Austraophlebotomus*, *Idiophlebotomus* ve *Sergentomyia* olmak üzere bes cins içinde sınıflandırılmaktadır (173). Kum sinekleri, Yeni Zelanda ve Pasifik Adaları dışında tropikal ve subtropikal iklim kuşaklarında yaygın olarak bulunurlar. Genel olarak 40° Güney ve 50° Kuzey enlemleri arasında dağılım gösteren kum sineklerinin farklı cinslerine Asya, Afrika, Avrupa'nın güneyi, Orta ve Güney Amerika ve Avustralya'da rastlanmaktadır (136, 174). Eski Dünya'da bulunan kum sinekleri genellikle insan ve hayvanlara yakın habitatlarda bulunurken, Yeni Dünya'da sıklıkla ormanlık bölgelerde yaşamlarını sürdürürler (175). Sınırlı uçuş kapasitelerine bağlı olarak beslenme bölgelerinden genellikle fazla uzaklaşmayan kum sinekleri, sıcak ve nemli ortamları tercih ederler. Tüm bireyler çevredeki şeker kaynaklarından beslenirken, dişiler yumurtlama öncesi kan emer ve yumurtalar larva için beslenme kaynağı olarak işlev görecektir toprak ve organik madde içeren mikrohabitatlara bırakılır. Enfeksiyon etkenleri, duyarlı türlere dişi kum sineklerinin kan emmesi sırasında bulaştırılır. (176). Saha ve modelleme çalışmaları, iklimsel değişikliklerin de etkisiyle *Phlebotomus* türü kum sineklerinin, Akdeniz çevresinde yer alan bilinen habitatlarının, yeni bölgeleri içerecek şekilde genişleme gösterdiğine işaret etmektedir (177, 178).

Kum sinekleri de sivrisinekler gibi bazı önemli insan patojenleri için vektör görevi görmektedir. Bunların en önemlileri arasında Eski Dünya'da *Phlebotomus*, Yeni Dünya'da *Lutzomia* türleri tarafından taşınan leishmaniasis hastalığı bulunur (179). Bunun dışında bartonellozis gibi bakteriyel hastalıklar ve çeşitli virus hastalıkları da kum sinekleri tarafından duyarlı insan ve hayvan popülasyonlarına aktarılabilmektedir. Kum sineklerinin vektör rolü oynadığı

viruslar *Bunyaviridae* ailesi *Phlebovirus* cinsinde yer alan Phleboviruslar, *Rhabdoviridae* ailesi *Vesiculovirus* cinsinde yer alan Chandipura virus ve *Reoviridae* ailesi *Orbivirus* cinsinde bulunan Changuinola virus'tur (175). Chandipura virus, Asya'da, özellikle Hindistan bölgesinde yüksek mortalite ile seyreden ateş ve ensefalit tablosuna neden olmaktadır. Changuinola virus enfeksiyonlarının ise hafif seyirli ateşli hastalıklarla ilişkili bulunmuştur. Her iki virusun da epidemiyolojisi konusunda bilgiler sınırlıdır (179,180). *Phlebovirus* cinsinde sınıflandırılan viruslar arasında "sandfly fever" Sicilya virusu (SFSV) ve "sandfly fever" Napoli virusları (SFNV) "flebotom ateşi", "tatarcık humması" ya da "üç günlük ateş" olarak isimlendiren ateşli hastalıklar; Toskana virus (TOSV) ise ateşli hastalıkların yanı sıra aseptik menenjit etkenidir (94). Adı geçen virüslere ek olarak; bu virüslerin genomik dizi ve antijenik farklılıklar taşıyan varyantları "sandfly fever" Kıbrıs virusu (SFCV) ve ilk kez ülkemizde izole edilen "sandfly fever" Türkiye virusu (SFTV)'nin de insanlarda ağır seyirli ateşli hastalık etkeni olduğu bilinmektedir (123). Phleboviruslar kum sinekleri arasında vertikal ve horizontal yollarla geçiş gösterir; enfekte memelilerde viremi süre ve düzeyi sınırlıdır ve virüslerin kum sineklerine kan emmesi sırasında aktarılması güçtür. Çeşitli memelilerin rezervuar rolü oynadığı düşünülmektedir.

Ateşli hastalık etkeni olan phleboviruslar SFSV ve SFNV için kum sineği vektör *Phlebotomus papatasi*, merkezi sinir sistemi tutulumu oluşturan TOSV için vektörler ise *P. perniciosus* ve *P. perfiliewi* olarak ortaya konulmuştur. Belirtilen kum sineği türlerinin vektör potansiyeli laboratuvar koşullarında saptanmış, endemik ülkelerde tekrarlayan virus izolasyonları ile sahada oynadıkları rol ortaya konmuştur (94). Bununla birlikte SFSV-SFNV ve TOSV adı geçen türler dışında bazı kum sineği türlerinde de saptanmıştır. Örnek olarak SFSV ve varyantları, *P.papatasi*'nin yanı sıra *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. major* s.l., *P. neglectus*, *P. longicuspis* ve *Sergentomyia minuta*; SFNV *P. perniciosus*, *P.perfiliewi* ve *P. longicuspis*; TOSV ise *S.minuta* kum sineklerinde gösterilmiştir (181, 182, 183, 184). Bu türlerin tamamının virus yaşam döngüsünde belirgin rolleri olup olmadığı açık değildir. Bununla birlikte SFSV ve TOSV RNA'sı saptanan *S.minuta* gibi kum sineklerinin ağırlıklı olarak

sürüngeuiler üzerinden beslenmesi, henüz ortaya çıkmamış rezervuar türlerin de virus yaşam döngüsünde yer alabileceğini düşündürmektedir (181). Kum sineklerinde yapılan çalışmalar; insanlarda hastalık etkeni olduğu iyi bilinen SFSV-TOSV gibi phleboviruslar dışında, yeni izolatların da tanımlanabilmesine olanak sağlamıştır. 1985 yılında Yunanistan'ın Korfu adasında toplanan *P. major* s.l örneklerinde bir SFSV varyantı olarak karakterize edilen "Korfu virusu" izole edilmiş (185); 2006 yılında Kıbrıs Rum Kesimi'nde izlenen bir ateşli hastalık salgınında da yine bir SFSV varyantı olan SFCV saptanmıştır (119). Bir başka virus izolatu da, Tunus'ta gerçekleştirilen saha çalışmalarında *P. perniciosus* havuzlarında saptanmış; SFNV'ye benzerlik gösteren bu izolata da "Punique virus" adı verilmiştir (186). SFNV serokompleksinde sınıflandırılması önerilen bir diğer izolat, "Massilia virus" ise Fransa'nın Marsilya bölgesinde *P. perniciosus* türü kum sineklerinde saptanmıştır (187). İspanya'da Granada şehrinde ise, yine SFNV ile genetik benzerliğe sahip, Massilia virus ve tanımlanamayan bir diğer virus arasında "reassortment" sonucu ortaya çıktığı düşünülen "Granada virus" tanımlanmıştır. (188). Kıbrıs virusu dışındaki phlebovirus izolatlarının bazılarına insan maruziyeti serolojik olarak gösterilmiştir; ancak klinik örneklerde saptanmamış olması nedeniyle hastalık etkeni olarak rolleri henüz açıklığa kavuşmamıştır. SFSV ve SFCV'ye benzerlik gösteren bir phlebovirus varyantı olan "Sandfly Fever" Türkiye Virusunu (SFTV) ise; ülkemizde Akdeniz, Ege ve İç Anadolu bölgelerinde ortaya çıkan ateşli hastalık salgınlarında izole edilmiştir (123). Ankara bölgesinde yapılan çalışmalarda, SFTV'nin vektörleri olarak *P. major* s.l. türü kum sinekleri belirlenmiştir (127).

Türkiye'de yayılım gösteren kum sinekleri, *Phlebotomus* ve *Sergentomyia* cinslerine ait türlerle temsil edilmektedir. Bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmalara göre *Phlebotomus* cinsine ait kum sineği türlerinin Marmara, Ege, Akdeniz, İç Anadolu, Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da; *Sergentomyia* cinsine ait olanların ise Marmara, Ege, Akdeniz, İç Anadolu ve Güneydoğu Anadolu'da yayılım gösterdiği tespit edilmiştir (189-202). SFSV, SFNV ve TOSV vektörü olarak kesinleşen türler dışında, yeni phlebovirus izolatlarının saptandığı kum sineği türleri de ülkemizde yaygın olarak

bulunmaktadır. Bununla birlikte phlebovirusların vektör kum sineklerinde araştırıldığı tek bir çalışma bulunmaktadır (81).

Çalışmamızda kum sineği örneklemeleri; sivrisineklerle birlikte Ankara ili çevresinde, 2012 yılı temmuz-eylül aylarında gerçekleştirilmiştir. Mamak ilçesinde 2008-2009 yıllarında saptanan SFTV olguları ile ilişkili olan belirli lokaliteler de örnekleme bölgelerine dahil edilmiştir. Virusun ilk tespitinin yapıldığı 2008 yılından bu yana Ankara bölgesinde SFTV aktivitesinin 2009-2011 yıllarında devam ettiği bilinmektedir (124, 126). Aynı bölgede 2010 yılında TOSV maruziyeti ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonları da bildirilmiştir (127). Çalışmada 10 günlük süre boyunca 767 adet kum sineği toplanmış (Şekil 4.1); örneklerde cinsiyet dağılımı hemen hemen eşit olarak izlenmiştir (erkek/dişi:1.003). Morfolojik tür tayini yapılan 384 erkek kum sineğinde tür dağılımları *P. papatasi* (%36.2), *P. halepensis* (%27.3), *P. major* s.l. (%19.3), *P. sergenti* (%8.9), *P. perfilliewi* (%4.4), *P. simici* (%2.6), *P. tobbi* (%0.8) ve *Sergentomyia* sp. (%0.6) olarak belirlenmiştir. Temmuz ve ağustos aylarında sırasıyla 398 (tüm kum sineği örneklerinin %51.9'u) ve 326 örnek (tüm kum sineği örneklerinin %42.5'i) toplanmış; eylül ayında ise belirgin olarak az sayıda kum sineği yakalanabilmiştir (43, %5.6) (Şekil 4.1). Örnekleme bölgelerine göre sayılar incelendiğinde; örneklerin %79.9'unun Bölge 1-3 (Bölge 3: %29.3, Bölge 1:%28, Bölge 2: %22.6) kaynaklı olduğu; kalan %20.1'lik kısmın ise diğer bölgeler arasında dağıldığı izlenmektedir (Şekil 4.3). Kum sineği türlerinin bölgelere göre dağılımlarına bakıldığında; Bölge 1' de ağırlıklı olarak *P. major* s.l. (%49.2), Bölge 2' de ağırlıklı olarak *P. halepensis* (%68.5), Bölge 3' de ise ağırlıklı olarak *P.papatasi* (%83.1) saptanmıştır (Tablo 4.3). Önceki çalışmalarda SFTV vektörü olarak belirlenen *P.major* s.l. toplam örneklerin %19.3'ünü oluşturmuş ve çoğunlukla Bölge 1 ve 2'de saptanmıştır (%98.6). TOSV vektörü olan *P. perfilliewi* ise erkek kum sineği toplam sayısının %4.4'ünü oluşturmuş; Bölge 5 ve 6'da saptanan tek tür olarak belirlenirken, Bölge 1 ve 3'de nadir olarak izlenmiştir (Tablo 4.3).

Ankara ve çevresinde izlenen kum sineği çeşitliliği ve tür dağılımı konusunda kısıtlı veri bulunmaktadır. Yağcı ve arkadaşlarının çalışmasında,

Nisan 1994 - Ekim 1995 tarihleri arasında Çubuk, Kazan ve Çayırhan ilçelerinde seçilen 3 lokalitede örnekleme yapılmış; %89.1'i dişi, %10.9'u erkek olmak üzere toplam 2248 kum sineği toplanmıştır (203). Örneklerde morfolojik inceleme sonucu *P. kyreniae*, *P. simici*, *P. alexandri*, *P. sergenti*, *P. perfiliewi* ve *P. papatasi* olmak üzere 6 farklı tür tespit edilmiş; baskın türün ise örneklerin %98.4'ünü oluşturan *P. perfiliewi* olduğu izlenmiştir. Bu çalışmada Çubuk ve Kazan ilçelerindeki lokalitelerin insan popülasyonlarından uzakta bulunduğu ve bu örnekleme noktalarında sadece *P. perfiliewi* türü kum sineklerinin saptandığı rapor edilmiştir. *P. perfiliewi* ve *P. sergenti* türlerinin mayıs, haziran, temmuz ve ağustos aylarını kapsayan tüm örnekleme süresince; *P. papatasi* türlerinin ise sadece ağustos ayında tespit edilebilmiştir. İnsan ve hayvan popülasyonlarının birlikte bulunduğu örnekleme lokalitelerinde *P. kyreniae*, *P. simici*, *P. alexandri*, *P. sergenti* ve *P. papatasi* bulunurken; *P. perfiliewi* hem ıssız ve az yerleşimli alanlarda hem de insan ve hayvanların yoğun olduğu alanlarda izlenmiştir (203).

Ankara ili Mamak ilçesi çevresinde 2011 yılı temmuz ayında gerçekleştirilen ve bizim örnekleme lokalitelerimizin bir kısmını (Bölge 1 ve 2) da içeren bir diğer çalışmada; 11 lokalitede toplam 667 kum sineği örnekleme yapılmış, örneklerin %66.1'ini dişi kum sinekleri oluşturmuştur (81). Erkek kum sineği bireylerinin morfolojik incelemesi sonucu saptanan yaygın türler *P. major s.l.* (%38.9), *P. sergenti* (%20.4), *P. halepensis* (%17.7), *P. papatasi* (%10.2), *P. simici* (%4), *Larrousius spp.* (%3.5), *P. tobbi* (%1.3) ve *P. perfiliewi* (%1.3) olarak rapor edilmiştir (81). Çalışmada dişi kum sineklerinin bir kısmı, biyolojik barkodlama amacıyla yaygın olarak kullanılan sitokrom oksidaz I geni PCR ve dizi analizi ile *P. major s.l.*, *P. sergenti* ve *P. papatasi* olarak tanımlanmıştır. Bizim çalışmamızda 1. No.lu bölge olarak tanımlanan semtte 2011 yılında 8 lokalitede örnek yakalanmış; en yoğun saptanan türler *P. major s.l.* (%45.6), *P. sergenti* (%30.9) ve *P. papatasi* (%6.7) şeklindedir. Aynı bölgede 2012 yılında en yoğun saptanan türler benzerlik göstermiş ve dağılımlar *P. major s.l.* (%50), *P. sergenti* (%27.9) ve *P. papatasi* (%9.3) olarak izlenmiştir. Bölge 2 olarak adlandırılan semtte ise 2011 yılında 3 lokalitede örnek bulunarak, saptanan kum

sineği türleri *P.halepensis* (%47.7), *P.major* s.l.(%30.8) ve *P.papatasi* (%21.5) olarak rapor edilmiştir. Aynı bölgede 2012 örneklemelerinde de tür dağılımı değişiklik göstermemiş, *P. halepensis* (%66.4), *P.papatasi* (%21.5) ve *P.major* s.l. (%12.1) olarak izlenmiştir. Görüldüğü gibi her iki yılda aynı kum sineği türleri baskındır ve örnekleme yaklaşık oranları benzerlik göstermektedir. Ancak her iki çalışmanın da, sivrisinek-kum sineği ile ilişkili viral enfeksiyon olgularının ortaya çıktığı bölgelerde yapılmış olması nedeniyle; gözlenen kum sineği tür ve yaygınlıklarının Ankara ve çevresine ait faunayı temsil yeteneği açık değildir. Bununla birlikte, bölgede *P. perfilliewi* ve *P.papatasi* gibi vektör olarak rolleri net olarak ortaya konulmuş kum sineği türleri tekrarlayan saha çalışmalarında saptanmış; ayrıca birçok farklı kum sineği türünün de bölgede varlığı izlenmiştir. Dolayısıyla Ankara ilinin kum sineği kaynaklı hastalıkların girişi ve aktivitesini sürdürdürebilmesi açısından uygun şartlara sahip olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda toplanan 383 dişi kum sineği, phlebovirus saptanması amacıyla bireysel olarak işleme alınarak "nested" PCR yöntemi ile test edilmiş ancak viral RNA saptanamamıştır. BNV araştırılmasında uygulandığı şekilde örnekleme günü buz aküleri ile canlı olarak laboratuvara ulaştırılan örnekler, cinsiyet tayininin ardında -80°C'de saklanmış; bireysel olarak işleme alınarak standart yöntemlerle RNA saflaştırma ve cDNA sentezi işlemlerine alınmıştır. Uygulanan PCR yöntemi, dejenere primerler ile viral genomda L segmentinde bulunan RNA bağımlı RNA polimeraz geninin kodlama yapan bölgelerinin korunmuş bir bölümünü hedeflemektedir ve SFSV-SFNV-TOSV gibi patojenitesi iyi bilinen virüslara ek olarak; *Phlebovirus* cinsinde sınıflandırılan tüm virüsleri saptayabilme özelliğine sahiptir (93). Phlebovirus dağılımı bilinmeyen birçok bölgede tarama amacıyla kullanılan bu protokol; SFTV'de aralarında olmak üzere birçok yeni izolatin ilk kez saptanmasında fayda göstermiştir (120,123,186,187). Ülkemizde kum sineklerinde phlebovirusların ilk kez saptanması 2011 yılında Ankara bölgesinde gerçekleştirilmiş; araştırılan 441 dişi kum sineği örneğinin 3'ünde SFTV dizileri gösterilmiştir (81). Virus nükleik asitleri saptanan kum sinekleri sitokrom oksidaz I geni dizi analizi ile *P.major* s.l. olarak tiplendirilmiş; 4-6 Temmuz tarihlerinde kum sineklerinde saptanan

dizilerin ağustos ayında tespit edilen SFTV olguları ile yüksek düzey homoloji gösterdiği izlenmiştir. Çalışmamızda kum sineklerinde phlebovirus araştırılması amacıyla kullandığımız yöntemler, 2011 Ankara bölgesinde uygulanan yaklaşımla aynıdır. Ayrıca 2012 yılı temmuz ayı örneklemeleri, 2011 yılında kum sineklerinde SFTV'nin saptandığı tarihlerde uygulanmış, buna karşın virus sekansları saptanmamıştır. Phlebovirus aktivitesinin izlendiği bölgelerde kum sineklerinde enfeksiyon oranları, virus ve bölgeye göre farklılıklar görülmekle birlikte %0.05 - 0.67 arasında kaydedilmektedir (106,182,184,186,187,204). 2011 yılında Ankara ilinde de bu oran %0.68 olarak izlenmiştir (81). Çalışmamızın sonuçları örnekleme bölgelerinde 2012 yılında SFTV ya da diğer phlebovirusların dolaşımda bulunmadığı ya da enfeksiyon oranlarının düşüklüğüne bağlı olarak elde edilen örneklem kapsamında saptanamadığını düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Arboviruslar, yani kan emen eklem bacaklılar yoluyla bulaşma özelliğine sahip viruslar, değişen epidemiyolojik özelliklerinin de katkısıyla tüm dünyada halk sağlığı açısından bir ciddi sorun olmaya devam etmektedir. İklim ve coğrafi özellikleri ile birçok arbovirus için uygun koşullara sahip olan ülkemizde; özellikle son on yılda konuya verilen önem artmış olmakla birlikte, hastalıkların yayılımının öngörülmesi ve uygun önlemlerin alınması açısından yeterli düzeyde değildir. Arbovirus vektörü olarak görev yapan organizmaların dağılımı ve taşıdıkları etkenlerin araştırılması, hastalık epidemiyolojisinin ortaya çıkarılması açısından kritik öneme sahiptir.

Çalışmamızda, Ankara ilinde sahadan toplanan sivrisinek ve kum sineklerinin tanımlanması ve Batı Nil virusu, Toskana virusu ve diğer phlebovirusların araştırılması amaçlanmıştır. Serosürveyans verileri ve olgu bildirimleri, her iki etkenin bölgede aktivitesini sürdürdüğünü göstermektedir. Kapsadığı örnekleme bölgesi açısından çalışmamız, Ankara'da konuyla ilgili gerçekleştirilen en kapsamlı araştırma olma özelliğini taşımaktadır.

Çalışma 2012 yılı Temmuz-Eylül aylarında 6 bölgede bulunan 19 lokalitede 10 gün süresince gerçekleştirilmiştir. Standart ışık tuzaklarının örnekleme amacıyla kullanıldığı çalışmada BNV antijen ve nükleik asitleri, ticari bir immünokromatografik test ve "nested" PCR; TOSV ve diğer phlebovirus nükleik asitleri de "nested" PCR yöntemiyle incelenmiştir. Her iki PCR yöntemi de yüksek duyarlılığa sahiptir ve ülkemizdeki virus izolatlarını saptamada etkin olduğu bilinmektedir.

Çalışma süresince toplanan 1006 örneğin %23.75'ini (239/1006) sivrisinekler, %76.25'ini (767/1006) kum sinekleri oluşturmuştur. Toplanan sivrisineklerin %25.5'i (61/239) erkek, %74.5'i (178/239) dişi olarak tespit edilmiş; tür dağılımları ise %74.4 (178/239) *Culex pipiens*, %20.9 (50/239) *Anopheles maculipennis*, %2.1 (5/239) *An. claviger*, %1.6 (4/239) *Culiseta annulata* ve %1

(2/239) *Culex theileri* olarak izlenmiştir. BNV antijen ve nükleik asit incelemeleri; toplanan sivrisinek örneklerinin tarih, lokalite ve türlere göre oluşturulmuş 1-18 birey içeren toplam 65 havuzda uygulanmış ve negatif olarak izlenmiştir.

Örnekleme süresince toplanan kum sineklerinin %49.9'u (383/767) dişi, %50.1'i (384/767) erkek olarak izlenmiştir. Erkek kum sineklerinde morfolojik tür dağılımı tayini yapılmış, dişi örnekler ise bireysel olarak işleme alınarak phlebovirus nükleik asitleri açısından değerlendirilmiştir. Örneklerde saptanan türler %36.2 (139/384) *Phlebotomus papatasi*, %27.3 (105/384) *P. halepensis*, %19.3 (74/384) *P. major* s.l., %8.9 (34/384) *P. sergenti*, %4.4 (17/384) *P. perfiliewi*, %2.6 (10/384) *P. simici*, %0.8 (3/384) *P. tobbi* ve %0.6 (2/384) *Sergentomyia* sp. şeklinde izlenmiştir. Örnekleme bölgelerinin bazılarında izlenen kum sineği türleri ve yaygınlığı, 2011 yılında aynı bölgelerde yapılan örnekleme verilerine benzer olarak değerlendirilmiştir. Dişi kum sineği örneklerin incelenmesinde Phlebovirus nükleik asitleri saptanmamıştır. Sivrisinek ve kum sinekleri en yoğun olarak temmuz ve ağustos aylarında ve incelenen 6 bölgenin 3'ünden toplanmıştır.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar ile ilgili aşağıda sıralanan hususlar dikkati çekmektedir:

- 1)Örnekleme bölgelerinde BNV, TOSV ve diğer phleboviruslar için vektör görevi yapan sivrisinek ve kum sineği türleri saptanmıştır. Bu durum adı geçen virusların bölgedeki aktivitelerini sürdüreceği ve/veya aynı türleri enfekte edebilen diğer arboviral etkenlerin bölgeye giriş yapabileceğine işaret etmektedir.
- 2)Özellikle kum sineği türleri açısından örnekleme bölgeleri arasında farklar izlenmiştir. Bu durum, farklı bölgelerde farklı virus enfeksiyonlarının ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte çalışmamız, görece kısıtlı sayıda örneğin incelenmiş olması ve örnekleme bölgelerinin seçimi nedeniyle Ankara ili ve çevresindeki sivrisinek ve kum sineği epidemiyolojisi tam olarak yansıtmıyor olabilir. Önümüzdeki sezonlarda

yapılacak daha kapsamlı çalışmalar, konuyla ilgili eldeki bilgilerin daha sağlıklı olarak yorumlanabilmesine olanak sağlayacaktır.

3)İncelenen örneklerde hedef viruslar gösterilememiştir. Bu durum, örnekleme bölgelerinde düşük virus aktivitesine işaret ediyor olabilir. Daha yüksek sayıda bireyin inceleneceği çalışmalar, düşük sıklıkta da olsa dolaşımda bulunan virusların saptanabilmesine imkan verecektir.

KAYNAKLAR

1. Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW. ve ark. (1940). A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 20. 471–492.
2. Murgue B, Murri S, Triki H. (2001). West Nile in the Mediterranean basin: 1950–2000. *Annals of New York Academy of Sciences*. 951. 117–126.
3. Bernkopf H, Levine S, Nerson R. (1953). Isolation of West Nile virus in Israel. *The Journal of Infectious Diseases*, 7, 128–132.
4. Panthier R. (1968). Epidemiologie du virus West Nile: etude d'un foyer en Camargue. I. Introduction. *Annales de l'Institut Pasteur/Actualites*, 114, 519–520.
5. McIntosh BM, Jupp PG, Dos Santos I. (1976). Epidemics of West Nile and Sindbis viruses in South Africa with *Culex (Culex) univittatus* Theobald as vector. *South African Journal of Science*, 72, 295–300.
6. Hubalek Z, Halouzka J. (1999). West Nile fever—a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 5, 643–650.
7. Giladi M, Metzkor-Cotter E, Martin D A. (2001). West Nile encephalitis in Israel, 1999: the New York connection. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 7, 659–661.
8. Centers for Disease Control and Prevention. (2002). Provisional surveillance summary of the West Nile virus epidemic—United States, January— November 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 51, 1129–1133.

9. Scherret JH, Mackenzie JS, Hall RA. ve ark. (2002). Phylogeny and molecular epidemiology of West Nile and Kunjin Viruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 267, 373-390.
10. Lanciotti RS, Ebel GD, Deubel V. ve ark. (2002). Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology*, 298, 96-105.
11. Charrel RN, Brault AC, Gallian P ve ark. (2003). Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe. *Virology*, 315, 381-388.
12. Burt FJ, Grobbelaar AA, Leman PA ve ark. (2002). Phylogenetic relationships of southern African West Nile virus isolates. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 8, 820-826.
13. Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K ve ark. (2006). Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 12, 618-623.
14. Beasley DW, Li L, Suderman MT ve ark. (2002). Mouse neuroinvasive phenotype of West Nile virus strains varies depending upon virus genotype. *Virology*, 296, 17-23.
15. Venter M, Myers TG, Wilson MA ve ark. (2005). Gene expression in mice infected with West Nile virus strains of different neurovirulence. *Virology*, 342, 119-140.
16. Botha MB, Markotter W, Wolsfaardt M ve ark. (2008). Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 14, 222-230.
17. Bondre VP, Jadi RS, Mishra AC ve ark. (2007). West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *Journal of General Virology*, 88, 875-884.

18. Bakonyi T, Hubalek Z, Rudolf I. ve ark. (2005). Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 11, 225-231.
19. Vazquez A, Sanchez-Seco MP, Ruiz S ve ark. (2010). Putative New Lineage of West Nile Virus, Spain. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 16, 549-552.
20. Davis C, Ebel G, Lanciotti R ve ark. (2005). Phylogenetic analysis of North American West Nile virus isolates, 2001- 2004: evidence for the emergence of a dominant genotype. *Virology*, 342, 252-265.
21. Snapinn KW, Holmes EC, Young DS ve ark. (2007). Declining growth rate of West Nile virus in North America. *Journal of Virology*, 81, 2531-2534.
22. Botha EM, Markotter W, Wolfaardt M. ve ark. (2008). Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 14 (2), 222-230.
23. Weaver SC, Reisen WK. (2010). *Antiviral Research*, 85, 328–345.
24. Hayes EB, Gubler DJ. (2006). West Nile virus: epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. *Annual Review of Medicine*, 57, 181-194.
25. Rossi LS, Ross MT, Evans DJ. (2010). *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1), 47–65.
26. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R. ve ark. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Review of Microbiology*, 44, 649–688.
27. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS. ve ark (2002). West Nile virus. *The Lancet Infectious Diseases*, 2, 519-529.
28. Sanchez MD, Pierson TC, McAllister D. ve ark. (2005). Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. *Virology*, 336, 70-82.

29. Pedersen LR, Roehrig JT.(2001). West Nile Virus: A reemerging global pathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 7(4), 611-614.
30. Burke D, Monath T. (2001). Flaviviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 1043–126.
31. Mackenzie SJ, Gubler DJ, Petersen RL. (2004). Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature Medicine*, 10(12), 98-109.
32. Hayes EB, Komar N, Nasci RS. ve ark. (2005). Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile Virus Disease. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 11, 1167-1173.
33. Turell MJ, Dohm DJ, Sardelis MR ve ark. (2005). An update on the potential of north American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus. *Journal of Medical Entomology*, 42, 57-62.
34. Zeller HG, Schuffenecker I. (2004). West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 23, 147-156.
35. Komar N, Langevin S, Hinten S ve ark. (2003). Experimental infection of North American birds with the New York 1999 Strain of West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 9, 311-322.
36. Rappole JH, Hubalek Z. (2003). Migratory birds and West Nile virus. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 47S-58S.
37. Malkinson M, Banet C, Weisman Y ve ark. (2002). Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 8, 392-397.

38. Steele KE, Schoepp RJ, Komar N ve ark. (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, 208-224.
39. Hartemink NA, Davis SA, Reiter P. ve ark. (2007) Importance of bird-to-bird transmission for the establishment of West Nile virus. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 7, 575-584.
40. Reiter P. (2010). West Nile virus in Europe: understanding the present to gauge the future. *Eurosurveillance*, 15(10), pii=19508.
41. Peterson AT, Vieglaiss DA, Andreasen JK. (2003). Migratory birds modeled as critical transport agents for West Nile virus in North America. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 3, 27-37.
42. Ratterree MS, Gutierrez RA, Travassos da Rosa AP ve ark. (2004). Experimental infection of rhesus macaques with West Nile virus: level and duration of viremia and kinetics of the antibody response after infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 189, 669-676.
43. Austgen LE, Bowen RA, Bunning ML ve ark. (2004). Experimental infection of cats and dogs with West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 10, 82-86.
44. Klenk K, Komar N. (2003). Poor replication of West Nile virus (New York 1999 strain) in three reptilian and one amphibian species. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69, 260-262.
45. Klenk K, Snow J, Morgan K ve ark. (2004). Alligators as west nile virus amplifiers. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 10, 2150-2155.
46. Miller DL, Mauel MJ, Baldwin C ve ark. (2003). West Nile virus in farmed alligators. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 9, 794-799.

47. Nir Y, Beemer A, Goldwasser RA. (1965). West Nile virus infection in mice following exposure to a viral aerosol. *British Journal of Experimental Pathology*, 46, 443-449.
48. Lichtensteiger CA, Heinz-Taheny K, Osborne TS ve ark. (2003). West Nile virus encephalitis and myocarditis in wolf and dog. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 9, 1303-1306.
49. Sampathkumar P. (2003). West Nile Virus: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis and prevention. *Mayo Clinic Proceedings*, 78, 1137-1144.
50. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR. ve ark. (2005). Virology, pathology and clinical manifestations of West Nile Virus disease. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 11, 1174-1179.
51. Kauffman EB, Jones SA, Dupuis AP ve ark. (2003). Virus detection protocols for West Nile virus in vertebrate and mosquito specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 3661-3667.
52. Shi PY, Kramer LD. (2003). Molecular detection of West Nile virus RNA. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 3, 357-366.
53. Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS ve ark. (2000). Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 4066-4071.
54. Shi PY, Kauffman EB, Ren P ve ark. (2001). High-throughput detection of West Nile virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 1264-1271.
55. Shi PY, Wong SJ. (2003). Serologic diagnosis of West Nile virus infection. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 3, 733-741.
56. Fox JL, Hazell SL, Tobler LH, ve ark. (2006). Immunoglobulin G avidity in differentiation between early and late antibody responses to West Nile virus. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13, 33-36.

57. Nasci RS, Gottfried KL, Burkhalter K ve ark. (2002). Comparison of vero cell plaque assay, TaqMan reverse transcriptase polymerase chain reaction RNA assay, and VecTest antigen assay for detection of West Nile virus in field-collected mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 18, 294-300.
58. Burkhalter KL, Lindsay R, Anderson R ve ark. (2006). Evaluation of commercial assays for detecting West Nile virus antigen. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22, 64-69.
59. Williges E, Farajollahi A, Nelder MP, ve ark. (2009). Comparative field analyses of rapid analyte measurement platform and reverse transcriptase polymerase chain reaction assays for West Nile virus surveillance. *Journal of Vector Ecology*, 34, 324-328.
60. Gould EA, Higgs S, Buckley A, ve ark. (2006). Potential Arbovirus Emergence and Implications for the United Kingdom, *Emerging Infectious Diseases*, 12(4), 549-555.
61. Hayes C.G. (1989). West Nile fever. *The arboviruses: epidemiology and ecology*, 5, 59–88.
62. Calistri P., Giovannini A., Hubalek Z. ve ark. (2010). Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean Basin. *The Open Virology Journal*, 4, 29-37.
- 63.. Dauphin G., Zientara S., Zeller H. ve ark. (2004). West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 27, 343-355.
64. Krisztalovics K, Ferenczi E, Molnar Z. ve ark. (2008). West Nile virus infections in Hungary, August- September 2008. *Euro Surveillance* 2008, 13(45), pii=19030.

65. Barzon L, Squarzon L, Cattai M. ve ark. (2009). West Nile virus infection in Veneto region, Italy, 2008-2009. *Euro Surveill* 2009; 14, pii=19289.
66. Rizzo C, Vescio F, Declich S ve ark. (2009). West Nile virus transmission with human cases in Italy, August-September 2009. *Euro Surveill* 2009, 14, pii=19353.
67. Papa A, Danis K, Baka A ve ark. (2010). Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July-August 2010. *Euro Surveill* 2010, 15, pii=19644.
68. Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V ve ark. (1999). Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science*, 286, 2333-2337.
69. Hayes CG. (2001). West Nile virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 951, 25-37.
70. Ramsdale CD, Alten B, Çağlar SS ve ark. (2001). A revised, annotated checklist of the mosquitoes (Diptera, Culicidae) of Turkey. *European Mosquito Bulletin*, 9, 18-27.
71. Radda A. (1971). Antibodies against group A and B Arboviruses in domestic animals from Turkey. *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 10, 227-229.
72. Serter D. (1980). Present status of arbovirus sero-epidemiology in the Aegean region of Turkey. *Zentralblatt Für Bakteriologie*, 9, 155-161.
73. Ergunay K., Ozer N., Us D. ve ark. (2007). Seroprevalence of West Nile Virus and Tick-Borne Encephalitis Virus in Southeastern Turkey: First Evidence for Tick-Borne Encephalitis Virus Infections. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 7, 157-161.

74. Özkul A., Yıldırım Y., Pınar D. ve ark. (2005). Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey. *Epidemiology and Infection*, 29, 1-4.
75. Ergunay K, Saygan MB, Aydoğan S, ve ark. (2010). West Nile virus seroprevalence in blood donors from Central Anatolia, Turkey. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 10, 771–775.
76. Ergunay K, Whitehouse CA, Özkul A. (2011). Current status of human arboviral diseases in Turkey. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 11(6), 731-741.
77. Ergünay K, Özkul A. (2011). Ankara bölgesinde nedeni bilinmeyen santral sinir sistemi enfeksiyonu olgularında saptanan Batı Nil virusu seropozitifliğinin doğrulanması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 45(2), 381-383.
78. Arpacı F, Çetin T, Kubar A ve ark. (2009). West Nile Virus infection in a patient with acute graft-versus-host disease. *Haematologica*, 94(S2), 687.
79. Sener K, Yapar M, Kuru O, ve ark. (2009). Detection of West Nile virus in a patient with acute graft-versus-host disease by using a new developed one-step real time RT-PCR. *Journal of Clinical Virology*, 46(S1), 43.
80. Kalaycıoğlu H, Korukluoğlu G, Özkul A. (2012). Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011. *Euro Surveillance* 2012, 17(21), pii:20182.
81. Ergunay K, Sayiner A, Litzba N, ve ark. (2012). Multicentre evaluation of central nervous system infections due to Flavi and Phleboviruses in Turkey. *Journal of Infection*, 65(4), 343-349.
82. Yeşilkaya A, Kurt Azap O, Arslan H ve ark. (2012). Ölümcül seyreden Batı Nil virusu ensefaliti olgusu. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 46(3), 488-492.

83. Ozkul A, Ergunay K, Koysuren A ve ark. (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 Infection Diseases*, 17(7), 546-551.
84. Ocal M, Onder H, Arsava EM ve ark. (2013). Ankara İlinde Batı Nil Virusu Köken-1 Kaynaklı Bir Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonu Olgusu, *Mikrobiyoloji Bülteni*, 47, 164-172.
85. Ozer N, Ergunay K, Simsek F ve ark. (2007). West Nile virus studies in the Sanliurfa Province of Turkey. *Journal of Vector Ecology*, 32, 202-206.
86. Albayrak H, Ozan E. (2010). Molecular Detection of Avian Influenza Virus but not West Nile Virus in Wild Birds in Northern Turkey. *Zoonoses and Public Health*, 57(7-8), 71-75.
87. Albayrak H, Ozan E, Kurt M. (2010). Molecular Detection of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) but not West Nile Virus (WNV) in Hard Ticks from Provinces in Northern Turkey. *Zoonoses and Public Health*, 57(7-8), 156-160.
88. Sabin AB. (1955). Recent advances in our knowledge of dengue and sandfly fever. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 4, 198-207.
89. Weidmann M. (2010) Updates on distribution of new sand fly fever viruses. *Vbornet Newsletter*, 8, 26-28.
90. Verani P, Nicoletti L. (1995). Phlebovirus Infections. In: Kass handbook of Infectious Diseases: Exotic Viral Infections, Porterfield JS. (ed). *Chapman&Hall Medical Publisher, London*, 295-317.
91. Guelmino D.J., Jevtic M. (1955). An epidemiological and epidemiological study of sandfly fever in Serbia, *Acta Tropica*, 12, 179-182.
92. Valassina M, Cusi MG, Valensin PE. (2003). A Mediterranean arbovirus: the Toscana virus. *Journal of Neurovirology*, 9, 557-583.

93. Sanchez-Seco M, Echevarria J, Hernandez L ve ark. (2003). Detection and identification of Toscana and other Phleboviruses by RT-nested PCR assay with degenerated primers. *Journal of Medical Virology*, 71, 140-149.
94. Dionisio D, Esperti F, Vivarelli A. ve ark. (2003). Epidemiological, clinical and laboratory aspects of sandfly fever. *Current Opinion Infection Diseases*, 16, 383–388.
95. Charrel RN, Gallian P, Navarro-Mari J-M ve ark. (2005). Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 1, 1657–1663.
96. Plyusnin, A, Beaty BJ, Elliott RM. ve ark. (2011). Bunyaviridae. In Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier, 693–709.
97. Xu F, Chen H, Travassos da Rosa AP. ve ark. (2007) Phylogenetic relationships among sandfly fever group viruses (Phlebovirus: Bunyaviridae) based on the small genome segment. *Journal of General Virology*, 88, 2312–2319.
98. Charrel RN, Izri A, Temmam S. ve ark. (2007). Cocirculation of 2 genotypes of Toscana virus, southeastern France. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 13(3), 465-468.
99. Mertz GJ. (1997). Bunyaviridae: Bunyaviruses, Phleboviruses, Nairoviruses and Hantaviruses. *Clinical Virology*, 1, A.B.D. Churchill-Livingstone, 943-971.
100. DiBonito P, Nicoletti L, Mochi S. ve ark. (1999). Immunological characterization of Toscana virus proteins. *Archives of Virology*, 144, 1947-1960.

- 101.Cusi MG, Savellini GG, Terrosi C ve ark. (2005). Development of a mouse model for the study of Toscana virus pathogenesis. *Virology*, 333, 66-73.
- 102.Tesh RB, Lubroth J, Guzman H, (1992). Simulation of arbovirus overwintering: survival of Toscana virus (Bunyaviridae: Phlebovirus) in its natural sandfly vector *Phlebotomus perniciosus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 47, 574-581.
- 103.Tesh RB, Modi GB. (1984).Studies on the biology of phleboviruses in sand flies (Diptera: Psychodidae) I. Experimental infection of the vector. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33, 1007-1016.
- 104.Tesh RB, Chaiotis BN, Peralta PH. ve ark. (1974). Acology of viruses isolated from Panamanian sandflies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 24, 258-266.
- 105.Tesh RB, Saidi S, Javadian E. ve ark. (1977). Studies on the epidemiology of sandfly fever in Iran.I. Virus isolates obtained from *Phlebotomus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 26(2), 282-287.
- 106.Verani P, Ciufolini MG, Caciolli S, ve ark. (1988). Ecology of viruses isolated from sandflies in Italy and characterization of a new Phlebovirus (Arbia). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 38, 433-439.
- 107.Cusi MG, Savellini GG, Terrosi C. ve ark. (2005). Development of a mouse model for the study of Toscana virus pathogenesis. *Virology* 333, 66-73.
- 108.Baldelli F, Ciufollini MG, Francisci D. ve ark. (2004). Unusual presentation of life-threatening Toscana virus meningoencephalitis. *Clinical Infection Diseases*, 38, 515-520.
- 109.Braitto A, Corbisiero R, Corradini S. ve ark. (1998). Toscana virus infection of the central nervous system in children: a report of 14 cases. *Journal of Pediatrics*, 132(1), 144-148.

110. Braitto A, Corbisiero R, Corradini S ve ark. (1997). Evidence of Toscana virus infections without central nervous system involvement: a serological study. *European Journal of Epidemiology*, 13(7), 761-764.
111. Echevarria J-M, deOry F, Guisasola M-E ve ark. (2003). Acute meningitis due to Toscana virus among patients from both the Spanish Mediterranean region and the region of Madrid. *Journal of Clinical Virology*, 26, 79-84.
112. Jaajakul S, Arias CA, Hossain M. ve ark. (2012). Toscana meningoencephalitis: A comparison to other viral central nervous system infections. *Journal of Clinical Virology*, 55(3), 204-208.
113. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L. ve ark. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27, 123–147.
114. Echevarría JM, de Ory F, Guisasola ME, ve ark. (2003). Acute meningitis due to Toscana virus infection among patients from both the Spanish Mediterranean region and the region of Madrid. *Journal of Clinical Virology*, 26, 79-84.
115. Sanbonmatsu-Gámez S, Pérez-Ruiz M, Collao X, ve ark. (2005). Toscana virus in Spain. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 11, 1701-1707.
116. Schwarz TF, Gilch S, Jager G. (1993). Travel-related Toscana virus infection. *Lancet*, 342, 803-804.
117. Schultze D, Korte W, Rafeiner P, ve ark. (2012). First report of sandfly fever virus infection imported from Malta into Switzerland, October 2011. *Euro Surveillance*, 17(27), pii=20209.
118. Peyrefitte CN, Grandadam M, Bessaud M, ve ark. (2013). Diversity of *Phlebotomus perniciosus* in Provence, Southeastern France: Detection of Two Putative New Phlebovirus Sequences. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. (baskıda)

- 119.Papa A, Konstantinou GV, Pavlidou V, ve ark. (2006). Sandfly fever virus outbreak in Cyprus. *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 192–194.
- 120.Navarro-Mari J.M., Gómez-Camarasa C. ve ark. (2013). Clinic-Epidemiologic study of human infection by Granada Virus, a new Phlebovirus within the Sandfly Fever Naples serocomplex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(5), 1003-1006.
- 121.Tesh RB, Saidi S, Gajdamovic S. ve ark. (1976). Serologic studies on the epidemiology of sandfly fever in Old World, Bull. *WHO*, 54, 663-674.
- 122.Becker M, Zielen S, Schwarz TF. ve ark. (1997). Pappataci fever. *Klin-Padiatr*, 209(6), 377-379.
- 123.Carhan A, Uyar Y, Ozkaya E. ve ark. (2010). Characterization of a sandfly fever Sicilian virus isolated during a sandfly fever epidemic in Turkey. *Journal of Clinical Virology*, 48(4), 264-269.
- 124.Kocak Tufan Z, Weidmann M, Bulut C, ve ark. (2011). Clinical and laboratory findings of a sandfly fever Turkey Virus outbreak in Ankara. *Journal of Infection*, 63, 375-381.
- 125.Ergunay K, Saygan MB, Aydogan S. ve ark. (2010). Sandfly fever virus activity in Central/Northern Anatolia, Turkey: first report of Toscana virus infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 575-581.
- 126.Tufan ZK, Ergunay K, Bulut C, ve ark. (2012). Ongoing circulation of a novel sandfly fever virus variant, sandfly fever Turkish virus in Ankara province, Turkey. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 804.
- 127.Ergunay K, Sayiner AA, Litzba N, ve ark. (2012). Multicentre evaluation of central nervous system infections due to Flavi and Phleboviruses in Turkey. *Journal of Infection*, 65(4), 343-349.
- 128.Ergunay K, Ismayilova V, Colpak Aİ. ve ark. (2012). A case of central nervous system infection due to a novel Sandfly Fever Virus (SFV) variant: Sandfly Fever Turkey Virus (SFTV). *Journal of Clinical Virology*, 54, 79-82.

- 129.Ergunay K, Aydogan S, Ilhami Ozcebe O, ve ark. (2012). Toscana virus (TOSV) exposure is confirmed in blood donors from Central, North and South/Southeast Anatolia, Turkey. *Zoonoses and Public Health*. 59(2), 148-54.
- 130.Torun EC, Yagci Caglayik D, Uyar Y, ve ark. (2010). Sandfly fever outbreak in a province at Central Anatolia, Turkey. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 44, 431-439.
- 131.Guler S, Guler E, Yagci Caglayik D, ve ark. (2012). A sandfly fever virus outbreak in the East Mediterranean region of Turkey. *International Journal of Infectious Diseases*, 16, 244-246.
132. Erdem H, Ergünay K, Akata F, ve ark. (2013). Trakya Bölgesinde Batı Nil ve Toskana Virüs Koinfeksiyonlarının ilk Bildirimi. *EKMUD Bilimsel Platformu Kitabı SS021*, 152 (20-24 mart 2013 Antalya).
- 133.Darsie RE, Samanidou-Voyadjoglou A.(1997). Keys for the identification of the mosquitoes of Greece. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 13, 247-254.
- 134.Schaffner E, Angel G, Geoffroy B, ve ark. (2001). The Mosquitoes of Europe. [CD-ROM] Paris: IRD editions.
- 135.Artemiev MM. (1980). A revision of sandflies of the subgenus *Adlerius*v (Diptera, Phlebotominae, Phlebotomus). *Zoologicheskii Zhurnal*, 59, 1177–1192.
- 136.Lewis DJ. (1982). A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bulletin of the British Museum Natural History (Entomology)*, 45, 121–209.
- 137.Theodor O. (1958). Psychodidae-Phlebotominae. Fliegen Der Palearktischen region. *Lieferung 201, Schweizerbartische, Verlagsbuchhandlung (Nageleu Obermiller)*, 1–55.
- 138.Johnson DJ, Ostlund EN, Pedersen DD, ve ark. (2001). Detection of North American West Nile virus in animal tissue by a reverse

- transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 7, 739-741.
139. Becker N, Petric D, Zgomba M, ve ark. (2003). Mosquitoes and Their Control. *Plenum Publishers, New York*, 497.
140. Eldridge BF, (2005). Biology of disease vectors: Mosquitoes, the Culicidae, *Elsevier Academic Press, Second Edition*, 785.
141. Service MW, (1993). Mosquitoes (Culicidae). *Medical Insects and Archanids, Chapman and Hall*, 120-240.
142. Snow KR, (1990). Mosquitoes. *Naturalists's Handbook 14, The Richmond Publishing, Great Britain*, 66.
143. Chapman RF. (1998). The Insects Structure and Function. *Cambridge University Pres, Fourth Edition*, 403 - 408.
144. Epstein PR, (2000). Is global warming harmful to health? *Scientific American*, 283, 36 - 43.
145. Odum EP, Barrett GW, (2008). Ekoloji'nin Temel İlkeleri, *Palme Yayıncılık, Beşinci Baskı*, 598.
146. Hamer GL, Kitron UD, Brawn JD ve ark (2008). *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): a bridge vector of West Nile virus to humans. *Journal of Medical Entomology*. 45, 125–128.
147. Reisen WK, Fang Y, Martinez VM. (2006). Vector competence of *Culiseta incidens* and *Culex thriambus* for West Nile virus. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22, 662– 665.
148. Vitek CJ, Richards SL, Mores CN, ve ark. (2008). Arbovirus transmission by *Culex nigripalpus* in Florida, 2005. *Journal of Medical Entomology*. 45, 483– 493.
149. Kilpatrick AM, Kramer LD, Campbell SR. ve ark. (2005). West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 11, 425– 429.

150. Reisen WK, Fang Y, Martinez VM. (2005). Avian host and mosquito (Diptera: Culicidae) vector competence determine the efficiency of West Nile and St. Louis encephalitis virus transmission. *Journal of Medical Entomology*. 42, 367–375.
151. Cupp EW, Hassan HK, Yue X. ve ark. (2007). West Nile virus infection in mosquitoes in the mid-south USA, 2002-2005. *Journal of Medical Entomology*. 44, 117–125.
152. Farajollahi A, Nelder MP. (2009). Changes in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations in New Jersey and implications for arbovirus transmission. *Journal of Medical Entomology*. 46, 1220 –1224.
153. Holick J, Kyle A, Ferraro W, ve ark. (2002). Discovery of *Aedes albopictus* infected with west nile virus in southeastern Pennsylvania. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 18, 131.
154. Sardelis MR, Turell MJ, O’Guinn ML, ve ark. (2002). Vector competence of three North American strains of *Aedes albopictus* for West Nile virus. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 18, 284 –289.
155. Unlu I, Mackay AJ, Roy A, ve ark. (2010). Evidence of vertical transmission of West Nile virus in field-collected mosquitoes. *Journal of Vector Ecology*. 35, 95–99.
156. Monaco F, Lelli R, Teodori L, ve ark. (2010). Re-emergence of West Nile virus in Italy. *Zoonoses Public Health*, 57, 476-486.
157. Calistri P, Monaco F, Savini G, ve ark. (2010). Further spread of West Nile virus in Italy. *Veterinaria Italiana*, 46, 467-474.
158. Calzolari M, Gaibani P, Bellini R, ve ark. (2012). Mosquito, Bird and Human Surveillance of West Nile and Usutu Viruses in Emilia-Romagna Region (Italy) in 2010. *PLoS One*, 7, 38058.
159. Balenghien T, Vazeille M, Grandadam M, ve ark. (2008). Vector Competence of Some French *Culex* and *Aedes* Mosquitoes for West Nile Virus. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 8, 589-596.
160. Vazquez A, Ruiz S, Herrero L, ve ark. (2011). Short Report: West Nile and Usutu Viruses in Mosquitoes in Spain, 2008–2009. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85, 178–181.

161. Almeida APG, Galao RP, Sousa CA, ve ark. (2008). Potential mosquito vectors of arboviruses in Portugal: species, distribution, abundance and West Nile infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102, 823-832.
162. Fyodorova MV, Savage HM, Lopatina JV, ve ark (2006). Evaluation of potential West Nile virus vectors in Volgograd region, 2003 (Diptera: Culicidae): species composition, bloodmeal host utilization, and virus infection rates of mosquitoes. *Journal of Medical Entomology*, 43, 552-563.
163. Orshan L, Bin H, Schnur H, ve ark. (2008). Mosquito Vectors of West Nile Fever in Israel. *Journal of Medical Entomology*, 45, 939-947.
164. Papa A, Xanthopoulou K, Gewehr S, ve ark. (2011). Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 1176-1180.
165. Alten B. Batı Nil virusu enfeksiyonunda vektör özellikleri ve ekoloji. *Batı Nil Virüsü Sempozyumu Kitabı*, 20-21 Eylül 2012, Ankara.
166. Özbel Y. Türkiye'de seçilmiş 4 ildeki sineklerde Batı Nil virusunun araştırılması. *Batı Nil Virüsü Sempozyumu Kitabı*, 20-21 Eylül 2012, Ankara.
167. Ergünay K, Gunay F, Oter K. ve ark. (2013). Arboviral surveillance of field-collected mosquitoes reveals circulation of West Nile virus (WNV) Lineage 1 strains in Eastern Thrace, Turkey. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. (baskıda)
168. Ozkul A, Ergunay K, Koysuren A, ve ark. (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), 546-551.
169. Nicholas A, Panella KL, Burkhalter SA. ve ark. (2005). Rapid West Nile Virus Antigen Detection. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 11(10), 1633-1635.
170. Siirin M, Sargent C, Langer RC ve ark. (2004). Comparative Sensitivity of the VecTest Antigen-Capture Assay, Reverse Transcriptase-PCR, and

- Cell Culture for Detection of West Nile Virus in Dead Birds. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 4(3), 204-209.
171. Ergünay K, Gunay F, Oter K. ve ark. (2013). Arboviral surveillance of field-collected mosquitoes reveals circulation of West Nile virus (WNV) Lineage 1 strains in Eastern Thrace, Turkey. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. (baskıda).
172. Christoferson CR, Roy FA, Mores NC. (2010). Factors associated with mosquito pool positivity and the characterization of the West Nile viruses found within Louisiana during 2007. *Virology Journal*, 7, 139.
173. Léger, N., Depaquit, J. (2002). Systématique et biogéographi des Phlébotomes (Diptera: Psychodidae). *Annales de la Société Entomologique de France (Nouvelle série)*, 38 (1-2), 163-175.
174. Young DG, Perkins PV, (1984). Phlebotomine sandflies of North America (Diptera: Psychodidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 44, 263–304.
175. Tesh RB, (1988). The genus Phlebovirus and its vectors. *Annual Review of Entomology*, 33, 169-181.
176. Alexander B, (2000). Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 14, 109-122.
177. Fischer D, Moeller P, Thomas SM, ve ark. (2011). Combining climatic projections and dispersal ability: a method for estimating the responses of sandfly vector species to climate change. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, 1407.
178. Naucke TJ, Menn B, Massberg D, ve ark. (2008). Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitology Research*, 103 (1), 65-68.
179. Desjeux P. (1996). Leishmaniasis. Public Health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, 14(5), 417-423.
180. Bhatt PN, Rodrigues FM. (1967). Chandipura virus: a new arbovirus isolated in India from patient with febrile illness. *Indian Journal of Medical Research*, 55, 1295-305.

181. Depaquit J, Grandadam M, Fouque F. ve ark. (2010). Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Eurosurveillance*, 15(10), pii=19507.
182. Izri A, Temmam S, Moureau G ve ark. (2008). Sandfly fever Sicilian virus, Algeria. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 14(5), 795-797.
183. Charrel NR, Izri A, Temmam S. ve ark. (2006). Toscana Virus RNA in *Sergentomyia minuta* Flies. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 12(8), 1299-1300.
184. Moureau G, Bichaud L, Salez N. ve ark. (2010). Molecular and serological evidence for the presence of novel phleboviruses in sandflies from northern Algeria. *The Open Virology Journal*, 4, 15-21.
185. Rodhain F, Madulo-Leblond G, Hannoun C. ve ark. (1985). Le virus Corfou. Un nouveau Phlebovirus virus isole de Phlebotomes en Grece. *Annales de l'Institut Pasteur/Virologie*, 126, 161-166.
186. Zhioua E, Moureau G, Chelbi I. ve ark. (2010). Punique virus, a novel phlebovirus, related to sandfly fever Naples virus, isolated from sandflies collected in Tunisia. *J Gen Virol* 91, 1275-1283
187. Charrel RN, Moureau G, Temmam S. ve ark. (2009). Massilia virus, a novel Phlebovirus (Bunyaviridae) isolated from sandflies in the Mediterranean. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 9, 519-530.
188. Collao X, Palacios G, de Ory F. ve ark. (2010). Granada virus: a natural phlebovirus reassortant of the sandfly fever Naples serocomplex with low seroprevalence in humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83, 760-765.
189. Alptekin D, Kasap M, Luleyap U. ve ark. (1999). Sandflies (Diptera: Psychodidae) associated with epidemic cutaneous leishmaniasis in Sanliurfa, Turkey. *Journal of Medical Entomology*, 36(3), 277-281.
190. Volf P, Ozbek Y, Akkafa F. ve ark. (2002). Sandflies (Diptera: Phlebotominae) in Sanliurfa, Turkey Relationship of *Phlebotomus sergenti* with the Epidemic of Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Medical Entomology*, 39(1), 12-15.

- 191.Yaman M, Ozbel Y. (2004). The sandflies (Diptera: Psychodidae) in the Turkish province of Hatay: some possible vectors of the parasites causing human cutaneous leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 98(7), 741-750.
- 192.Çiçek H, Yaman M, Yağcı S. ve ark. (2005). Afyon yöresi *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) türleri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 52, 49-51.
- 193.Değer S, Yaman M. (2005). Van Yöresi Phlebotominae (Diptera: Psychodidae)Türleri. *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(1), 55-59.
- 194.Ertabaklar H, Ozensoy Toz S, Taylan Ozkan A. ve ark. (2005). Serological and entomological survey in a zoonotic visceral leishmaniasis focus of North Central Anatolia, Turkey, Corum Province. *Acta Tropica*, 93(3), 239-246.
- 195.Toprak S, Ozer N. (2005). Sand fly species of Sanliurfa province in Turkey. *Medical and Veterinary Entomology*, 19, 107-110.
- 196.Dogan N, Ozbel Y, Ozensoy Toz S. ve ark. (2006). Seroepidemiological survey on canine visceral leishmaniasis and the distribution of sandfly vectors in Northwestern Turkey: Prevention strategies for childhood visceral leishmaniasis. *Journal of Tropical Pediatrics*, 52(3), 212-217.
- 197.Yaman M, Dik B. (2006). An inventory of the phlebotomine sandflies (Diptera:Psychodidae) found in the Turkish province of Konya, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 100(3), 265-275.
- 198.Simsek F, Alten B, Caglar S. ve ark. (2007). Distribution and altitudinal structuring of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in southern Anatolia, Turkey: their relation to human cutaneous leishmaniasis. *Journal of Vector Ecology*, 32(2), 269-279.
- 199.Erisoz Kasap O, Belen A, Kaynas S. ve ark. (2009). Activity Patterns of Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Species and Comparative Performance of Different Traps in an Endemic Cutaneous Leishmaniasis Focus in Cukurova Plain, Southern Anatolia, Turkey. *Acta Veterinaria Brno*, 78, 327-335.

- 200.Hayal T, Sevil N, Töz S. ve ark. (2009). Çanakkale İli Ayvacık Bölgesinde Zoonotik Visseral Leishmaniasisin Serolojik ve Entomolojik Olarak Araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 33(2), 109-113.
- 201.Svobodová M, Alten B, Zídková L. ve ark. (2009). Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *International Journal for Parasitology*, 39(2), 251-256.
- 202.Toz S, Nasereddin A, Ozbel Y. ve ark. (2009). Leishmaniasis in Turkey: molecular characterization of *Leishmania* from human and canine clinical samples. *Tropical Medicine & International Health*, 14, 1401-1406.
203. Yağcı Ş, Dinçer Ş, Eren H. (1997). Ankara yöresi *Phlebotomus* (Diptera: *Psychodidae*) Türleri. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 22(1), 53-56.
- 204.Charrel RN, Izri A, Temmam, S. ve ark. (2007). Cocirculation of 2 genotypes of Toscana virus, southeastern France. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 13, 465-468.

