



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VİROLOJİ ANABİLİM DALI
VVR-YL-2014-001

**MUĞLA VE AYDIN İLLERİNDE AKABANE VİRUS (AKAV)
ENFEKSİYONUNUN SEROLOJİK OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

B. Taylan KOÇ

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Nural EROL**

AYDIN - 2014

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VİROLOJİ ANABİLİM DALI
VVR-YL-2014-001**

**MUĞLA VE AYDIN İLLERİNDE AKABANE VİRUS (AKAV)
ENFEKSİYONUNUN SEROLOJİK OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

B. Taylan KOÇ

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Nural EROL**

AYDIN - 2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Viroloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Vet. Hek. Bahattin Taylan KOÇ tarafından hazırlanan “Muğla ve Aydın İllerinde Akabane Virus (AKAV) Enfeksiyonunun Serolojik Olarak Araştırılması” başlıklı tez, 28.11.2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

Yrd.Doç.Dr. Nural EROL

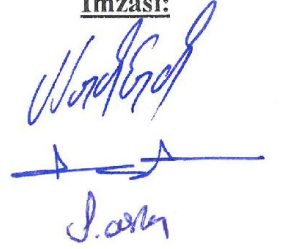
Adnan Menderes Üniversitesi

Prof.Dr. M.Tolga TAN

Adnan Menderes Üniversitesi

Doç.Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

Adnan Menderes Üniversitesi



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans/Doktora Tezi Enstitü Yönetim Kurulunun..... Sayılı kararıylatarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Akabane virusu (AKAV) *Bunyaviridae* familyası *Ortobunyavirus* genusunda yeralan, sokucu sineklerle bulaşan, sığır, koyun ve keçilerin erişkinlerinde genellikle subklinik enfeksiyon oluşturan, ancak intrauterin enfeksiyonu sonrası fötusta kongenital anaomalilere, abortlara, ölümlü sonuçlanan zayıf ve güçsüz yavru doğumlarına neden olan bir etkidir. AKAV kan emen sineklerle taşınmasından dolayı *Arbovirus* sınıfına girer. AKAV her ne kadar erişkin hayvanlarda subklinik seyretse de çok büyük ekonomik kayıplara neden olabilmektedir.

Muğla ve Aydın bölgelerinde hayvanlarda enfeksiyon meydana getiren birçok arbovirus vardır. Geçmiş yıllarda bölgede yapılan çalışmalarda AKAV'unun varlığı ortaya konmuş olması ve ayrıca, Gıda, Tarım ve Ormancılık Bakanlığı araştırma enstitülerinin verdiği rapora göre 2010 yılında bölgede salgın halinde görülen kongenital anomali ve abort olgularının etkenlerinden biri olarak AKAV tespit edilmesi zaman zaman bu enfeksiyonun ortaya çıktığını göstermekte olup, bu bölgelerde mücadeleye yardımcı olacak daha düzenli epidemiyolojik taramaların yapılması gerekliliğine vurgu yapmaktadır.

Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (ADÜ-BAP) tarafından desteklenen (Proje No: VTF-12033) bu çalışmada; çeşitli hayvan türlerinde AKAV enfeksiyonunun varlığı ve yaygınlığı serolojik olarak araştırılmıştır. Muğla ve Aydın illerinde tesadüfi seçilmiş toplam 375 hayvandan sağlanan serumlarda AKAV'una karşı antikor varlığı test edilmiştir.

Bu tez çalışması ile Muğla ve Aydın illerinde yetiştirilen deve, keçi, koyun ve sığırlarda AKAV enfeksiyonunun serolojik olarak varlığının ve yaygınlık oranının saptanması amaçlanmıştır. Ayrıca, yetiştiricilere gerekli bilginin verilmesi, akabaneye ve diğer enfeksiyonlara karşı alınması gereken önlemler konusunda önerilerde bulunulması ve yetiştirici ile üniversite olanakları arasında bir köprü kurulması planlanmıştır. AKAV hakkında yapılan bu çalışma ile, bölgedeki işletmelerde hastalıklardan kaynaklanan kayıpların azaltılması ve diğer enfeksiyonlarla mücadele edilmesi amacıyla daha sonra yapılacak geniş kapsamlı araştırmalara, model teşkil edebilmesi hedeflenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Etiyoloji.....	5
1.2. Epizootiyoloji.....	7
1.3. Patogenez ve Patoloji.....	8
1.4. Klinik Bulgular.....	12
1.5. Tanı.....	13
1.5.1. Klinik Tanı.....	13
1.5.2. Laboratuvar Tanısı.....	14
1.5.2.1. Direkt enfeksiyon tanısı (Virolojik yöntemler).....	14
1.5.2.2. İndirekt enfeksiyon tanısı (Serolojik yöntemler) Enzyme Linked Immunesorbent Assay (ELISA).....	15
1.6. İmmunoloji.....	16
1.7. Korunma ve Kontrol.....	17
1.7.1. Vektör Kontrolü.....	17
1.7.1.1. Vektörlerin doğal yaşam ortamlarını değiştirmek.....	18
1.7.1.2. Yetişkin vektörlerin ilaçlanması.....	18
1.7.1.3. Larvaların ilaçlanması.....	20
1.7.2. Kovucu/Uzaklaştırıcı İlaçlar.....	20
1.7.3. Aşılama.....	21
1.8. AKAV Enfeksiyonun Türkiye ve Dünya'daki Durumu	22
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
2.1. GEREÇ.....	25
2.1.1. Serum Örnekleri.....	25
2.1.2. ELISA Kiti.....	26
2.2. YÖNTEM.....	27
2.2.1. Kan Serumu Örneklerinin Hazırlanması.....	27

2.2.2.	ELISA.....	27
3.	BULGULAR.....	31
3.1.	ELISA Sonuçları.....	31
4.	TARTIŞMA.....	33
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	36
6.	ÖZET.....	40
7.	SUMMARY.....	41
8.	KAYNAKLAR.....	42
	EKLER.....	48
	ÖZGEÇMİŞ	49
	TEŞEKKÜR.....	50

KISALTMALAR DİZİNİ

AKAV	Akabane Virus
AH	Arthrogryposis – Hydranencephaly
BHK-21	Baby Hamster Kidney 21
C6/36	Aedes albopictus clone C6/36
cELISA	Competative ELISA
CPE	Cytopathogenic Effect - Sitopatojenik Etki
DKID ₅₀	Doku Kültürü İnfektif Doz 50
DMEM	Dulbecco's Minimum Essential Medium
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPA	U.S. Environmental Protection Agency
Gc	Glikoprotein C
Gn	Glikoprotein N
HK	Hücre Kültürü
HmLu-1	Hamster Lung Hücre Kültürü
HRP	Horse Radish Peroxydase
IgG	İmmunglobulin G
IgM	İmmunglobulin M
KBB	Kan-Beyin Bariyeri
KC	Drosophila embriyo
L	Large (Geniş) protein
M	Medium (Orta) protein
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
mRNA	Messenger (mesajcı)RNA
nm	Nanometre
NSs	Non-Structural (yapısal olmayan) proteinler
OD	Optik Dansite
PCR	Polymerase Chain Reaction (PCR)
RNA	Ribonükleik Asit
RNP	Ribonükleoprotein
RNAP II	RNA polimeraz II
RT-PCR	Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction
RT-LAMP	Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay
S	Small (Küçük) protein
SBV	Schmallenberg Virus
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF	Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekroz Faktörü)
Vero	African Green Monkey Kidney (Afrika Yeşil Maymunu Böbrek Hüc.)

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. Hayvanların omurgasına pour-on olarak uygulanan Pyrethroid veya pyrethrin bileşik içeren bazı ilaçlar.....	19
Çizelge 1.2. Ahır ve çevresine uygulanabilen Pyrethroid bileşik içeren bazı ilaçlar.....	19
Çizelge 1.3. Vektör kontrolünde kullanılan larvasit ve insektisitler.....	20
Çizelge 2.1. Örnekleme yapılan illerde hayvan sayıları.....	25
Çizelge 2.2. ELISA Test değerlendirme çizelgesi.....	29
Çizelge 3.1. Örnekleme yapılan hayvan sayısı ve ELISA Testi sonuçları.....	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Örneklemenin yapıldığı lokasyonlar.....	26

1. GİRİŞ

Bir bölgedeki hastalık etkenlerinin belirlenmesi, hastalıkların profilaksisi ve mücadelesi yönünden önem taşımaktadır. Yapılan seroepidemiolojik çalışmalar, hastalıkların varlığının ve yaygınlığının belirlenmesini sağlamaktadır. Özellikle bölgemiz açısından arbovirusların meydana getirmiş olduğu enfeksiyonların potansiyel durumunu izlemek için bu tür çalışmalar büyük önem arzeder. Ülkemizde geçmiş yıllarda değişik zaman dilimlerinde arbovirus enfeksiyonları ortaya çıkmış ve daha sonra belirsiz periyotlarla birkaç kez tekrar görülmüştür. Özellikle Akabane virusu (AKAV), Mavi Dil virusu, Epizootik Hemorajik Hastalık virusu, Sığırların Üç Gün Hastalığı virusu (Bovine Ephemeral Fever virus) bölgede kayıplara yol açan arboviral etkenlerdendir.

Akabane Virus (AKAV) enfeksiyonu bölgede anomalili yavru doğumlarına ve abortlara neden olan en önemli arboviral enfeksiyonların başında gelmektedir. Türkiye'nin çeşitli yörelerinde AKAV enfeksiyonunun varlığının bilinmesine karşın bölgemizdeki varlığı ve yaygınlığı konusundaki bilgiler eski ve çok sınırlıdır. Ayrıca bölgemizde klinik olarak benzer hastalıkların bulunması tanıyı ve mücadeleyi güçleştirdiği için söz konusu enfeksiyonun ve diğer enfeksiyonların bölgedeki durumunun düzenli olarak yapılan taramalarla saptanmasını zorunlu kılmaktadır.

Muğla ve Aydın tarım ve hayvancılığın yoğun olduğu illerdir. Bu illerdeki tarımsal ve hayvansal üretimler, il nüfuslarına ve yüzölçümlerine oranlandığında; Türkiye'de diğer illere göre üst sıralarda yer almaktadır. Özellikle Aydın ve çevresi deve yetiştiriciliği bakımından Türkiye'deki en önemli yöredir. Türkiye'nin birçok yerinden (Akdeniz, İç Anadolu Bölgesi'nin güneyi ve tüm Ege Bölgesi) gerek geleneksel deve güreşleri için, gerekse kesim amaçlı hayvanlar Aydın yöresinde toplanmaktadır. Türkiye ekonomisinde önemli bir yeri olmaması nedeniyle deve popülasyonu son zamanlarda çok hızlı bir azalma göstermiştir. Sayıları bu gün 2.000'den azdır. Deve yetiştiriciliği sosyal ve kültürel amaçlı olarak başta Aydın ili olmak üzere bazı bölgelerde hala devam ettirilmektedir. Türkiye ekonomisinde deve yetiştiriciliği önemli bir yer tutmamakla birlikte, sosyal ve kültürel amaçlı Türkiye'nin bazı illerinde deve yetiştiriciliği yapılmaktadır.

Deve yetiştiriciliği bu bölgede çok önemli olsa da halen ne yetiştiriciler tarafından ne de yetkili kurumlar tarafından develerde varolan viral hastalıklar ve sağlık riskleri açısından herhangi bir tarama programı oluşturulmamıştır. Bu yüzden bu viral hastalıklar karşısında develerin immun sisteminin nasıl bir tepki oluşturacağı bilinmemektedir. Buradan hareketle; büyük ve küçük ruminantlarda görülen AKAV enfeksiyonu taraması ilk defa ülkemizdeki develer için bu tez çalışması ile sağlanacaktır.

Muğla ve Aydın bölgelerindeki hayvanlarda enfeksiyon meydana getiren birçok arbovirus vardır. Geçmiş yıllarda bölgede yapılan çalışmalarda AKAV'unun varlığı ortaya konmuş olması ve ayrıca, Gıda, Tarım ve Ormancılık Bakanlığı araştırma enstitülerinin verdiği rapora göre 2010 yılında bölgede salgın halinde görülen kongenital anomali ve abort olgularının etkenlerinden biri olarak AKAV tespit edilmesi zaman zaman bu enfeksiyonun ortaya çıktığını göstermektedir. Bu bilgiler bölgelerde mücadeleye yardımcı olacak daha düzenli epidemiyolojik taramaların yapılması gerekliliğine vurgu yapmaktadır.

Hayvan yoğunluğunun fazla olduğu bu coğrafyada hayvan hastalıklarının görülme insidensi diğer bölgelere nazaran daha yüksek olmaktadır. Bu hastalıklarda korunma ve kontrol, mücadelede en önemli faktörlerdendir. Ancak hayvan hastalıkları ile yapılan bu mücadelede, bölgede hangi hastalıkların sirküle olduğunun tespiti büyük önem taşımaktadır. Bölgede sirküle olan bu hastalıklar için, bulaşma riski ve hayvanlarda meydana getirmiş olduğu olumsuz etki bakımından en önemli olanı virus kaynaklı enfeksiyonlardır. Bazı viral enfeksiyonlar birçok erişkin hayvanda subklinik seyredebilir ki bu hayvanlar klinik semptom göstermedikleri için etkenin sessizce yayılmasında kaynak olarak görev yapabilmektedir.

Viral enfeksiyonların birçok bulaşma yolu mevcuttur. En önemli bulaşma yollarından biri de vektör aracılı bulaşmalardır. Arthropod vektör aracılı viral enfeksiyonlar, Arboviral enfeksiyon olarak adlandırılmaktadır. Ülkemizde ortaya çıkan arboviral enfeksiyonların en önemli faktörü sokucu sineklerdir. Ülkemizde sokucu sinek olarak özellikle *Culicoides* cinsi sinekler öne çıkmaktadır. Muğla ve Aydın çevresinde 33 *Culicoides* türü saptanmış ve yoğunluk bakımından en fazla *C. imicola* varlığından bahsedilmiştir (Dik ve ark 2012).

Türkiye'nin daha sıcak olan batı ve güney bölümünde vektör aracılı hayvan hastalıkları diğer bölgelere nazaran daha fazladır. Özellikle Muğla ve Aydın bu hastalıklar bakımından başı çekmektedir. Muğla ve Aydın yöresinde hayvanlar arasında birçok arboviral enfeksiyon görülebilmektedir. Bu enfeksiyonlardan olan Akabane, Mavi Dil, Epizootik Hemorajik Hastalık, Bovine Ephemeral Fever bölgede hayvancılığı tehdit eden önemli hastalıklardan bir kaçıdır. Ayrıca hem hayvan hem de insanları tehdit eden Batı Nil Virusunun serolojik olarak tespiti de yapılmıştır (Kalaycıoğlu ve ark 2012). Yukarıda bahsedilen subklinik enfeksiyonların başında Akabane hastalığı gelir ve sokucu sinekler ile taşınarak sağlıklı hayvanları enfekte ederler.

Akabane hastalığı Aydın başta olmak üzere Güney Ege'de sığır, koyun ve keçiler arasında yaygın bir hastalıktır. Özellikle sokucu sineklerin aktif döneme geçtiği Ocak – Temmuz aralığında virusun sirkülasyonu da başlar (Taylor ve Mellor 1994). Bölgede Akabane virusunun (AKAV) varlığı düzenli olmayan periyotlarla serolojik olarak birkaç defa ortaya konmuştur (Urman ve ark 1980, Taylor ve Mellor 1994). Ancak bu bilimsel çalışmalar sınırlı kalmış olup, güncel ve geniş kapsamlı bir veri bulunmamaktadır.

Akabane virusu, ilk defa Urman ve ark (1980) tarafından bildirilmiştir. Bu bildirim Aydın'dan olması ve şiddetli bir arthrogryposis – hyranencephaly (AH) sendromunun salgın şeklinde görülmesi epizootiyolojik bakımdan önemlidir. Bu ilk bildirimden sonra enfeksiyon endemik olarak bölgede gözlemlenmesi devam etmiştir. AKAV hakkında yapılan çalışmalarda hastalığın belirsiz zaman dilimlerinde tekrardan aynı bölgede çıktığı bildirilmiştir (Taylor ve Mellor 1994). AKAV virusunun belli bir zaman diliminde sessiz kalıp, daha sonra bu bölgede tekrar ortaya çıkması yeni nomenklatürde “re-emerging disease” olarak adlandırılabilir.

2010 senesinde ise tekrardan ortaya çıkan ve Muğla-Aydın illerinde şiddetli klinik tablo ile kendini gösteren AKAV bölgedeki varlığını bir kez daha göstermiştir. 2010 senesinde Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü tarafından bildirilen raporda Muğla ve Aydın illerinden toplanan 19 örnekten 18'inde AKAV antikor varlığı tespiti edilmiştir. Raporun sonunda elde edilen serolojik tanı verisi ile hayvanlardaki klinik verinin örtüştüğü vurgulanarak enfeksiyonun Akabane hastalığı olduğu bildirilmiştir.

Dünya çapında da yaygın olan AKAV, en sık Avustralya ve Uzakdoğu ülkelerinde görülmektedir. AKAV ilk kez 1959 senesinde Japonya'nın Akabane bölgesinde *Aedes vexans* ve *Culex tritaeniorhynchus*'tan izole edilmiştir (Kurogi ve ark 1987). Bu yüzden AKAV'a izole edildiği yerin adı verilmiştir. Ayrıca AKAV, 1976'da Kenya'da bulunan *Anopheles fenestus*'tan (Metselaar ve Robin 1976) ve 1978'de Avustralya'da bulunan *C. brevitarsis*'ten izole edilmiştir (George ve ark 1978). 1972 – 77 yılları arasında Japonya'da meydana gelen salgınlarda 42.000 sığırın etkilendiği, bunlarda %37'sinin abort ve prematür doğum, %22'sinin ölü doğum, %41'nin ise kongenital AH sendromlu buzağı doğumu ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Avustralya'da 1974'de ortaya çıkan salgında ise 5.000 AH sendromlu vak'a bildirilmiş olup, Japonya'daki deneyim ışığında yapılan değerlendirmeler ile etkilenen hayvan sayısının yaklaşık 15.000 olabileceği vurgulanmıştır (Inaba ve Matumoto 1990).

İsrail'de 1969-70 yılları arasında meydana gelen salgında ise, doğan yavruların %2-4'ünde AH sendromu gözlenmiştir. Ayrıca kongenital arthrogryposis vakalarının kasım ile şubat ayları arasında görüldüğü ve aralık ayında ise en yüksek düzeyde çıktığı, kongenital hydranencephaly vakalarının ise kasım ile haziran ayları arasında görüldüğü bildirilmiştir (Markusfeld ve Mayer 1971).

Son yıllarda biyoteknoloji yöntemlerin gelişmesi ile birlikte AKAV'ın sadece serolojik değil virolojik olarak tespiti de kolaylaşmıştır. Ancak bu virusun sessiz döneme sahip olması ve arboviral bir enfeksiyon olması sebebiyle belirli periyotlarda yapılan serolojik çalışmaların büyük önemi vardır. Bu sayede hem antikorun hem de hastalığın durumu güncel olarak takip edilmiş olur. Dünya'da da bu hastalık için epidemiyolojik çalışma önemli olup halen asıl teşhis metodu olarak görülmektedir. Sudan'da yapılan AKAV serosurveylans çalışmasında toplamda antikor varlığı %9,24 tespit edilmiştir (Elhassan ve ark 2014). Oem ve ark (2012)'nin Kore'de 2010 senesinde çıkan salgında alınan serum örneklerinden baktıkları nötralizasyon testinde ise %85 antikor pozitiflik saptanmıştır. Kuzeybatı Çin'de yapılan bir diğer çalışmada ise sığırlarda %20,3, koyunlarda ise %18,1 olarak saptamıştır (Jun ve ark 2012). Bu bölgelerde daha önce yapılan serolojik bulgular dikkate alındığında, karşılaştırma sonucu farklı antikor pozitiflik oranları söz konusu olduğu anlaşılmaktadır. Bu bağlamda AKAV subtropik ve tropik bölgelerde değişken düzeylerde bulunabilmektedir.

Her ne kadar AKAV Türkiye’de çok büyük salgınlara neden olmayıp endemik seyretse de özellikle ekonomik açıdan yetiştiricilere çok büyük zarar vermektedir. Bu yüzden bu virüsle ve diğer arboviruslarla mücadele büyük önem arz etmektedir. Bu bağlamda bölgedeki güncel durumun bilinmesi, antikor varlığının ne oranda olduğu ve hastalığın olup olmadığı araştırılmalıdır. Ayrıca günümüze kadar yapılan serolojik tespitlerin yanısıra virolojik ve moleküler olarak virüsün tespiti ile kesin teşhis sağlanarak bölgedeki virüsün genetik karakteri hakkında bilgi sahibi olmak gerekmektedir.

Bu çalışma ile Türkiye’de Akabane virus enfeksiyonlarının ilk bildirilen yerin Aydın olması önemi ile Güney Ege Bölgesi’nde söz konusu virüsün güncel varlığı ve yaygınlığı serolojik olarak tespit edilmesi, bu enfeksiyona karşı kontrol ve mücadele amaçlı yeni stratejilerin ve yöntemlerin geliştirilmesine yol gösterebilecektir. Yetiştiriciler bu enfeksiyon konusunda bilgilendirilebilecek, hayvanların bu hastalıktan korunabilmesi için tedbirler alınabilecek ve dolayısıyla hastalıktan kaynaklanan ekonomik kayıpların azaltılmasına yardımcı olacaktır.

1.1. Etiyoloji

Bunyaviridae bünyesinde yaklaşık 350 virüsü bulunduran en geniş virus familyasıdır. *Bunyaviridae* beş genusa ayrılır. Bunlar; *Orthobunyavirinae*, *Hantavirinae*, *Phlebovirinae*, *Tospovirinae*, *Nairovirinae*’dir (Elliott ve Blakqori 2011). Özellikle Hantaviruslar ve Kırım – Kongo Kanamalı Ateşinin etkenini bünyesinde barındıran Nairoviruslar insan sağlığı için vektör aracılı zoonotik potansiyel taşıması açısından önemlidir. Orthobunyaviruslar ise hem insanlarda hem de hayvanlarda enfeksiyon oluşturan virüsleri içermesi ve yüksek nörotropizm göstermesi açısından önem arz etmektedir (Elliott ve Blakqori 2011).

Orthobunyavirus genusunda yeralan virüsler hemagglütinasyon inhibisyon ve antikor nötralizasyon sonuç ilişkilerine göre gruplandırılmışlardır. Bu sayede toplam 18 serogrup ortaya çıkmıştır (Kinney ve Calisher 1981). Bu 18 serogrup içindeki önemli bazı genuslar şunlardır; Simbu, Bunyamwera, California vs.

Akabane virusu, *Bunyaviridae* familyası *Orthobunyavirus* genusunda yer almaktadır. Ayrıca Simbu serogrubunda yer alır. Akabane virusun, bu serogruba bulunan diğer viruslarla çapraz reaksiyon varlığı komplement fiksasyon testi ile saptanmıştır (Kinney ve Calisher 1981). Ancak antikor nötralizasyon testi ile bunun saptanamamış olması limitli bir çapraz antikor varlığına gösterge olabilir. Akabane virus, Orthobunyavirusların genel etiyolojik özelliklerini taşır.

Akabane virusu sferikal yapıda ve 90 -100 nm çapındadır. Lipid karakterde zarfa sahiptir. Bu zarf içerisinde glikoprotein peplomerleri “spike” şeklinde gömülü olup uçları çıkıntılıdır. Bu zarf üç segmentli RNA genomunu sarar. Bu segmentlerin herbiri farklı uzunlukta olup, large (L), medium (M), and small (S) olarak adlandırılırlar. RNA segmentleri tek iplikçikli, helikal formda bulunur ve negatif polaritelidirler. Her bir segment farklı proteinleri kodlar. Ancak kendine özgü kodladığı proteinin yanısıra her segment ayrıca bir yapısal olmayan proteini de kodlamaktadır. L segmenti virus replikasyonu için zorunlu olan RNA bağımlı RNA-polimerazı kodlar. M segmenti konakçı hüresine adsorbsiyonda görev alan ve zarfta bulunan glikoproteinleri (Gn ve Gc) kodlar. S segmenti ise nükleoproteinleri (N) kodlar.

Akabane virusu, Zarflı bir virus olmasından dolayı eter, kloroform ve tripsinde çok çabuk inaktive olabilmektedir. Sıcaklık artışlarında da çok çabuk inaktive olabilen bir virustur. Virus, 37°C’de her saat 0.3 log düzeyinde titre kaybederken, 56°C’de birkaç saatte inaktive olmaktadır. Ancak +4°C’de tutulan kan numunelerinde birkaç ay virusun varlığını devam ettirdiği saptanmıştır. Yıllar boyunca saklamak gerektiğinde ise uygun protokoller ile -80°C’de veya daha düşük sıcaklıklarda bu virus saklanabilmektedir (Elliott ve Blakqori 2011).

Virusun izolasyonu ve üretimi amacıyla birçok hücre kültürü kullanılmaktadır. Memeli hücre kültürü olarak en çok kullanılan hücre kültürleri; African Green Monkey Kidney (VERO), Baby Hamster Kidney (BHK-21) ve Hamster Lung Cells (HmLu-1)’dir. Son yıllarda ise virus üremesini daha yoğun sağladığı tespit edilen insekt kökenli hücre hatları kullanılmaktadır. Burada sağlanan viral yükün arttırılmasıyla memeli hücrelerine ekim sonrası sitopatojenik etki (CPE) gözlemlenebilir. İnsekt hücre hatları arasında C6/36 akabane ve diğer arbovirusların üremesinde en sık kullanılanıdır. İnsekt hücrelerinde

memeli hücre hatlarından farklı olarak virus CPE meydana getirmez ve oda sıcaklığında (25°C) inkübe edilir (Elliott ve Blakqori 2011).

Orthobunyavirusların hemen hepsi arboviraldir ve nörotropiktir. Ülkemiz hayvancılığı açısından değerlendirildiğinde bu genustaki en önemli etkenlerin başında Akabane virus gelmektedir. Ayrıca Kasım 2011'de Almanya'da ortaya çıkan Schmollenberg virusu da aynı grupta yer almaktadır. Bu grupta insan hekimliğini de ilgilendiren önemli viral etkenler bulunmaktadır. La Crosse virus, Bunyamwera virus, Oropuche virus yalnızca birkaçına örnek olarak verilebilir (Varela ve ark 2013).

1.2. Epizootiyoloji

Bulaşmada en büyük rolü *Culicoides spp.* üstlenmiştir. Özellikle larvalardan çıkış sonrası aktif döneme ulaşan *Culicoides* türü sokucu sinekler biyolojik vektör olarak görev yaparlar. *Culicoides*lerin yaşam döngüsü yumurta, dört larval aşama, pupa evresi ve erişkinden oluşur. Yumurtalar genelde yığınlar halinde bulunur ve 2-7 günde açılır. Dört larval evrenin tamamlanması ise dört günden birkaç haftaya kadar sürebilir. Sıcak ülkelerde birçok *Culicoides* türü, kış aylarını bu dört larval biçimden birinde bekleyerek geçirir. Pupa evresi 2-3 gün sürer ancak bazen 3-4 haftaya kadar uzayabilir. Birçok yetişkin sineğin ömrü 20 günden azdır ancak istisnai olarak birkaç ay yaşayabilirler (Vellema 2008).

Erkek *Culicoides*ler kan ile beslenmezken yetişkin dişi *Culicoides*ler kan ile beslenirler. Bu nedenle sadece yetişkin dişi *Culicoides*ler virusun bulaşmasında etkilidirler. Ayrıca viremik omurgalı hayvanların kanıyla beslenirken AKAV ile enfekte olmaktadır. Sinek beslendikten sonra kan doğrudan orta bağırsağın arka bölümüne gider, ve AKAV bağırsak hücrelerinde çoğalır (Mellor ve ark 2000).

Projeni virus partikülleri bağırsak hücrelerinden çıkarak hemosele¹ karışırlar ve tükrük bezini de içeren ikincil hedef organları enfekte ederler. AKAV, *Culicoides*lerin tükrük bezlerinde 10-14 gün boyunca çoğalır ve yeni bir konağın vektör tarafından kanının emilmesi sırasında sineğin tükrük salgısındaki projeni viruslar konağın kan dolaşımına

¹ Hemosel: Artropodların genel vücut yapısında ikincil boşluğu olup, içi sıvı ile dolu ve açık dolaşım sisteminin kanlı bölümü olan boşluktur.

geçer. Culicoideslerin AKAV enfeksiyonları yaşamları boyunca kalıcıdır. AKAV, vektör Culicoideslerin tükrük bezlerindeki 10-14 günlük kuluçka süresini tamamladıktan sonra ancak başka bir konağa bulaştığında o konağı enfekte edebilme gücüne sahiptirler (Mellor ve ark 2000).

Vektörler yüksek sıcaklıkta kaldığı zaman virusun kuluçka dönemi daha kısa olur. Buna bağlı olarak sıcaklık, virusun bulaştırılmasında ve enfeksiyonda, vektörlerin yaşamını sürdürmesinde, beslenmelerinde ve de AKAV'unun vektörlerdeki replikasyonunda büyük rol oynamaktadır (Mellor ve ark 2000, Vellema 2008).

Dik ve ark (2012) yaptığı çalışmada arboviral enfeksiyonları taşıyan vektörlerin türleri incelenmiştir. Özellikle Aydın bölgesinde Mavi Dil ve Akabane virus sirkülasyonuna neden olan sokucu sinek cinsinin *Culicoides spp.* olduğu belirtilmiştir. Bölgede en çok *C. imicola*'ya ve *C. brevatarsis*'e rastlanılmıştır.

Akabane virusun aktif dönemi sokucu sineklerinde aktif olduğu döneme denk gelir. Ancak muhtemel etkileri bu aktif dönemin altı ay sonrasına kadar ortaya çıkabilmektedir. Özellikle hamileliğin erken dönemlerinde alınan virus altı ay sonra anomalili yavru doğumlarına neden olabilmektedir. Hatta sığırlarda bu süre dokuz aya kadar çıkmaktadır.

1.3. Patogenez ve Patoloji

Akabane virusunun replikasyonu önce fötal endotelial hücrelerde, sonra trofoblastik fötal hücrelerde ve en son fötusun kendisinde meydana gelmektedir. Birkaç günlük inkubasyon periyodu sonrası, 3-6 gün süren viremi şekillenir. Virusa karşı nötralizan antikorlar ancak enfeksiyondan 12 gün sonra kanda saptanmaya başlar. Sığırlarda gebelikte 150. gün koyun ve keçilerde ise 75. gün önemlidir. Bu günlerden itibaren immunokompetanz gelişimi hızlanmaya başlar. Bu günlerden küçük fötuslarda ise AKAV enfeksiyonu sonrası konjenital anomalilerin görülme insidensi yüksektir. Immunokompetenz geliştikten sonra konjenital anomali görülme oranı düşmeye başlar (Horikita ve ark 2005, Mellor ve Kirkland 2008).

Enfeksiyonda gebeliğin 3.-4. aylarına kadar hydranencephaly olguları, 4.-6. aylarına kadar da arthrogryposis şekillenir. İlk olarak beynin gri maddesinde non-

suppuratif encephalitis ve encephalomyelitis şekillenir. Bunu takiben hydranencephaly ve motorik sinir bölgelerinde demyelinizasyon dikkati çeker. Bundan sonraki dönemde ise arthrogryposis şekillenir bununla beraber servikal scoliosis, torticollitis, kyphosis şekillenebilmektedir. Abort, mumifiye olmuş fötüs, malformasyonlar, erken doğum, ölü doğumlar gebe hayvanların enfeksiyonu sonucu görülebilir (Mellor ve Kirkland 2008).

Nörotropik olması ve özellikle de konjenital anomali meydana getirmesine karşın Akabane virusunun nöropatogenez mekanizması ayrıntılı olarak araştırılmamıştır. Özellikle Akabane ve Schmallenberg viruslarında vertikal geçiş sonucu abortlar ve AH sendromlu yavruların doğması bu viruslarda daha çok ilgiyi bu patogenetik mekanizma çekmiştir. Ancak insanlarda nöroviral patolojiye neden olan orthobunyavirusların patogenezi araştırılmasına rağmen tam olarak mekanizması anlaşılamamıştır. Bunun nedeninin ise araştırmacılar tarafından konakçı farklılığı olmasından ileri gelebileceği öne sürülmüştür (Hollidge ve ark 2012). Buna karşın yine de nöropatogenez mekanizması için değerlendirilebilecek birçok veri elde edilmiştir.

Sokucu sinekler Bunyavirusların bulaşmasında önemli bir yere sahiptir. Özellikle *Culicoides* cinsi sinekler ile konakçı enfekte edilir. Sokucu sinekler konakçıdan kan emerken virusun konakçıya geçişi olur. Bu sırada sokucu sinek tarafından salınan salivaya virusun konakçıya geçişini kolaylaştırır. Araştırmacılara göre bu salivaya sayesinde virus konakçıya girerken erken interferon yanıtı inhibe edilmektedir (Maciel-de-Freitas ve ark 2006). Virus konakçıya girdikten sonra, replikasyon aşamasına geçer. Virusun sinir sisteminden önce ilk replike olduğu yer çizgili kaslardır. Daha az oranla da düz ve kalp kaslarında replike olur. Daha sonra virus lenfatik sisteme geçer ve buradan da kana karışır. Böyle viremi fazı da başlar. Viremi fazı virus tarafından sırasıyla kan – beyin bariyeri (KBB) geçilir ve merkezi sinir sistemi (MSS) istila edilir. MSS’de meydana gelen replikasyon ise yaş ile doğru orantılıdır. Konakçı yaşı ne kadar büyükse virus o kadar sinir sistemine affinite gösterir. Farelerde yapılan denemelerde periferik inokulasyon sonrası virusun 3-4 gün sonra KBB ne ulaştığı saptanmıştır. Fare beyninden yapılan immunohistokimyasal çalışmalar sonucu genç hayvanın beyninde daha az antijen saptanmışken, erişkin farelerde beyinde replikasyon güçlü olmuş ve 1 haftada öldürmüştür. Ancak virusun nöroinvasifliği büyük ruminantların gençlerinde yaşlı hayvanlara oranla daha yüksektir. Erişkin sığırlarda immun yanıt mekanizmaları yanısıra fiziksel engel olan KBB’nin gelişmiş olması virusun nöroinvasif özelliğini zayıflatır. KBB, prenatal dönemde

gebeliğin 50-60. günlerinde oluşmaya başlar ve 123. günde tamamlanmış olur. Gebeliğin özellikle 50. gününden önce maruz kalınan virus partikülü kolaylıkla MSS'ne ulaşarak patolojiler meydana getirir (Varela ve ark 2013).

Replikasyon aşamasında virus sinir hücresinin sitoplazmasında replike olur. O yüzden immunhistokimyasal boyamalarda genellikle dejeneratif nöronlar ve glial hücreler göze çarpar. Önce orthobunyaviruslar diğer zarlı viruslar gibi reseptör yardımıyla hücreye penetre olurlar. Orthobunyaviruslar hem memeli hem de insekt hücrelerine bağlanırken Gc (glikoprotein c) reseptör proteinini kullanırlar. Ayrıca insekt hücrelerine penetrasyon sırasında virus Gn (glikoprotein n) reseptör proteinini de kullanır. Bu reseptörelere virusun M segmenti tarafından kodlanır. Adsorbsiyon aşamasından sonra hemen endositoz aşamasına geçilir. Phlebovirus genusundaki viruslar clathrine² bağımsız şekilde endositozu tetiklese de, orthobunyavirus genusuna ait viruslar clathrine bağımlı endositoz ile hücre içine alınırlar (Lozach ve ark 2010). Penetrasyondan sonra virus endozoma ulaşır. Endozomdaki asidifikasyondan dolayı Gn ve Gc proteinleri konformasyonlarını değiştirir ve viral zarın endozomal membrana füzyonunu sağlar. Daha sonra virus tarafından RNP (ribonükleoprotein) konakçı hücreye bırakılır. Bu RNP ler viral segmentlerin önemli rol oynadığı transkripsiyon mekanizması ile çoğalır ve yeni projeni viruslar meydana gelir, ekzositoz ile hücreden atılır.

Virus beyinde replike olurken patolojik bulgular klinik görünümle kendini gösterebilir. Özellikle akabane virus omurilikte motor nöronlara affinite gösterir. Nörolojik iskelet kası atrofisine veya displaziye yol açar. Hayvanda lokomotor problemler ve inkoordinasyonlar kendini gösterir. En başta pons ve medulla oblongata çevresinde perivasküler infiltrasyonlar meydana gelir. Daha sonraki aşamada nöral nekroz, nörofaji ve multifokal gliosis rastlanır. Omuriliğin hem sağında hem de solunda ventral gri maddede şiddetli lenfositik perivasküler infiltrasyon, gliosis ve nöral nekroz ile nöral kayıp gözlenir. Beyaz maddede ise daha zayıf perivasküler infiltrasyona rastlanır ve dejeneratif şişkin aksonlar oluşur. Genel olarak omurilik gri maddesinde meydana gelen patolojik değişiklikler beyaz maddeye göre daha yoğundur (Lee ve ark 2002).

² Hücre dışı veziküllerin belirli bir şekilde kavuşması için rol oynayan temel proteinlerdir ve sitoplazmada küçük veziküller oluşmasını kolaylaştırır.

Bunyavirusların yapısal olmayan proteinleri sayesinde (NSs) hücre immün yanıtını bertaraf edebilme kabiliyeti vardır. Özellikle bu proteinler interferon inhibitörü (INF) olarak çalışırlar. Bunyavirus ile enfekte hücrelerde NS proteinler hücre içi aracı bir protein olan MED8 ile iletişime geçer. Bu protein hücredeki tüm transkripsiyon işlemlerinde görev alan RNA polimeraz II (RNAP II)'nin çalışmasında temel taşıdır. MED8 ve NS bağlandıktan sonra RNAP II inhibe edilir, böylece mRNA oluşumu da inhibe edilmiş olur. mRNA'nın inhibe edilmesiyle de interferon mekanizması zarar görür. Genelde bunyaviruslarda interferon bu şekilde inhibe edilir. Ancak istisnalar da söz konusudur. Mesela Akabane, Schmallerberg ve La Crosse viruslarını bünyesinde barındıran orthobunyaviruslar NS proteinlerini kullanarak direkt olarak RNAP II'yi inhibe ederler. Böylece mRNA oluşumu engellenir. Viral proteinlerin oluşumu, maturasyonu ve viral partiküllerinin serbest bırakılması Golgi cisimciğinin fragmentasyonuna ve hücre sekret yolağının bozulmasına neden olur. Bu işlem sırasında da hücre ölümü meydana gelir. Tabii bu durum memeli hücresi için geçerli iken, insekt hücresinde durum farklıdır. İnsekt hücresinde virusun persistens mekanizması devreye girer (Léonard ve ark 2006).

Veteriner hekimlik açısından bu genusta yeralan önemli hastalık etkenlerinin başında AKAV ve Schmallerberg virusu yer almaktadır. Bu viruslar Simbu serogrubu içinde yer alır ve benzer patogenez mekanizmalarına sahiptirler. Schmallerberg virusu 2011 Kasım ayında Almanya'da yeni ortaya çıkan bir virus olması (re-emerging) ve özellikle Avrupa'da ruminantlarda atıklara ve malformasyonlara neden olması artropod ile bulaşan en önemli hastalıklardan biri olmasını sağlamıştır. Varela ve ark. (2013)'nin Schmallerberg virusunun patogenez mekanizmasıyla ilgili yaptığı çalışmada hastalığın gelişimi hakkında bilgi verilirken, orthobunyavirusların patogenezi hakkında genel bir bilgi de sunulmuştur. Yapılan bu çalışmada Schmallerberg virusunun, doğal enfekte hayvanlarda, deneme hayvanında ve in vitro olarak da hücre kültüründe patogenetik mekanizması ve sinir sistemi üzerine moleküler etkisi araştırılmıştır. Doğal olarak konjenital yolla enfekte olmuş kuzular ve buzağılarda Akabane virusunun sergilemiş olduğu benzer malformasyonlar şekillenir. Klinik olarak en çok gözlemlenen patolojiler; brakignati inferior (alt çene kısalığı), tortikollis, omurga eğriliği, artrogripoz ve hidranensefalidir. Makro- ve mikropatolojik bulgular ise; porensel ile bağlantılı beyin genelinde lezyonlar, myelin dolu makrofaj kümeleri, lenfosit-makrofaj ve mikrogliaların çok şiddetli olmayan perivasküler infiltrasyonu ve daha yüksek oranda antijen artışına bağlı gri maddedeki lezyonların yoğunluğu sayılabilir. Ayrıca çalışmada SBV'un

patogenez mekanizmasında görev alan proteinlerin ifadeleri invivo ortamda izlenerek etki ve mutasyon durumu izlenmiştir. Özellikle daha önce Bunyaviruslar hakkında yapılmış çalışmalarda (Bridgen ve ark 2001; Ogawa ve ark 2007) da üzerinde durulan moleküler açıdan önemli ve patogenetik mekanizmada görev alan komponentler: S (Small), M (Medium), L (Large) Segmentleri, Gc ve Gn (Glikoprotein c ve n), yapısal olmayan proteinler (Nonstructural proteins; NS) SBV'nun patogenezinde ne kadar etkin oldukları bu çalışmada ele alınmıştır. SBV'nun NS proteinlerinin diğer orthobunyaviruslara nazaran daha yüksek oranda interferon mekanizmasını inhibe ettiği ortaya konmuştur. Diğer komponentler ise daha önceki çalışmalardakilere benzer bulgularla etki meydana getirdiği gözlenmiştir. NS proteinleri tüm orthobunyavirusların patogenezinde IFN- α ve - β 'yı hücrel mRNA sentezini engelleyerek inhibe eder. SBV NS proteinleri özellikle IFN- β 'yı transkripsiyon aşamasında inhibe ederek nöronal hücrelerde intrinsik savunmayı düşürür (Varela ve ark 2013).

1.4. Klinik Bulgular

Akabane virus enfeksiyonunda klinik semptomlar genellikle prenatal ya da yeni doğmuş hayvanlarda meydana gelir. Klinik semptomlar ve kongenital anomaliler sığır, koyun ve keçi de tespit edilmiştir. Bunun dışında bazı hayvan türlerinde (at, deve, buffalo, domuz, köpek) de antikor varlığı tespit edilmiştir (Huang ve ark 2003; Yang ve ark 2008; Mohammed ve ark 2013). AKAV'unun meydana getirmiş olduğu klinik semptomlar aşağıda belirtilmiştir.

- AH sendromu (Arthrogryposis-Hydranencephaly)
- Abort
- Premature Doğum
- Kör buzağı doğumları
- Mumifiye ve Ölü yavru doğumları
- Yenidoğanlarda inkoordinasyon
- Ekstremitelerde deformasyon ve anomali
- Emme azlığı ya da yokluğu
- Depresyon, davranışsal bozukluklar
- Tortikollis, skolyozis ve kifozis
- Kas atrofileri
- Egzoftalmus

Ayrıca Lee ve ark (2002) AKAV'nun neden olduğu klinik belirtili encephalomyelitis tablosunu ilk defa erişkin bir sığırdan saptamışlardır. Bu çalışmaya kadar erişkinlerde herhangi bir klinik semptom belirtilmemiştir.

1.5. Tanı

1.5.1. Klinik Tanı

AKAV ile enfekte bölgelerde klinik semptomlara ve epidemiyolojik gözlemlere göre şüpheli klinik tanı konabilir. Erişkinlerde subklinik seyreden bu enfeksiyonu klinik olarak tespit etmek zordur. Özellikle AH sendromlu yavruların doğuşu, gebelik döneminde meydana gelen birçok teratojenik etki ile yavru atımı, ölü yavru doğumu, mumifiye fötüs ve yenidoğanlarda ortaya çıkan körlük, uzuvlarda deformite AKAV'nu akla getirir. Ancak birçok arbovirus ve vertikal yolla bulaşan viruslar aynı etkileri gösterebileceğinden aşağıdaki hastalıklar yönünden ayırıcı teşhise gidilmelidir.

- Mavi dil
- Bovine Viral Diarrhoea
- Bovine Ephemeral Fever
- Bovine Herpes Virus tip 1 enfeksiyonları (Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), Infectious Pustuler Balanopostitis (IPB), Infectious Pustuler Vulvovaginitis (IPV))
- Rift Valley Fever
- Border Disease Peste des Petit Ruminants (PPR)
- Cache Valley Disease
- Bulaşıcı Pustuler Dermatit (Orf)
- Pasteurellosis
- Salmonellosis
- Chylamidia enfeksiyonu
- Bitki zehirlenmesi
- Trichomoniasis (Lee ve ark 2002)

1.5.2. Laboratuvar Tanısı

Akabane virus enfeksiyonunun laboratuvar tanısında en çok kullanılan testler AKAV'una karşı oluşan antikorların tespit edilmesini sağlayan seroloji temelli olan testlerdir. Ancak bunun yanında bazen histopatolojik inceleme, eğer elde edebilirse virus izolasyonu ve moleküler yöntemler kullanılabilir. AKAV, viremik duyarlı hayvanların plazma veya beyaz kan hücrelerinden, vektör havuzlarından ya da etkilenmiş fötal dokulardan elde edilebilir. Özellikle vektör havuzlarından bu virüsü elde edebilmek diğer hayvan materyallerine göre daha mümkündür. Çünkü bu virus ile enfekte olan Culicoidesler AKAV'unu bünyelerinde uzun süre barındırırlar. Elde edilen materyallerden çeşitli teknikler ile tanı konulması sağlanabilir:

1.5.2.1. Direkt enfeksiyon tanısı (Virolojik yöntemler)

Direkt virus izolasyonu;

Virus izolasyonu da tanı da önemlidir. Virus izolasyonu amacıyla birçok hücre kültürü kullanılabilir. Vero, BHK-21 ve HmLu-1 en sık kullanılanlarıdır. Son yıllarda arbovirusların üretilmesinde insekt kökenli hücre kültürleri de sıkça kullanılmaktadır. Virusun bu hücre kültürlerinde hızla üremesi ve hücrelerin dayanıklılığının çok olması ile virusun daha uzun süre replike olabilmesi bu hücrelerin avantajlarıdır. Ancak bu hücre kültürlerinde sitopatojenik etkiyi (CPE) görme imkanı bulunmaz. Bu hücre kültürlerine inokulasyon sonucu virus titresi oldukça artar. Daha sonra insekt hücrelerinde titresi arttırılan virus yukarıda belirtilen memeli hücrelerine ekilirse CPE görülebilir. AKAV ve arbovirusların genelde inokule edildiği insekt hücre kültürleri Culicoides kökenli C6/36 ve KC'dir (Madani ve ark 2012).

İmmunohistokimyasal teknikler;

Formalin ile fikse edilmiş fötal sığır ve koyuna ait doku örneklerinde peroksidaz ile yapılan boyamada antijen tespitiyle de laboratuvar tanısı mümkün olabilmektedir (Noda ve ark 2001).

Moleküler teknikler;

RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) virusa ait spesifik gen dizilimlerini saptamak için önemli bir tekniktir. Tanı için idealdir. Ancak Orthobunyaviruslar arasındaki tür ayrımında tekrarlanmalı veya daha ileri metotlar ile bu fark ortaya konarak tür farklılığı tescil edilmelidir.

Nested RT-PCR viral genomda spesifik bölgeleri tespit ederek tür ayrımı da yapabilmeyi sağlar. Günümüzde nötralizasyon ile birlikte en çok kullanılan AKAV tespit yöntemidir. Akashi ve ark (1999) nın geliştirmiş olduğu bu teknik ile Simbu serogrubu içindeki Akabane, Aino, Tinaroo ve Peaton viruslarının ayrımını sağlayabilir.

Taq-man problemleri ile yapılan multiplex real time RT-PCR ile Akabane ve Aino viruslarının ayrı ayrı tespiti hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılabilmektedir (Stram ve ark 2004).

2013 senesinde Qiao ve ark (2013) nın, alternatif bir yöntem olarak nitelendirdiği RT-LAMP (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay) tekniği ile hem virus hem de titre (virus/ml) tespiti yapılmıştır. İleri de bu tekniğin rutin olarak kullanılması söz konusudur.

1.5.2.2. İndirekt enfeksiyon tanısı (Serolojik yöntemler) Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

AKAV enfeksiyonunun tespitinde oluşan spesifik antikorların saptanması önemli bir yer tutmaktadır. Bu amaçla çeşitli Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) teknikleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Hemen hemen hepsi aynı şekilde tasarlanmıştır. Günümüze ticari olarak hem IgG hem de IgM'yi tanımaya yönelik AKAV ELISA kiti bulunmaktadır. Söz konusu olan ELISA pleyti 10^6 DKID₅₀/ml titrede antijen kullanılarak kaplanmıştır. Bu antijen HmLu-1 hücre hattında üretilmiş, titrasyon sonrası 0.05 M karbonat/bikarbonat tampon solüsyon ile pH 9,6'da sabitlenmiştir. Yıkama solüsyonu Tween 20 ve alkalın fosfataz içeren PBS'tir. Konjugat olarak Tavşan anti-sığır IgG ve Ig M konjugatları kullanılmıştır (Ungar-Waron ve ark 1989). Benzer bir ELISA da horseradish peroksidaz rabbit anti-bovine IgG konjugat kullanıldığı belirtilmiştir. Günümüzde AKAV tespiti için

kullanılan ticari kit bu şekilde oluşturulmuştur. Competitive (yarışmalı) olarak tasarlanan bu kit %98 spesifite gösterebilmektedir (Tsuda ve ark 2004).

AKAV'una karşı oluşan monospesifik antikorları tespit etmek amacıyla nötralizasyon testi ve immunofloresans testi de kullanılmaktadır (Blacksell ve ark 1997; Gard ve ark 1988).

1.6. İmmunoloji

AKAV ile doğal enfekte olan hayvanlarda hızlı bir şekilde nötralizan, hemaglutinasyonu inhibe edici antikorlar oluşur. Bu antikorlar sığırdan enfeksiyonu takiben 7.-14. günler arasında kanda tespit edilebilir titreye ulaşır (Parsonson ve ark 1981).

Doğal enfeksiyon geçiren sığırlarda enfeksiyon sonra oluşan nötralizan antikorların titresi iki yıl tespit edilebilir seviyede kalabilmektedir (Matumoto ve Inaba 1980, Inaba ve Matumoto 1990)

Endemik bölgelerde genç hayvanlar doğumdan sonra maternal antikorlarla korunurlar. Kongenital AH sendromlu danaların prekolostral serum numunelerinde akabane virusuna karşı nötralizan antikor bulunmaktadır. Bu antikorların gebelik sırasında immunokompetenz gelişmesini takiben ortaya çıktığı düşünülmektedir. Maternal antikorlar kaybolduktan sonrahayvanlar enfekte sinekler tarafından ısırılırsa, antikorlar tekrar gelişir. Dişi hayvanlar gebe kaldıklarında mevcut antikorlar virusun çoğalmasına ve plasentayı geçmesine engel olur (Matumoto ve Inaba 1980, Inaba ve Matumoto 1990).

Kolostrum ile alınan antikorlar kuzu ve oğlaklarda 4 ay, buzağılarda ise 6 aya kadar koruyuculuğa sahiptir (Matumoto ve Inaba, 1980).

1.7. Korunma ve Kontrol

AKAV'unun direkt temas ile bulaşması hakkında şu ana kadar herhangi bir bildirim yapılmamıştır. Bu konu hakkında çalışmalar halen sürmektedir. AKAV'un bulaşması genellikle Cullicoides cinsi sokucu sinekler tarafından meydana getirilmektedir. Bu duruma bağlı olarak hastalığın kontrolünde;

- Vektörlerin kontrolü
- Çiftlik Islahı,
- Viremik hayvanların vektörler için virus kaynağı olmasını önlemek amacıyla kesime sevk edilmesi,
- Hayvan hareketlerinin kısıtlanması ve sıkı kontrol altında tutulması,
- Aşılama önerilmektedir (Savini ve ark 2008)

1.7.1. Vektör Kontrolü

Akabane virusunun geleneksel kontrol unsurları içinde; vektörler için virus kaynağı olan hayvanların sürüden ayrılarak kesime sevk edilmesi, hayvan hareketlerinin kontrollü ve sınırlı şekilde yapılması ve vektörlerin aktif oldukları zamanlarda hayvanların ekstra korunmasının sağlanması sayılabilir.

Hastalığın yayılmasını kısıtlamada sokucu sinek kontrolü önemlidir. Hayvanların özellikle geceleri korumalı barınaklara alınması ile enfeksiyon riski azaltılabilir (OIE, 2008). Bunun yanında vektör istilasını önlemek için insektisitlerin kullanımı ön görülmektedir. Hayvanların üzerine bölgesel olarak veya barınakların çevresine insektisit uygulaması Culicoides türlerine karşı etkili olabilmektedir (Breard ve ark, 2004). Uzaklaştırıcı ilaçların veya yetişkin vektörlere ve larvalara karşı olan bütün ilaçların da etkin, ancak etkilerinin geçici olduğu görülmüştür.

1.7.1.1. Vektörlerin doğal yaşam ortamlarını değiştirmek

Bu yöntem Culicoides türlerinin üreme alanlarının fark edilmesi ve yok edilmesine dayanmaktadır. C. imicola genellikle çiftlik hayvanlarının olduğu yerlerde bulunur. Bu gibi bölgelerde insanlar tarafından küçük su birikintileri, hayvan gübresi ile karışık toprak ve bir yere bırakılmış evcil hayvan kanı ile C. imicola için ideal bir yaşam ortamı farkına varmadan hazırlanmış olabilir. Culicoideslerin üreme bölgelerindeki ıslak alanları drene etmek, muslukları kapatmak veya sızıntıları önlemek gibi yapılan bazı değişikliklerle farkına varılmadan oluşturulmuş az ve küçük olan bu üreme alanlarının tahrip edilmesi çok

kolay olmaktadır (Savani ve ark 2009). Ayrıca güneş batımından bir saat önce ve güneş doğumundan bir saat sonrasına kadar hayvanlar otlaklara çıkarılmamalıdır.

1.7.1.2. Yetişkin vektörlere karşı ilaçlama

Memeliler üzerinde düşük toksisitesi olan insektisitlerin barınak içinde ve etrafında ayrıca doğrudan hedef hayvanlara uygulanması ile hayvanların kendilerinin Culicoides türlerine karşı etkili olması, ilaçların bilinen kullanım yollarıdır. Bu kullanım şekilleri çevresel olarak da kabul edilebilir. Bu sistemin bir başka avantajı ise Culicoideslerin, üreme alanlarında biriktirilen hayvan dışkılarının içindeki insektisitlerin gıda katkı maddesi gibi bulunarak dışkı içerisinde olgunlaşma aşamalarındaki Culicoidesler için toksik etki yaratması ve vektörlerin yok edilmesini sağlamasıdır (Savani ve ark 2009).

Yukarıda bahsedilen “*Pyrethroid*” bazlı pour-on ve çevresel olarak kullanılan ilaçlar, yapılan uygulamalarda yetişkin vektör ilaçlaması sınıfında görev yapar. Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı (U.S. Environmental Protection Agency-EPA)’nın internet sayfasında kimyasal vektör ilaçlaması olarak yer alan “*Pyrethroid*” bazlı ilaçlar en güvenilir kimyasal ilaçlar çeşidi olarak anılmaktadır. EPA tarafından 2002’de yayımlanan “*Pyrethroid*” bazlı ilaçların güvenilirliği hakkındaki bildiriye yeraltı sularında karışmadığına, güneşte çabuk denature olduğuna ve omurgalılarda enzimsel aktive ile çabuk yapısının bozulduğuna değinilmiş ve insan sağlığı açısından minimum risk içerdiği belirtilmiştir. 2011 yılında EPA tarafından Kümülatif Risk Değerlendirmesi programına alınan “*Pyrethroid*” bileşikler, insan ve çevre sağlığı açısından kümülatif risk tanımlanmadığı rapor edilmiştir (EPA Cumulative Risk Assessment: Pyrethrins/Pyrethroids; EPA-HQ-OPP-2011-0746). Hatta Organofosfat grubunda yer alan “*Malathion*”un Pyrethroid bileşiklere göre on kat daha toksik olduğu vurgulanmıştır.

Özellikle çiftlik ortamlarının düzenlenmesinden sonra dönemsel olarak sokucu sineklerin yoğun olarak aktif olduğu bahar ve yaz aylarında hayvanlarda anti-insektisit ilaçlar kullanılmaktadır. Bu amaçla ticari ilaç firmaları insektlerin büyüklüklerine göre ve etkinliklerine göre ilaçlar üretmişlerdir. Bu ilaçlara daha sonraki bölümlerde ayrı başlık altında bahsedilecektir. Ancak tüm insektisitlere etki etmesi ve kolay uygulanabilirliğe sahip olması bakımından pour-on ilaçlar en çok kullanılanlarıdır. Ahırda ve merada hayvanların omurga kısmına uygulanan bu ilaçlar özellikle bahar ve yaz aylarında koruma

sağlar. Pour-on ilaçlarda en çok kullanılan bileşik “Pyrethroid”dir. Her ne kadar bu bileşik diğer müstahzarlara oranla daha az toksik olsa da bu ilaçtan kaynaklanan toksikasyonlar saptanmıştır (Bradbery ve ark 2005). Bu toksikasyonların meydana getirme riski söz konusu olmasına rağmen diğer ilaçlar ile karşılaştırıldığında, hayvanları insekt ve artropodlardan koruyan en az yan etkili bileşiktir (Ray ve Forshaw 2000).

Çizelge 1.1. Hayvanların omurgasına pour-on olarak uygulanan Pyrethroid veya pyrethtin bileşik içeren bazı ilaçlar.

<u>Ectotrine pour on</u> <u>(Sypermetrin&Vetoquinol)</u>	<u>Acadrex 60</u> <u>(Arkofly, fenvalerate&Novartis)</u>	<u>Bayofly pour on</u> <u>Cyfluthrine&Bayer</u>
<u>Koruyuculuğu 7 hafta boyunca</u>	<u>Koruyuculuğu 3 hafta boyunca</u>	<u>Koruyuculuğu 3 hafta boyunca</u>
<u>Sığır: 10 ml</u>	<u>100 ml ilaç+6 lt su= 30 olgun sığır</u>	<u>100 kg.’dan büyük sığırlar 10 ml ilaç</u>
<u>Ette ve sütte bekleme süresi 0</u>	<u>Ette ve sütte bekleme süresi 0</u>	<u>Ette ve sütte bekleme süresi 0</u>
<u>Versatrine pour on</u> <u>(Deltametrine&Schering-Plough)</u>	<u>Butox 7,5 pour on (intervet)</u>	<u>Butox 50 p. Mille</u> <u>(intervet)</u>
<u>Koruyuculuğu 4 hafta boyunca</u>	<u>Koruyuculuğu 8 hafta boyunca</u>	<u>Koruyuculuğu 6 hafta boyunca</u>
<u>Sığır: 10 ml</u> <u>Koyun.: 5 ml</u>	<u>10 ml/100 kg: max 30 ml hayvan başı</u>	<u>Pulverizasyon, banyo 50 ml/100 lt su</u>
<u>Ette ve sütte bekleme süresi 0</u>	<u>Ette ve sütte bekleme süresi 0</u>	<u>Ette ve sütte bekleme süresi 0</u>

Çizelge 1.2. Ahır ve çevresine uygulanabilen Pyretroid bileşik içeren bazı ilaçlar.

Socatrine 450 ml (Deltametrine&Schering-Plough)	600 metrekare alan
Stomoxine 250 gr (Permetrin&Schering-Plough)	1000 metrekare alan
Lurectron 400 gr (Granül) (Methomyl&Hektaş)	180 metrekare alan
Mouxine 25 gr Neodr	100 metrekare alan
Mefisto 11	0,61/100 metrekare alan

1.7.1.3. Larvaların İlaçlanması

“Abate” (American Cyanamid) (%5 temephos granulated with gypsum) gibi larvasitlerin, Culicoideslerin üreme alanlarında kullanılması, yavaş ama sürekli bir insektisit salınımını sağlamaktadır. Böylece ilacın etkisi 30 güne kadar sürebilmektedir (Savani ve ark 2009).

Larvaların ve yetişkin insektlerin ilaçlamasında kullanılan diğer ilaçlar aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Vektör kontrolünde kullanılan larvasit ve insektisitler

Larvasitler	İnsektisitler
Starycide SC 480	Aqua-K-Otrine
Oscar 100 EC	K-Obiol EC 25
Delphin 20 SC (Diflubenzuron 200 g/L)	K-Otrine EC 5'5
Entomos 500 EC	Solfac EC 050
Kultex 200 EC	Delta H EC

1.7.2. Kovucu/Uzaklaştırıcı İlaçlar

Di-ethyl toluamide (DEET), ticari olarak kullanılması uygun olan tek kovucu ilaçtır. Uzaklaştırıcı ilaçların, Culicoideslere karşı dört saat boyunca uzaklaştırıcı kovucu etkisi olduğu gösterilmiştir.

C. imicola genellikle gecenin ilk dört saatlik diliminde yoğun olarak beslenmektedir. Bu nedenle hedef hayvanlara DEET gece uygulanırsa etkisi daha belirgin olarak ortaya çıkmaktadır. Ancak bu ilaçların, hayvanların sinekler tarafından sokulma oranını düşürücü etkisi geçicidir (Savani ve ark 2009).

1.7.3. Aşılama

Duyarlı hayvanların aşılama, hastalığın kontrolünde etkili bir yoldur. Ancak aşının kullanımı ile yapılan çalışmalarda aynı serogrupta bulunan virüslere karşı bağışıklığın oluşmaması ve farklı bölgelerde randımanı düşük olması nedeniyle Japonya dışında kullanımı nerdeyse hiç yoktur (Hechinger ve ark 2013).

Akabane virüsün meydana getirdiği büyük epizootiler sadece Japonya ve Avustralya'da bildirilmiştir. Bu epizootiler düzensiz aralıklarla ortaya çıkmıştır. Bu epizootilerde aşılama sonucu fetal kaybın ciddi düşüşe uğradığı görülmüş, böylece Uzak Doğu'da yaygın olan bu hastalıkta aşı kullanılması söz konusu olmuştur.

Günümüzde sığır ve keçileri immunize etmek amaçlı inaktif bir aşı bulunmaktadır. İnaktif aşı hazırlanırken; ya formalin ya da β -propiolaktan ile inaktive edilir ve alüminyum fosfat jel adjuvant kullanılarak intramuskuler uygulanır. Bu aşı çiftleşme/tohumlamadan veya koç katımından önce uygulanmaya başlanır ve 4 hafta arayla 3 ml.lik 2 doz olarak uygulanır. Her yıl booster (arttırıcı) dozlarının yapılması önerilir. Gebe hayvanlarda bu aşının kullanılmasının güvenli olduğu bildirilmiştir. Bu aşı ile yapılan bir çalışmada; sahada ilk doz aşılama yapılan hayvanların %88'inde yüksek düzeyde nötralizan antikor oluşturduğu tespit edilmiştir. İkinci aşılama sonrası yapılan nötralizasyon testinde ise aşının koruculuğunun %100'e çıktığı bildirilmiştir (Kurogi ve ark 1978).

Japonya'da ticari olarak üretilmiş bir de AKAV canlı aşısı bulunmaktadır. Bu aşının uygulanması vektörlere bağlıdır. Hematojen insekt vektörlerin aktif hale geçtiği dönemden kısa bir süre önce subkutan olarak 1 ml dozda hayvana uygulanır. Aşılama sonrası yapılan taramalarda gebe sığırlarda intrauterin olarak veya yeni doğan buzağılarına yapılan subkutan, intramuskuler, intrasellüler aşılamalarda herhangi bir lökopeni, viremi veya ateş gözlemlenmediği bildirilmiştir (Kurogi ve ark 1978). Ayrıca aşılama sonrası iyi bir nötralizan antikor titresi elde edildiği de vurgulanmıştır.

Sığırlarda güvenilir şekilde kullanılan bu aşı, koyunlarda da deneysel olarak test edilmiştir. Denemeler sırasında, bazı koyunlarda viremi şekillenmiş ve bazı fetusların organlarında virus replikasyonu tespit edilmiştir. Her ne kadar bu olumsuzluklara karşın

föetal deformite meydana gelmese de, olası yan etkilerinden dolayı koyunlarda kullanılmasının uygun olmadığı bildirilmiştir (Parsonson ve ark 1977)

İnaktif Aino virus aşısı da ticari olarak Japonya'da kullanılmaktadır. Ayrıca Aino, Akabane ve Chuzan viruslarına karşı üretilen inaktif trivalan bir aşı da yine Japonya'da yaygın olarak kullanılmaktadır (Kim ve ark 2011).

Avrupa'da yaygın olan Akabane benzeri virus olan Schmallenberg virusu için de 2014 yılı içinde inaktif bir aşı ticari olarak üretilmiştir ve başta İngiltere olmak üzere bazı Avrupa ülkelerinde lisans verilmiştir.

1.8. Enfeksiyonun Türkiye ve Dünya'daki Durumu

Akabane, sığırların sokucu sineklerle bulaşan, özellikle gebe hayvanlarda kongenital anomalilere neden olan bunlara bağlı olarak ekonomik kayıplara yol açan viral bir hastalıktır. Akabane virusu, 1959 senesinde ilk olarak Japonya'da izole edildiği yerin adını almıştır. Özellikle Afrika, Avustralya, Japonya, Yeni Zelanda, Asya ve Orta Doğu'da oldukça yaygındır (Taylor ve Mellor 1994).

AKAV Enfeksiyonu, dünyanın birçok ülkesinde yaygın olarak görülmektedir. Enfeksiyon ilk defa 1955 senesinde Avustralya'da görülmüş, daha sonra 1959 senesinde Japonya'da ilk kez Akabane bölgesinde virus izole edilmiştir. Bu yüzden virusa izole edildiği yerin adı verilmiştir (Akabane virus). AKAV birçok Asya ve Orta doğu ülkesinde yaygın bir dağılım göstermektedir. Dünya'da da bu hastalık için epidemiyolojik çalışma önemli olup halen asıl teşhis metodu olarak görülmektedir. Sudan'da yapılan AKAV serosurveylans çalışmasında toplamda antikor varlığı %9,24 tespit edilmiştir (Elhassan ve ark 2014). Oem ve ark (2012)'nin Kore'de 2010 senesinde çıkan salgında alınan serum örneklerinden baktıkları nötralizasyon testinde ise %85 antikor pozitiflik saptanmıştır. Kuzeybatı Çin'de yapılan bir diğer çalışmada ise sığırlarda %20,3, koyunlarda ise %18,1 olarak saptanmıştır (Jun ve ark 2012). Bu bölgelerde daha önce yapılan serolojik bulgular dikkate alındığında, karşılaştırma sonucu farklı antikor pozitiflik oranları söz konusu olduğu anlaşılmaktadır. Bu bağlamda AKAV subtropik ve tropik bölgelerde değişken düzeylerde bulunabilmektedir.

AKAV enfeksiyonunun ülkemizin çeşitli yörelerinde de varlığı bilinmektedir. Urman ve ark (1980) ile Taylor ve Mellor (1994) tarafından enfeksiyonun Türkiye’de ilk olarak Aydın ve Muğla illerinde görüldüğü bildirilmiştir. Burgu ve ark (1995) Türkiye’nin güneydoğu ve güneybatısında yaptıkları arboviral enfeksiyonların seroepidemiolojik araştırmasında toplamda 1716 sığır ile 1341 koyun örneklenmiş; sığır kan serumlarında %12,3, koyun kan serumlarında ise %8,1 oranında AKAV seropozitiflik tespit edilmiştir. Karaoğlu ve ark (2007) tarafından Trakya Bölgesi’nde yapılan bir araştırmada AKAV seroprevalansı % 0,14 olarak belirlenmiştir. Albayrak ve Özen (2010) tarafından Karadeniz Bölgesi’nde yapılan diğer bir araştırmada ise enfeksiyonun seroprevalansı sığırlar arasında %22 olarak belirlenmiştir. Bu veriler haricinde, enfeksiyonun bölgemizdeki yaygınlığı konusundaki güncel bilgiler sınırlı kalmaktadır.

Bölgemiz açısından ise en yakın tarihli ve önemli çalışma ise Tan ve Bilge (2000)’nin yaptığı Güney Ege bölgesindeki keçi serumlarında AKAV’una yönelik serolojik araştırmadır. Bu çalışmada Aydın, Denizli, İzmir ve Muğla illerinden toplam 255 keçi kan serumu AKAV antikor varlığı bakımından incelenmiştir. Yapılan mikronötralizasyon sonucu Denizli’de %4 ve Aydın’da %1 oranında bir seropozitiflik elde edilmiştir. İzmir ve Muğla illerinde ise AKAV yönünden herhangi bir seropozitifliğe rastlanılmamıştır. Toplamda ise %1.9’luk bir seropozitiflik oranı söz konusu olmuştur.

Bu bilgiler kapsamında bölgemizde AKAV varlığı ve serolojik bakımdan güncel durumu bu tez çalışması ile araştırılmıştır. Çalışmada Muğla ve Aydın illerinden toplam 375 kan serumu alınarak AKAV antikor varlığı yönünden incelenmiştir. Özellikle çalışmada farklı türlerin kan serumlarının kullanılması ve develerde AKAV yönünden ilk defa serolojik incelemenin yapılması büyük önemlilik arz etmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Serum Örnekleri

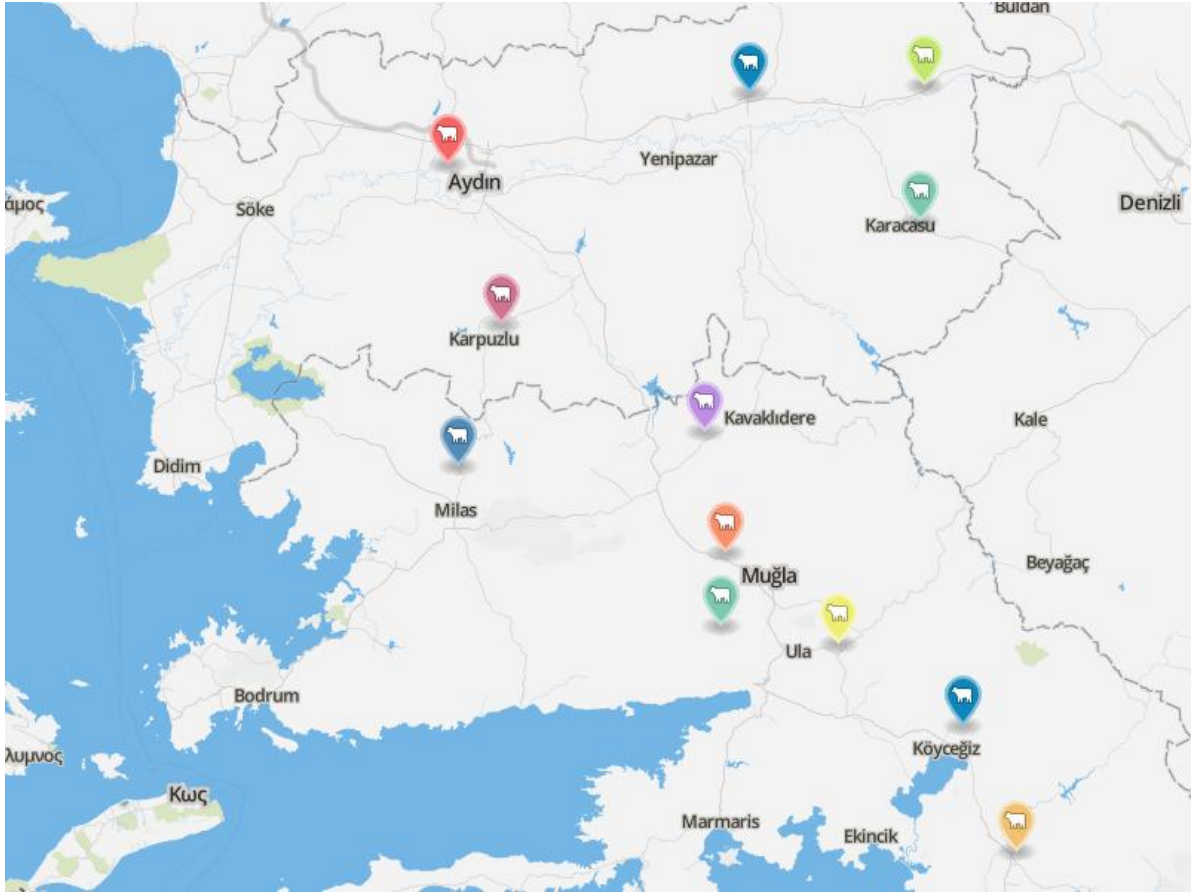
Akabane enfeksiyonunun araştırılması için Muğla ve Aydın illerinde yaşayan deve, sığır, koyun ve keçilerden kan örnekleri toplandı. Çalışmada, kesim için Aydın ili İncirliova ilçesi Belediye Mezbahası'na, tedavi için Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinikleri'ne getirilen ve yöre halkının elinde bulunan toplam 45 adet deveden kan örnekleri toplandı. Mezbahadaki ve Aydın yöresinde yetiştirilen develerin kan alınması esnasında klinik olarak sağlıklı oldukları gözlemlendi. Kliniğe getirilen hayvanlarda ise diş uzaması, topallık gibi cerrahi müdahale gerektirecek problemlerle karşılaşıldı.

Çalışma için kullanılan keçi, koyun, ve sığır kan örnekleri ise Aydın ve Muğla illerindeki küçük aile işletmelerinde, besi ve süt sığırcılığı işletmelerinde tesadüfi örnekleme yoluyla seçilmiş hayvanlardan elde edildi. Örneklenen hayvanların kan örneği alma işlemi sırasında klinik görünüşleri, anamnez, kulak numaraları, yaş, cinsiyet, sağlık durumları, anneleri hakkında bilgiler kayıt edildi. Örnekleme esnasında alınan anemnezlerde ve muayenelerde örneklenen hayvanlarda ve buldukları işletmelerde AKAV enfeksiyonuna ait hiçbir klinik bulguya rastlanmadı.

Örneklenen hayvanlardan kaolinli polistren tüplere 10'ar ml kan alındı. Örnekleme yapılan hayvan türleri ve sayıları çizelge 2.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. Örnekleme yapılan illerde hayvan sayıları

	Sığır	Koyun	Keçi	Deve
Muğla	100	31	33	-
Aydın	100	50	16	45
Toplam	200	81	49	45



Şekil 2.1. Örneklemenin yapıldığı lokasyonlar.

2.1.2. ELISA kiti

Çalışmada AKAV'una karşı oluşan antikorları tespit etmek amacıyla ticari competitive (yarışmalı) Enzyme Linked Immunosorbent Assay (eELISA) kullanıldı (**IDscreen® Akabane Competition Antibody Test; IDVET Diag Montpellier, France**). Bu test elde edilen serum örneklerindeki olası Akabane virusuna karşı oluşmuş anti-g1 antikorları tespit etmektedir. Bu test kiti elde edilen serumlardaki anti-AKAV antikorlarının varlığını tespit etmek amacıyla seçilmiştir. Bu testin geliştirilmesinde ise AKAV'ın glioprotein C (Gc) antijeninden faydalanılmıştır. Antijene karşı oluşacak Ig G antikorlarının fazlalığı testin temelini teşkil eder (Kittelberger ve ark (2013). Kittelberger ve ark (2013) yaptığı çalışmada Dünya'da en yaygın kullanılan iki AKAV eELISA kiti karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda yapılan diğer tetkiklerle en uyumlu sonucu veren tezde kullanılan **IDscreen®** ELISA kitidir.

ELISA pleytindeki mikro gözlerin iç yüzeyi purifiye virus partikülü (Glikoprotein C) ile kaplanmıştır. Test edilecek örnekler ve kit içinde bulunan kontroller bu gözlere konulur. Akabane antikor varlığı söz konusu olduğunda virus epitoplarına bağlanarak antijen antikor kompleksi oluşur.

Anti g1 Akabane HRP Mab gözlere eklenir. Spesifik antikor ile bağlanmayan akabane epitoplarına bağlanır ve antijen-HRP-Mab kompleksi oluşur.

Yıkama ile fazla konjugat ortamdan uzaklaştırılır ve daha sonra gözlere Substrat Solusyon (TMB) ilave edilir.

Final renklenmesi örneklerdeki antikor varlığının yoğunluğuna bağlıdır. Eğer serum örneği antikor içermiyorsa, mavi solüsyon stop solüsyon konmasını takiben sarıya döner. Antikor var ise, herhangi bir reklenme görülmemesi gerekmektedir.

Bu renklendirmelerin daha kesin değerlendirilmesi için mikropleyt spektrofotometrik olarak 450 nm dalga boyunda okutulur. Değerlendirmeye geçilir (bkz. 3.1. ELISA sonuç)

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Kan Serumu Örneklerinin Hazırlanması

Steril serum tüplerine alınan kan örnekleri +4°C'de 3000 devirde santrifüj edildikten sonra üste kalan serum kısmı stok tüplerine aktarıldı. Elde edilen serumlar test aşamasına kadar -20°C'de saklandı.

2.2.2. ELISA

İnaktive edilen serum örnekleri ELISA tekniği ile AKAV spesifik antikorları yönünden kontrol edildi. Bu amaçla ticari bir ELISA kiti olan **IDscreen® Akabane Competition Antibody Test (384 reactions) (IDVET Diag MONTPELLIER,**

FRANCE) kullanıldı. ELISA testi üretici firmanın kit içerisinde gönderdiği yönerge doğrultusunda uygulandı.

Test uygulanmasına geçilmeden önce üretici firma tarafından sağlanmayan malzemeler hazırlandı ve kit içerisinde konsantre olarak bulunan bazı solüsyonlar da yönergede belirtildiği şekilde kullanıma hazır hale getirildi.

- **Anti-akabane HRP konjugat (10x)**; Kit içerisinde sağlanan ve ayrıca serum sulandırmasında da kullanılan **“Dilution Buffer 19”** ile 10 kat sulandırıldı.
- **Wash Concentrate (20x)**; Yıkama solüsyonu ise otoklavlanmış distile su ile 20 kat sulandırıldı.

Testin Uygulanışı:

Testte kullanılacak tüm solüsyonların hazırlanıp oda sıcaklığına ulaşması beklenildi. Daha sonra vortex ile homojenize edildiler. Mikropleyttteki her göze **“Dilution Buffer 19”**dan multikanal pipet yardımıyla 25µl konuldu. Gözlerin içindeki buffer üzerine:

- 25 µl **“Positive Control”** (A1-B1 gözlerine);
- 25 µl **“Negative Control”** (C1-D1 gözlerine);
- 25 µl elde edilen serum örnekleri konuldu.

Örneklerin konması ile **“Dilution Buffer 19”** solüsyonundaki renk indikatörü sebebiyle mikropleyt gözlerindeki sıvılar mavi renge dönüştü. Mikropleytlar 37°C (± 3°C) derecede 90 dakika (± 5 dk.) boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon aşamasından sonra yıkama işlemine geçildi. Her göz 3 defa 300 µl **1x yıkama solüsyonu** ile yıkandı. Yıkamalar arasında gözlerin kurutulmamasına özen gösterildi. Yıkama sonrası 1/10 oranında dilue edilen **konjugattan** her göze 100 µl ilave edildi. Mikropleytlar 37°C (± 3°C) derecede 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon aşamasından sonra yıkama işlemine geçildi. Her göz 3 defa 300 µl **1x yıkama solüsyonu** ile yıkandı. Fazla olan konjugattan gözler arındırıldı.

Yıkamalar arasında gözlerin kurutulmamasına özen gösterildi. İkinci yıkama sonrası gözlere **100 µl Substrat Solusyonu (TMB)** konuldu. Mikropleytlar 21°C (± 5°C) derecede 15 dakika boyunca karanlıkta bırakıldı. Süre sonunda her göze 100 µl **Stop Solusyon** konuldu ve reaksiyon durduruldu. Optik dansitesini belirlemek amacıyla 450 nm dalga boyunda okutuldu. (Titertek microplate reader, Germany)

Testin değerlendirilmesi:

Üretici firmanın yönergesinde belirttiği prosedüre göre, testin geçerli olması için;

- **Negatif kontrolün O.D. değeri 0.6'dan daha büyük olmalıdır** ($OD_{NK} > 0.6$).
- **Pozitif kontrolün O.D. değeri Negatif Kontrolün O.D. değerinin yarısından daha düşük olmalıdır** ($OD_{PK}/OD_{NK} < 0.5$).

Değerlendirme, her serum örneğine ait O.D. değeri ile aşağıdaki formül hesaplanarak yapıldı.

$$S/N = \frac{OD_{SAMPLE}}{OD_{NK}} \times 100$$

Örneklerin elde edilen yüzdelik değerleri çizelge 3.1.'e göre; %30 dan küçükse pozitif, %30 ile %40 arasında ise şüpheli ve %40'ın üzerinde ise negatif olarak değerlendirildi.

Çizelge 2.2. ELISA Test değerlendirme çizelgesi

Sonuç	Değerlendirme
$S/N < \% 30$	Pozitif
$\% 30 \leq S/N < \% 40$	Şüpheli
$S/N \geq \% 40$	Negatif

3. BULGULAR

3.1. ELISA Sonuçları

ELISA için kullanılan pozitif ve negatif kontrollerin ekstiksiyon değerlerinin üretici firmanın ön gördüğü sınırlar içerisinde elde edildi. Testte kullanılan tüm negatif kontrollerin O.D. değerleri 0.6'dan büyük ($OD_{NK} > 0.6$), tüm pozitif kontrollerin O.D. değerleri ise negatif kontrollerin yarısından daha düşük bulunmuştur ($OD_{PK}/OD_{NK} < 0.5$). Bu sonuçlara göre ELISA ile elde edilen test sonuçları geçerli olarak değerlendirildi.

Test sonucu numunelerin konduğu tüm mikropleyt gözlerindeki O.D. değeri 0.6'dan daha yüksek bir değer vermiş ve yüzdeler hesaplamalara geçilmiştir (bkz. Çizelge 3.1.). Hesaplamalar sonucu örneklenen tüm kan serumlarının %40'tan daha yüksek bir değer verdiği saptanmıştır. Saptanan bu değer ile örnekleme yapılan bölgelerdeki hayvan türlerinin hiçbirinde AKAV'una karşı spesifik antikor tespit edilemediği görülmüştür. Tüm kan serumları AKAV antikor yönünden seronegatifdir. Aşağıda test edilen hayvan türleri, sayısı ve elde edilen ELISA sonuçları çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

,

Çizelge 3.1. Örnekleme yapılan hayvan sayısı ve ELISA Testi sonuçları.

		Örneklenen Hayvan Türleri							
		Sığır		Koyun		Keçi		Deve	
		n	Anti-AKAV Ab (%)	n	Anti-AKAV Ab (%)	n	Anti-AKAV Ab (%)	n	Anti-AKAV Ab (%)
AYDIN	Bozdoğan	10	0.0	3	0.0	4	0.0	15	0.0
	Buharkent	10	0.0	5	0.0	3	0.0	3	0.0
	İncirliova	20	0.0	7	0.0	-	0.0	18	0.0
	Merkez	20	0.0	10	0.0	-	0.0	9	0.0
	Karpuzlu	30	0.0	20	0.0	9	0.0	-	0.0
	Sultanhisar	10	0.0	5	0.0	-	0.0	-	0.0
MUĞLA	Kavaklıdere	8	0.0	9	0.0	8	0.0	-	0.0
	Köyceğiz	10	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0
	Merkez	35	0.0	6	0.0	16	0.0	-	0.0
	Milas	15	0.0	5	0.0	6	0.0	-	0.0
	Ortaca	10	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0
	Ula	10	0.0	7	0.0	3	0.0	-	0.0
	Yatağan	12	0.0	4	0.0	-	0.0	-	0.0
TOPLAM		200	0.0	81	0.0	49	0.0	45	0.0

n: test edilen hayvan sayısı

4. TARTIŞMA

Aydın yöresinin sokucu sinekler ile nakledilen Mavi Dil enfeksiyonunun 1946'da ilk görüldüğü yöre olması ve Akabane Virusu (AKAV)'nun 1980'de Türkiye'de ilk izole edildiği bölge olmasından ötürü Aydın ve Muğla illeri arboviruslar yönünden yüksek potansiyel göstermektedir. Bu enfeksiyonların zaman zaman bu bölgedeki hayvanlarda yavru ve verim kayıplarına yol açtığı yıllardan beri bilinmektedir (Urman ve ark 1980, Taylor ve Mellor 2004).

AKAV dünyada halen güncelliğini koruyan ve zaman zaman bazı bölgelerde salgınlar halinde görülebilen bir enfeksiyondur. Bu salgınların en çok görüldüğü bölgeler Avustralya, Asya ve Orta Doğu ülkeleri olup; buralarda yaygın bir dağılım göstermektedir. Bu hastalık için epidemiyolojik çalışma önemli olup, halen asıl teşhis metodu olarak görülmektedir.

Sudan'da yapılan AKAV serosurveilans çalışmasında toplamda antikor varlığı %9,24 tespit edilmiştir (Elhassan ve ark 2014). Oem ve ark (2012)'nin Kore'de 2010 senesinde çıkan salgında alınan serum örneklerinden baktıkları nötralizasyon testinde ise %85 antikor pozitiflik saptanmıştır. Kuzeybatı Çin'de yapılan bir diğer çalışmada ise sığırlarda %20,3, koyunlarda ise seropozitiflik oranı %18,1 olarak saptanmıştır (Jun ve ark 2012). Kore'de 2007 senesinde yapılan bir diğer çalışmada; ruminant arbovirusları yönünden seroepidemiolojik inceleme sonucu, örneklerin toplandığı tüm çiftliklerde AKAV'a karşı antikor saptandığı, ve genel seropozitiflik oranının %37,4 olduğu bildirilmiştir (Lim ve ark, 2007). Bu bölgelerde daha önce yapılan serolojik bulgular dikkate alındığında, karşılaştırma sonucu farklı antikor pozitiflik oranları söz konusu olduğu anlaşılmaktadır. Bu bağlamda AKAV subtropik ve tropik bölgelerde farklı zaman dilimlerinde değişken düzeylerde seropozitiflik oranına sahip olabilmektedir.

Aydın ve çevresi Mavi Dil, Epizootik Hemorajik Hastalık, Akabane ve Bovine Ephemeral Fever Virus enfeksiyonlarının taşıyıcısı olan sokucu sineklerin yaşamaları için uygun coğrafik yapıya ve iklim koşullarına sahiptir. Tarım Bakanlığı'na bağlı Araştırma Enstitülerinin raporları ve fakültemize gelen olgular, Ege Bölgesi'nin batısında geçtiğimiz

birkaç yıl ve 2010 yılı içerisinde sokucu sineklerle nakledilen, Epizootik Hemorajik Hastalık, Mavi Dil ve Akabane virus enfeksiyonlarına ve bu enfeksiyonlara bağlı olarak, ölümlere, önemli boyutlarda kongenital anomalili buzağı doğumlarına ve abortlara rastlandığını göstermektedir.

AKAV enfeksiyonunun, zaman zaman sözü edilen enfeksiyonlara benzer semptomlarla seyretmesi dolayısıyla ayırıcı tanısının yapılamaması, taşıyıcı sinekler için bölge ikliminin uygun olması virusun bölgemizde sirküle olduğunu ve bölgede önemli oranda yaygın olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu çalışmada AKAV'na karşı antikora yani enfeksiyona bölgede bulunan hayvan türlerinde rastlanmamıştır. Bu bağlamda özellikle AKAV'una karşı oluşan antikorların hayvanlarda iki yıl kadar kalabildiği göz önüne alınacak olursa virusun bölgede en az iki yıldır sirküle olmadığını işaret etmektedir. Fakat bu bulgular virusun ekonomik kayıplara yol açmayacağı anlamına gelmemektedir. Aydın ve Muğla yöreleri virusun taşınması ve bulaşmasında önemli rol oynayan ve biyolojik vektör olan *clucoides* türlerinin yaşaması için uygun coğrafik yapıya sahiptir ve bölgede bu tür sokucu sineklerin oldukça yaygın olduğu bilinmektedir. Bu nedenle Batı ege bölgesi virusun epizootiyolojik açıdan en fazla önem arzeden bölgedir. Geçmiş yıllarda ortaya çıkan anomali ve abort vakaları ve literatürler ışığında virusun zaman zaman bölgeye girdiği ve ekonomik kayıplara yol açtığı görülmektedir. Ancak çalışmada elde edilen bulgular virusun uzun süre bölgede sirküle olamadığını göstermektedir. Bu durum AKAV enfeksiyonu ile mücadelede olumlu bir bilgi kaynağı olabilir.

Güney Ege bölümü için elde edilen bu seronegatiflik yanında, Albayrak ve Özcan (2010)'nın Karadeniz bölgesinde yaptığı çalışmada sığırlar arasında tespit ettikleri %22'lik antikor pozitiflik, yine Karaoğlu ve ark (2007)'nin Trakya bölgesinde yaptığı seroprevalans çalışmasında %0,14 oranında bir antikor pozitiflik elde ettiği görülmektedir. Bu durum incelendiğinde AKAV'ın bölgesel ve dönemsel olarak çok farklı sirküle olduğu anlaşılmaktadır.

Tan ve Bilge (2000)'nin keçilerde yapmış olduğu aynı bölgedeki serolojik tarama ile karşılaştırıldığında, bu çalışmada elde edilen sonuçlarla çelişmediği açıkça görülmektedir. Tan ve Bilge (2000) Aydın'dan toplanan 90 kan serumundan sadece bir numunede seropozitiflik (%1,1) tespit etmiş, Muğla'dan toplanan 90 kan serumunda ise

AKAV yönünden herhangi bir seropozitifliğe (%0) rastlamamışlardır. Bu sonuçlar ve klinik görünüm ışığında değerlendirme yapıldığında bölgede belirsiz zaman aralıkları ile ortaya çıkan bu enfeksiyonun sığır ve koyunlarda daha yoğun görüldüğü anlaşılmaktadır. Bilhassa da sığırlarda meydana getirdiği abort ve anomaliler en önemli belirtileridir.

Bu çalışma Türkiye’de develerde yapılan ilk AKAV seroepidemiolojik çalışmadır. Bu çalışma dışında global anlamda dünya üzerinde develerde AKAV’na ait seroepidemiolojik çalışmalar ve bu konu hakkındaki diğer bilgiler oldukça sınırlıdır. Develer hakkında en son çalışma Mohammed ve ark (2013) tarafından arap yarımadasında yapılan serolojik çalışmadır. Araştırmacılar develerde % 7.7 oranında AKAV antikor varlığı tespit etmişlerdir.

Aydın ve Muğla yöreleri virusun taşınması ve bulaşmasında önemli rol oynayan ve biyolojik vektör olan *Cluoides* türlerinin yaşaması için uygun coğrafik yapıya sahiptir ve bölgede bu tür sokucu sineklerin oldukça yaygın olduğu bilinmektedir. Bu nedenle Batı Ege bölgesi virusun epizootiyolojik açıdan en fazla önem arzeden bölgedir. Geçmiş yıllarda ortaya çıkan anomali ve abort vakaları ve literatürler ışığında virusun zaman zaman bölgeye girdiği ve ekonomik kayıplara yol açtığı görülmektedir. Ancak çalışmada elde edilen bulgular virusun uzun süre bölgede sirküle olamadığını göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Akabane virusunun klinik ve virolojik tespiti günümüzdeki tekniklerle sınırlıdır. Bu yüzden çeşitli teşhis yöntemleri bir arada kullanılarak yapılan destekleyici veriler kesin tanıda en önemli unsurdur. Bu amaçla virus izolasyonu gibi direkt tanı sağlayan testlerin yanında, Akabane virusu için serolojik temelli nötralizasyon, plak redüksiyon testlerinin de uygulanması gerekmektedir. Simbu serogrubuna ait Orthobunyaviruslar için Nötralizasyon ve Plak redüksiyon testi Gold Standart test yöntemleridir. Fakat Simbu serogrubuna ait Orthobunyaviruslar serolojik testlerde cross reaksiyonlar vermesinden ötürü yine bu virusların tür olarak tespitinde moleküler karakterizasyon ve gen dizi analizi büyük önem taşır (Qiao ve ark 2013).

Virolojide tanının daha kesin ve hızlı konması amacıyla her geçen gün yeni teşhis metotları geliştirilmektedir. Bu geliştirilen yeni metotlar ile laboratuvar dışında saha şartlarında da daha kesin sonuçlar ortaya koyulabilmektedir. Özellikle birçok hastalık etkeni ile karıştırılan Akabane virusunu teşhis etmek için bu tip metotlar önemlidir. Örneğin saha şartlarında uygulanabilen PCR temelli bir test olan RT-LAMP (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay) günümüzde Akabane'nin hızlı teşhisinde oldukça önemlidir (Qiao ve ark 2013).

ELISA ile yapılan serolojik temelli bu çalışmamızda elde edilen seronegatiflik bölge için olumlu olarak değerlendirilebilir. Çalışmanın yapıldığı zaman dilimi içerisinde akabane enfeksiyonuna ait klinik vakalara, dolayısıyla virusa rastlanılmamıştır. Bu nedenle daha ayrıntılı olarak yapılacak çalışmalara (virus izolasyonu, izole edilebilen veya antijen olarak elde edilen virusun spesifik gen bölgelerini saptamak, elde edilen bu virusların gen dizi analizi ile moleküler karakterizasyonu) imkan bulunamamıştır.

Bulduğumuz zaman dilimi içerisinde yapılan serolojik çalışmalar sonucu AKAV'a karşı oluşan antikor varlığının bir düşüş içerisinde olduğunu göstermektedir. ELISA ile yapılan serolojik temelli bu çalışmamızda elde edilen seronegatiflik bölge için olumlu olarak değerlendirilebilir. Ancak geçmiş vakalara bakıldığında virusun bu bölgede belli bir süre sessiz kalıp tekrardan yüksek oranda abort ve kongenital anomalilerle ortaya çıktığı görülmektedir.

2010 senesinden bu yana bölgede klinik olarak tespit edilmiş vaka olmaması ve antikor oranındaki bu düşüş Akabane veya Akabane benzeri (Schmallenberg, Cache Valley disease) enfeksiyonların bulunduğu zaman dilimi içerisinde ortaya çıkma ihtimalinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Muğla ve Aydın bölgelerinde arbovirus vektörlerinin yoğun olduğu göz önünde tutulursa, bu kapsamda disiplinlerarası ortak çalışma ile bölgeden elde edilecek sineklerdeki virus tespiti, hangi sinek türlerinin AKAV'ünü taşıdığını tespit edilmesi, epizootiyolojik açıdan, özellikle ve enfeksiyon riskinin önceden belirlenmesi ve virusla mücadele açısından önemlidir.

Bölgede arthropodlara paralel olarak aynı bölgelerdeki hayvanlardan örnekleme yapılmalı ve her yıl bu sonuçlar güncellenerek olası enfeksiyon çıkışında en hızlı şekilde önlem alınıp, kayıplar azaltılmalı, hatta tamamen hastalık bertaraf edilmelidir. Bu bakımdan mücadele stratejileri belirlenmeli ve programlı bir korunmaya gidilmelidir.

Ayrıca bu bölgelerde virolojik olarak saptanan abovirallere karşı aşı oluşturma çalışmaları ivedilikle sağlanmalı, bu konu üzerine kamu kurumları, üniversiteler ve özel sektör girişimcileri ortak çalışmalıdır. Bu çalışma sonucu ortaya çıkan öneriler aşağıda belirtilmiştir.

AKAV'un serolojik araştırıldığı bu iki çalışma ile bu virusa karşı oluşmuş antikorların yoğunluğunun genel olarak bir düşüş gösterdiği görülmektedir. Bölgede sokucu sineklerin halihazırda varlığı, bu virusun ve diğer arbovirusların sirküle olduğunu akla getirmektedir. Bu yüzden antikorların negatife döndüğü popülasyonların yoğun olması ile bu hastalığın yeniden aktif döneme girmesi ileriki zaman dilimi için ihtimal dahilindedir.

Virusun segmentli bir RNA genomuna sahip olmasınedeniyle mutasyonlara açık olması enfeksiyonun virolojik ve serolojik olarak tespitini bir hayli güçleştirmektedir. Hatta sirküle olan vektör aracılı akabane ve akabane benzeri enfeksiyonların (mavi dil, bovine ephemeral fever, peste des petit ruminants vb.) sezonsal olmaları nedeni ile tanısında "gold standart" test olarak kullanılan nötralizasyon testi yıllar bazında çok farklı

sonuçlar verebilmektedir. Bu yüzden akabane enfeksiyonu hakkında yapılan çalışmalar her sene vektör hareketliliğinin arttığı dönemlerde yoğunlaşmak üzere rutin periyotlarla yapılmalıdır. Bu dönemlerde hem etkeninin direkt teşhisine hem de serolojik test ile indirekt teşhisine yönelik çalışmalar yapılmalıdır.

Virusun vektörlerdeki sirkülasyonu ve antijenik varlığı ayrıca incelenmelidir. Böylece akabane virusunun sokucu sineklerde nasıl bir yol izledikleri tespit edilebilir. Bu sayede virusun vektörden ruminantlara geçişini engellemek adına yeni stratejiler geliştirilebilir.

Akabane virusun simbu serogrubunda yer almasından ötürü bu grupta yer alan diğer virusların ayırt edilmesi gerekir. Henüz Türkiye’de 1980’den bu yana akabane virusu olarak tespit edilen virusların gen karakterizasyonu yapılamamıştır. Özellikle simbu serogruba yer alan orthobunyavirusların ruminantlarda hemen hemen aynı Şekilde sitopatolojik etki meydana getirmesi ve bu grup içerisinde birçok virus etkeni bulunmasından dolayı Türkiye’de izole edilen orthobunyavirus genusuna ait virusların moleküler karakterizasyonu yapılarak kesin etken bilgisi elde edilmelidir.

Bu virus grubunun segmentli oluşu ile mutasyonlara çok açık olması göz önünde bulundurulduğunda yapılacak olan moleküler sınıflandırma ile simbu serogruba ait başka bir virus ya da yeni bir alt suş tespiti söz konusu olabilecektir.

Tespitte ELISA, nötralizasyon gibi serolojik testlerin yanısıra, moleküler olarak viral genom varlığını saptayan etkene yönelik teşhis metotlarının daha sık kullanılması gerekir (Polymerase Chain Reaction-PCR, Real-Time PCR gibi). Ayrıca yukarıda da bahsedildiği üzere bu grup virusların mutasyona uğrama ihtimalinin yüksek olmasından dolayı yeni nesil sekanslama yöntemleri kullanılarak abortlara ve konjenital anomalilere neden olan virusların, yeni ortaya çıkan bir etken mi (emerging -rn. Schmollenberg virus) veya bu virus halihazırda sirküle olan ancak belli bir dönem sesiz kalmış bir etken mi (re-emerging-Akabane virus) olduğu ortaya konularak ayırt edilmelidir. Nomenklatür bu sonuçlara göre bahsi geçen bölgelerde tekrardan düzenlenmelidir.

Tedavi olanakları yetersiz olması ve prognozun, bireyin immun yanıtına bağılı olmasından ötürü akabane hastalığında korunma ve kontrol, hastalık ile mücadele de daha önemlidir. Türkiye 'de aşılması olmayan bu hastalığın, Dünya çapında da aşı müstahzarı çok limitlidir. Global olarak en çok bilinen akabane aşısı Japonya'da üretilmiş olan multivalan bir aşıdır (Nisseiken Bovine Abnormal Parturition Trivalent Inactivated Vaccine, Nisseiken Co Ltd, Japan). Ayrıca yine Japonya'da kullanılan canlı AKAV aşısı bulunmaktadır. Ancak bu aşuların etkinliklerinin düşük olması ve bölgesel anlamda farklı sonuçlar vermesinden dolayı yoğun olarak kullanılmamaktadırlar. Hechinger ve ark. (2013) yaptığı çalışmada da aynı serogrupta bulunan Schmallerberg virusuna karşı inaktif multivalan aşı kullanılmış ancak yapılan virus nötralizasyon testinde oluşan antikorların SBV'na etki etmediği tespit edilmiştir.

Akabane hastalığı ile mücadele de en önemli faktör vektörler ile mücadeledir. Sokucu sineklerinin yoğun olduğu bölgelerde kurulacak tuzaklar hem hastalığın yayılmasını hem de yakalanan sineklerin virus tespitini sağlayabilecektir.

Vahşi ruminantların bu hastalık bakımından araştırılması ile olası farklı konakçılara affinite gösterip yayılımında rol oynayıp oynamadığı saptanmalı ve çıkan sonuca göre kontrol yönetimi geliştirilmelidir.

Bu tip arboviral enfeksiyonların epidemi riski taşıması söz konusu olduğundan "Ulusal Kontrol ve Korunma Eylem Planı" geliştirilerek merkezi bir mücadele yürütülmesi daha etkin sonuçlara ulaşmasını sağlayacaktır.

ÖZET

Muğla ve Aydın İllerinde Akabane Virus (AKAV) Enfeksiyonunun Serolojik Olarak Araştırılması

Akabane virus (AKAV), *Bunyaviridae* familyasında *Orthobunyavirinae* genusunda yeralan ve kan emici sineklerle (öz. *Culicoides* türleri) bulaşan, sığırlarda, koyunlarda, keçilerde enfeksiyon sonucu abort, mumifiye fötüs, erken doğum, ölü doğum ve konjenital arthrogryposis (AG) ve hydranencephaly (HE) (AH sendromu) ile karakterize bir virustur.

AKAV varlığının bilinmesine karşın şimdiye kadar Muğla ve Aydın bölgelerinde coğrafik olarak geniş alanlarda yapılmış herhangi bir serolojik çalışma bulunmamaktadır.

AKAV'nun bu illerdeki son durumu hakkında bilgi sahibi olmak, enfeksiyonun yaygınlığının bilinmesi ve gelecekteki durumunun tahmin edilmesi açısından önemlidir.

Bu tez çalışmasında 200 sığırlar, 81 koyunda, 49 keçide ve 45 deve AKAV'a karşı oluşan antikorların varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla ticari Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (ID[®]screen Akabane Virus Competition Antibody ELISA Test Kit, IDVET Diagnostics, Montpellier, France) kullanılarak 2012/13 yıllarında Muğla ve Aydın illerinde sığır, koyun, keçilerden ve 2010 yılında develerden elde edilen kan serumları AKAV antikor varlığı yönünden test edilmiştir. Araştırma sonucunda test edilen toplam 375 kan serumunda AKAV'a karşı oluşmuş spesifik antikor varlığı tespit edilememiştir.

Bu sonuç bölge için olumlu bir durum olup, şimdilik AKAV enfeksiyonunun bölgede pasif olduğu değerlendirilmesi yapılabilir.

Araştırmada her ne kadar antikor varlığı tespit edilmemişse de, AKAV enfeksiyonunun tekrardan ortaya çıkma riski, bölge için hala söz konusudur. Özellikle bölgede kan emici sineklerin varlığı ve bunlardan nakledilen diğer viral hastalıkların bölgede varolması, korunma ve kontrol yöntemlerinin gerekliliğine bir kez daha dikkati çekmektedir.

Anahtar Sözcükler: Akabane virus (AKAV), ELISA, Muğla, Aydın

SUMMARY

The Serological Investigation of Akabane Virus (AKAV) Infection in Mugla and Aydin Provinces.

Akabane virus (AKAV), belongs to genus of *Orthobunyavirinae* in family of *Bunyaviridae*, causes abortions, premature births, stillborns and congenital abnormalities (arthrogryposis and hydranencephaly syndrome (AH)). Transmission of AKAV is occurred by hematogenous mosquitoes.

To our study, any serological studies have not been performed on widely areas in Mugla and Aydin provinces albeit presence of AKAV has been known. To have information about the current condition of AKAV in these provinces is important, in terms of considering of dissemination and presuming of condition of infection in the future.

In this dissertation study; the presence of AKAV antibodies was investigated among the 200 cattle, 45 camels, 81 sheep and 49 goats. For this purpose, the collected blood sera in 2012/2013 (excluding camel blood sera samples which had been collected in 2010) from mentioned animal species were tested by commercial Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit (ID[®]screen Akabane Virus Competition Antibody ELISA Test Kit, IDVET Diagnostics, Montpellier, France) to detect of the presence of AKAV antibodies in Mugla and Aydin provinces. No presence of AKAV specific antibodies were detected in tested 375 blood sera at the result of study.

This result is positive condition in terms of AKAV for Mugla and Aydin Provinces. The assessment of that AKAV has passive condition in these provinces may be considered at the present. Although the presence of AKAV antibody has not been detected, risk of reemerging of AKAV infection is still present. Especially, presences of hematogenous mosquitoes and other arboviruses (i.e. west Nile virus, bluetongue virus) in these provinces are pointed out the requirement of methods of protection and control, once more time.

Key Words: Akabane virus (AKAV), ELISA, , Mugla, Aydin

KAYNAKLAR

Akashi H, Onuma S, Nagano H, Ohta M, Fukutomi T. Detection and differentiation of Aino and Akabane Simbu serogroup bunyaviruses by nested polymerase chain reaction. *Archives of Virology* 1999; 144(11): 2101-2109.

Albayrak H, Özcan E. Seroprevalence of some arboviral infections transmitted by blood sucking insects in ruminants and equids in the middle Black Sea region in Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2010; 16(1): 33-36.

Blacksell SD, Lunt RA, White JR. Rapid identification of Australian bunyavirus isolates belonging to the Simbu serogroup using indirect ELISA formats. *Journal of virological methods* 1997; 66(1): 123-133.

Bradberry SM, Cage SA, Proudfoot AT, Vale JA. Poisoning due to pyrethroids. *Toxicological Reviews* 2005; 24(2), 93-106.

Breard E, Hamblin C, Hammoumi S, Sailleau C, Dauphin G, Zientara S. The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica. *Research in Veterinary Science* 2004; 77(1): 1-8.

Bridgen A, Weber F, Fazakerley JK, Elliott RM. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001; 98(2): 664-669.

Burgu İ, Urman HK, Akça Y, Yonguç AD, Mellor PS, Hamblin C, Hazıroğlu R, Alkan F, Akçora A, Özkul A, Eren H, Altın Saat S. Control of Akabane Disease and surveillance of bluetongue and Ephemeral Fever, terminal report 1995; AG:DP/TUR/86/017.

Dik B, Yavru S, Uslu U, Yapıcı O, Esin E. Determination of Culicoides species (Diptera: Ceratopogonidae) as suspect vectors of epizootic haemorrhagic disease and bluetongue viruses in southern and western Anatolia by RT-PCR. *Revue de Médecine Vétérinaire* 2012; 163: 505-510.

Elhassan AM, Mansour ME, Shamon AA, El Hussein AM. A serological survey of Akabane virus infection in cattle in Sudan. *ISRN Veterinary Science*, 2014; Article ID 123904: 4 pages.

Elliott RM, Blakqori G. Molecular biology of orthobunyaviruses. In: Plyusnin A, Elliott RM (Eds). *Bunyaviridae*. Norfolk: Caister Academic Press; 2011. p. 1-39.

Gard GP, Weir RP, Walsh SJ. Arboviruses recovered from sentinel cattle using several virus isolation methods. *Veterinary Microbiology* 1988; 18(2): 119-125.

George TD, Standfast HA, Cybinski DH. Isolations of Akabane virus from sentinel cattle and *Culicoides brevitarsis*. *Australian Veterinary Journal* 1978; 54(12): 558-561.

Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü. Ege bölgesinde görülen anomalili buzağı doğumları, <http://www.bornovavet.gov.tr/pdf/anomalilibuzagilar.pdf>, Erişim Tarihi:28 Mayıs 2014.

Hechinger S, Wernike K, Beer M. Evaluating the protective efficacy of a trivalent vaccine containing Akabane virus, Aino virus and Chuzan virus against Schmallerberg virus infection. *Veterinary Research* 2013; 44(1): 114.

Hollidge BS, Nedelsky NB, Salzano MV, Fraser JW, González-Scarano F, Soldan SS. Orthobunyavirus entry into neurons and other mammalian cells occurs via clathrin-mediated endocytosis and requires trafficking into early endosomes. *Journal of Virology*, 2012; 86(15): 7988-8001.

Horikita T, Yoshinaga S, Okatani AT, Yamane I, Honda E, Hayashidani H. Loss of milk yield due to Akabane disease in dairy cows. *The Journal of Veterinary Medical Science/The Japanese Society of Veterinary Science*, 2005; 67(3): 287-290.

Huang CC, Huang TS, Deng MC, Jong MH, Lin SY. Natural infections of pigs with akabane virus. *Veterinary Microbiology*, 2003; 94(1): 1-11.

Inaba Y Matumoto M. Akabane virus. In: Dinter Z, Morein B. (Eds). *Virus Infections of Ruminants*. Amsterdam, The Netherlands; 1990. p. 467-480.

Jun Q, Qingling M, Zaichao Z, Kuojun C, Jingsheng Z, Minxing M, Chuangfu C. A serological survey of Akabane virus infection in cattle and sheep in northwest China. *Tropical Animal Health and Production*, 2012; 44(8): 1817-1820.

Kaerber G. Diagnostic procedures for virus and rickettsial disease. *Public Health Association*, 1964, 3: 48-50.

Kalaycioglu H, Korukluoglu G, Ozkul A, Oncul O, Tosun S, Karabay O, Gozalan A, Uyar Y, Caglayik DY, Atasoylu G, Altas AB, Yolbakan S, Ozden TN, Bayrakdar F, Sezak N, Pelitli TS, Kurtcebe ZO, Aydın E, Ertek, M. Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011. *Euro Surveillance* 2012; 17(21): 20182.

Karaoğlu T, Özgünlük İ, Demir A, Özkul A, Burgu I. Seroprevalence of culicoides-borne disease in cattle in European Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2007; 54: 121-125.

Kim YH, Kweon CH, Tark DS, Lim SI, Yang DK, Hyun BH, Song JY, Hur W, Park SC. Development of inactivated trivalent vaccine for the teratogenic Aino, Akabane and Chuzan viruses. *Biologicals* 2011; 39(3): 152-157.

Kinney RM, Calisher CH. Antigenic relationships among Simbu serogroup (Bunyaviridae) viruses. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1981; 30(6): 1307-1318.

Kittelberger R, McFadden AM, Kirkland PD, Hannah MJ, Orr D, Bueno R, Swainsbury R, Keen D, Jenner J, French J, Pigott CJ. Evaluation of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for the detection of serum antibodies against Akabane virus in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2013; 25(5): 645-8.

Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, Sato K, Akashi H, Satoda K, Omori T. An attenuated strain of Akabane virus: a candidate for live virus vaccine. *National Institute of Animal Health Quarterly* 1978; 19(1-2): 12-22.

Kurogi H, Akiba K, Inaba Y, Matumoto M. Isolation of akabane virus from the biting midge *Culicoides oxystoma* in Japan. *Veterinary Microbiology*, 1987; 15(3): 243-248.

Lee JK, Par JS, Choi JH, Park BK, Lee BC, Hwang WS, Kim JH, Jean YH, Haritani M, Yoo HS, Kim DY. Encephalomyelitis associated with Akabane virus infection in adult cows. *Veterinary Pathology Online* 2002; 39(2): 269-273.

Léonard VH, Kohl A, Hart TJ, Elliott RM. Interaction of Bunyamwera Orthobunyavirus NSs protein with mediator protein MED8: a mechanism for inhibiting the interferon response. *Journal of Virology* 2006; 80(19): 9667-9675.

Lim SI, Kweon CH, Tark DS, Kim SH, Yang DK. Sero-survey on Aino, Akabane, Chuzan, bovine ephemeral fever and Japanese encephalitis virus of cattle and swine in Korea. *Journal of Veterinary Science*. 2007; 8(1), 45-49.

Lozach PY, Mancini R, Bitto D, Meier R, Oestereich L, Överby AK, Peterson RF, Helenius A. Entry of bunyaviruses into mammalian cells. *Cell Host & Microbe* 2010; 7(6): 488-499.

Maciel-de-Freitas R, Neto RB, Gonçalves J M, Codeço CT, Lourenço-de-Oliveira, R. Movement of dengue vectors between the human modified environment and an urban forest in Rio de Janeiro. *Journal of medical entomology*. 2012; 43(6), 1112-1120.

Madani TA, Kao M, Azhar EI, Abuelzein ETM, Al-Bar H, Abu-Araki H, Ksiazek TG. Successful propagation of *Alkhumra* (misnamed as Alkhurma) virus in C6/36 mosquito cells. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2012; 106(3): 180-185.

Matumoto M Inaba Y. Akabane disease and Akabane virus. *Kitasato Archives of Experimental Medicine* 1980; 53(1/2): 1-21.

Mellor PS, Boorman J, Baylis, M. Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology* 2000; 45(1): 307-340.

Mellor PS, Kirkland PD. Akabane Virus. In: Mahy BWJ, van Regenmortel MHV (Eds). *The Encyclopedia of Virology*. Amsterdam: Academic Press; 2008. p. 76-80.

Metselaar D, Robin Y. Akabane virus isolated in Kenya. *Veterinary Record* 1976; 99(5): 86-86.

Mohammed OB, Alagaili AN, Mohamed AS, Omer SA, Elamin MH, Elzein, EMA. Serosurveillance for some diseases in livestock living within protected areas designated for wildlife reintroduction in Saudi Arabia. *African Journal of Microbiology Research* 2013; 7(16): 1574-1578.

Mrakusfeld O, Mayer E. An arthrogryposis and hydranencephaly syndrom in calves in Israel, 1969/1970. *Epidemiological and Clinical Aspects. Refu Vet* 1971; 28: 51-61.

Noda Y, Yokoyama H, Katsuki T, Kurashige S, Uchinuno Y, Narita, M. Demonstration of Akabane virus antigen using immunohistochemistry in naturally infected newborn calves. *Veterinary Pathology Online* 2001; 38(2): 216-218.

Oem JK, Lee KH, Kim HR, Bae YC, Chung JY, Lee OS, Roh IS. Bovine epizootic encephalomyelitis caused by Akabane virus infection in Korea. *Journal of Comparative Pathology* 2012; 147(2). 101-105.

Ogawa Y, Kato K, Tohya Y, Akashi H. Sequence determination and functional analysis of the Akabane virus (family Bunyaviridae) L RNA segment. *Archives of Virology*, 2007; 152(5): 971-979.

Özgünlük İ, Yıldırım Y, Gür S, Tan MT. Aydın Yöresindeki Sığırlarda Akabane Virus (AKAV) ve İbaraki Virus (IBAV) Enfeksiyonlarının Seroprevalansı. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2013; 2(1): 36-41.

Parsonson IM, Della-Porta AJ, Snowdon, WA. Congenital abnormalities in newborn lambs after infection of pregnant sheep with Akabane virus. *Infection and Immunity* 1977; 15(1): 254-262.

Parsonson IM, Della-Porta AJ, O'Halloran ML, Snowdon WA, Fahey KJ, Standfast HA. Akabane virus infection in the pregnant ewe. 1. Growth of virus in the foetus and the development of the foetal immune response. *Veterinary Microbiology* 1981; 6(3): 197-207.

Qiao J, Wang J, Meng Q, Wang G, Liu Y, He Z, Yang H, Zhang Z, Cai X, Chen, C. Rapid detection of Akabane virus by a novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay (RT-LAMP). *Virology Journal* 2013; 10(1): 288.

Ray DE, Ray D, Forshaw PJ. Pyrethroid insecticides: poisoning syndromes, synergies, and therapy. *Clinical Toxicology* 2000; 38(2), 95-101.

Savani G, Hamers C, Conte A, Migliaccia P, Bonfini B, Teodori L, Di Ventura M, Hudelet P, Schumacher C, Caporale V. Assessment of efficiency of bivalent BTV-2 and BTV-4 inactivated vaccine by vaccination and challenge in cattle. *Veterinary Microbiology* 2009; 133: 1-8

Savini, G, MacLachlan NJ, Sanchez-Vizcaino JM, Zientara S. Vaccines against bluetongue in Europe. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2008; 31(2): 101-120.

Stram Y, Kuznetzova L, Guini M, Rogel A, Meirum R, Chai D, Yadin H, Brenner J. Detection and quantitation of Akabane and Aino viruses by multiplex real-time reverse-transcriptase PCR. *Journal of Virological Methods* 2004; 116(2): 147-154.

Tan MT, Bilge S. Serological investigation of Akabane infection in goat with congenital abnormalities in Turkey. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 2000; 31(2), 65-66.

Taylor WP, Mellor PS. The distribution of Akabane virus in the Middle East. *Epidemiology and Infection* 1994; 113(01): 175-185.

Tsuda T, Yoshida K, Yanase T, Ohashi S, Yamakawa, M. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the antibodies specific to akabane virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2004; 16(6): 571-576.

Ungar-Waron H, Gluckman A, Trainin ZE. ELISA test for the serodiagnosis of Akabane virus infection in cattle. *Tropical animal health and production* 1989; 21(3): 205-210.

United States Environmental Protection Agency Cumulative Risk Assessment: Pyrethroids/Pyrethrins (2011), <http://www2.epa.gov/mosquitocontrol/permethrin-resmethrin-d-phenothrin-sumithrin-synthetic-pyrethroids-mosquito-control>. Erişim Tarihi: 22 Eylül 2014.

Urman HK, Berkin S, Yuce H, Milli U, Mert N, Kahraman MM, Avvuran H. Türkiye'de buzağlarda konjenital epizootik arthrogryposis ve hydranencephalie olayları. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi 1980; 26: 287-292.

Varela M, Schnettler E, Caporale M, Murgia C, Barry G, McFarlane M, McGregor E, Piras IM, Shaw A, Lamm C, Janowicz A, Beer M, Glass M, Herder V, Hahn K, Baumgärtner W, Kohl A, Palmarini M. Schmallenberg virus pathogenesis, tropism and interaction with the innate immune system of the host. PLoS Pathogens. 2013; 9(1): e1003133.

Vellema P. Bluetongue in sheep: Question marks on bluetongue virus serotype 8 in Europe. Small Ruminant Research, 2008; 76(1): 141-148.

Yang DK, Kim BH, Kweon CH, Nah JJ, Kim HJ, Lee KW, Yang YJ, Mun KW. Serosurveillance for Japanese encephalitis, Akabane, and Aino viruses for Thoroughbred horses in Korea. Journal of Veterinary Science, 2008; 9(4): 381-385.

EKLER



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(ADÜ-HADYEK)



Aydın, 29 Temmuz 2011

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2011 Yılı V. Oturumu
Sayı : B.30.2.ADÜ.0.00.00.00/050.04/2011/045
Proje Başlığı : Muğla ve Aydın illerinde akabane virus enfeksiyonunun serolojik olarak araştırılması
Proje Yürütücüsü : Nural EROL
Proje Ekibi : B. Taylan KOÇ

Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:

İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması
İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması

Hayvan Çalışması İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.

Doç. Dr. Muharrem BALKAYA

(Başkan)

İzinli

İzinli

Doç. Dr. İbrahim CEMAL

Prof. Dr. Mustafa BİRİNCİOĞLU

Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI

(Üye)

(Üye)

(Üye)

Vet. Hek. Uluk SAYIN

Dr. Nurten ATALAY

Yrd. Doç. Dr. Cengiz ÜNSAL

(Üye)

(Üye)

(Üye)

Şevket AKYOL

(Raportör)

Bu rapor sadece Adnan Menderes Üniversitesi birimlerinde yapılacak deneyler için geçerlidir.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Ankara'da doğdum. İlk, Orta ve Lise öğrenimimi Muğla'da tamamladım. 2007 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden mezun oldum. 2009 yılında Adnan Menderes Üniversitesi (ADÜ) Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandım. 2012 yılında YÖK Kanununun 35. Maddesine istinaden ADÜ Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'ndan Ankara Üniversitesi (AÜ) Veteriner Fakültesi'ne Doktora yapmak amacı ile kadro naklim gerçekleşti. Halen AÜ Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'da doktora eğitimime devam etmekteyim.

Evli ve bir çocuk babasıyım.

TEŞEKKÜR

Tüm sevgileri ve sabırları ile bana destek veren Eşim Zerrin KOÇ, Oğlum Ege KOÇ başta olmak üzere, danışmanım Yrd. Doç. Dr. Nural EROL'a, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. M. Tolga TAN'a, Prof. Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU'na, örneklemeler konusunda Veteriner Hekim Çayan HEYBELİ'ye, hem materyal hem de mesleki açıdan çalışmama sonsuz destek veren Babam Veteriner Hekim Hacı KOÇ'a, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Annem Gönül KOÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Veteriner Hekim Zafer Emin URAL ve Veteriner Hekim V. Özgür ÇAĞLAV başta olmak üzere tüm Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencilerine ve Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına öğrenimim boyunca göstermiş oldukları dostça yaklaşım ve sağladıkları kolaylıklar için teşekkür ederim.