TRAKYA BÖLGESİ'NDE SİVRİSİNEK FLAVİVİRÜSLERİNİN TESPİTİ VE KISMİ GENOMİK KARAKTERİZASYONU

IDENTIFICATION AND PARTIAL GENOMIC CHARACTERIZATION OF MOSQUITO FLAVIVIRUSES IN THRACE REGION

CEREN ÖNCÜ

PROF. DR. SALİH BÜLENT ALTEN

Tez Danışmanı

DOÇ.DR. KORAY ERGÜNAY

İkinci Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

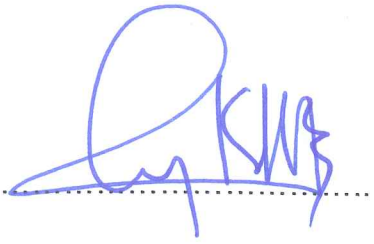
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2017

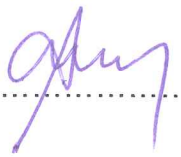
Ceren Öncü'nün hazırladığı "**Trakya Bölgesi'nde Sivrisinek Flavivirüslerinin Tespiti Ve Kısmi Genomik Karakterizasyonu**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİZANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL
Başkan ..... 

Prof. Dr. S. Bülent ALTEN
Üye (Danışman) .....

Prof. Dr. Hatice MERGEN
Üye .....

Yrd. Doç. Dr. Banu Ş. ÖNDER
Üye .....

Yrd. Doç. Dr. M. Mustafa AKINER
Üye ..... 

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

☐ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**
(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

☒ **Tezimin 21.06.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**
(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım taktirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

☐ **Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

☐ **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

21 / 6 / 2017

Ceren ÖNCÜ

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

21/06/17

CEREN ÖNCÜ

ÖZET

TRAKYA BÖLGESİ'NDE SİVRİSİNEK FLAVİVİRÜSLERİNİN TESPİTİ VE KISMİ GENOMİK KARAKTERİZASYONU

CEREN ÖNCÜ
Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü
Tez danışmanı: Prof. Dr. S. Bülent Alten
İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Koray Ergünay
Haziran 2017, xiii + 53 sayfa

Flaviviridae ailesi *Flavivirüs* cinsi, sivrisineklerle bulaşma gösteren, aralarında Batı Nil, Deng, Zika virüs gibi, tüm dünyada önemli sağlık sorunu oluşturmuş virüsleri içermektedir. Bazı flavivirüsler, sivrisinekleri enfekte etmekte ve yaşam döngülerini çeşitli tür sivrisineklerde tamamlamaktadır. Belirli bir bölgede vektör kaynaklı ya da patojen olmayan virüs aktivitesinin bilinmesi, hastalık riskinin değerlendirilebilmesi ve epidemiyolojik özelliklerin incelenebilmesi için, eklembacaklıların sürveyansı önem taşımaktadır. Bu çalışmada, önceden Batı Nil virüsü olguları ve maruziyetinin saptandığı, ayrıca çeşitli sivrisinek flavivirüslerinin ilk kez rapor edildiği Trakya bölgesinden toplanan örneklerde jenerik PZR yöntemiyle flavivirüsler araştırılmış, saptanan virüsler DNA dizi analizi ile tanımlanmış ve bulgular tartışılmıştır. Çalışma kapsamında 2016 yılı Ağustos-Eylül aylarında 3 ilde 38 lokalitede standart yöntemlerle örnekleme sonucu, 1461 sivrisinek örneği toplanmıştır. Morfolojik incelemeler, örnekler arasında en sık saptanan türün *Culex pipiens s.l.* (%54,4) olduğunu göstermiş, bunu *Anopheles maculipennis s.l.* (%25,6), *Aedes albopictus* (%6,1), *Aedes caspius* (%5,7) ve diğerleri takip

etmiştir. Toplanan örnekler; bölge, cinsiyet ve türe göre toplam 104 havuz olarak virüs taramasına alınmış, % 5.7'sinde (6/104) pozitiflik saptanmıştır. Edirne ili çevresi kaynaklı *An. maculipennis* s.l. örnekleri içeren bir havuzda Anofeles flavivirüsü varyantı 1 ile en yüksek homoloji gösteren bir dizi karakterize edilmiş, nükleotid ve amino asit karşılaştırmaları, saptanan virüsün yeni bir flavivirüs olarak tanımlanabileceğini ortaya koymuştur. *Ur. unguiculata, Ae. caspius ve Cx. pipiens* s.l. örnekleri içeren toplam beş havuzda ise, Edirne çevresinde *Ur. unguiculata* türlerinde daha önceden tespit edilen, ancak kesin olarak tanımlanamamış bir flavivirüse yakınlık gösteren diziler tanımlanmıştır. Dişi ve erkek *Ur. unguiculata* örnekleri içeren iki havuzda da aynı virüse ait DNA formları saptanmıştır. Bu formlardan parçalı ve kısmi okumalar elde edilebilmiş, ancak dizilerin iyi korunmuş olduğu ve kodlama yapabilecek özellikte olduğu izlenmiştir. Böylece doğadan toplanmış sivrisinek örneklerinde aynı flavivirüse ait RNA ve DNA formlarının ilk kez gösterilmiştir, doğal enfeksiyonlar sırasında bu formların oluşabildiği ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Batı Nil Virüsü, flavivirüs, Sivrisinek, Trakya, DNA

ABSTRACT

IDENTIFICATION AND PARTIAL GENOMIC CHARACTERIZATION OF MOSQUITO FLAVIVIRUSES IN THRACE REGION

CEREN ÖNCÜ

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. S. Bülent Alten

Co-advisor: Doç. Dr. Koray Ergünay

June 2017, xiii + 53 pages

Flavivirus genus of the family Flaviviridae includes mosquito-borne viruses with significant global health impact, such as West Nile, Dengue and Zika viruses. Moreover, certain flaviviruses only infect various mosquito species and complete their replication cycle without the involvement of vertebrate hosts. Arthropod surveillance provides information on regional vector-borne or non-pathogenic virus circulation, for understanding virus epidemiology and risk assessment. In this study, we carried out flavivirus screening in mosquitoes via generic PCR, in eastern Thrace region with previously documented West Nile and mosquito flavivirus activity. The detected strains were characterized via sequencing. A total of 1461 mosquitoes were collected from 38 localities in 3 provinces, during August-September, 2016. Morphological identification revealed *Culex pipiens s.l.* (54,4%) to be the most abundant species, followed by *Anopheles maculipennis s.l.* (25,6%), *Aedes albopictus* (6,1%), *Aedes caspius* (5,7%) and others. The individuals were pooled in a total of 104 specimens, according to

species, sex and collection sites. Flavivirus screening provided positive results in 5.7% of the pools (6/104). A sequence with the highest nucleotide homology to the *Anopheles* flavivirus variant 1 was characterized in a pools with *An. maculipennis* mosquitoes, collected around Edirne province. Comparison of nucleotide and putative amino acid sequences revealed the strain as a candidate for a novel flavivirus. In five pools comprising *Ur. unguiculata, Ae. caspius ve Cx. pipiens* s.l. mosquitoes, another novel sequence, characterized previously in *Ur. unguiculata* species around Edirne province, was detected. In two *Ur. unguiculata* pools comprising male and female individuals, DNA forms of the particular flavivirus was identified. Although sequencing reads from these specimens were partial and fragmented, they were well-conserved and retained protein coding capacity. This is the first detection of RNA and DNA forms of a particular mosquito flavivirus in field-collected specimens, confirming the occurence of these forms during infections in nature.

Keywords: West Nile virus, flavivirus, mosquito, Thrace, DNA

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimimin her aşamasında tecrübeleriyle akademik anlamda ilerlememe destek ve yardım eden, hem ulus ve hem de uluslararası platformlarda imkan sağlayan sevgili tez danışmanım Prof. Dr. Bülent Alten'e, tez konusunun belirlenmesi başta olmak üzere, yapılan analizler sırasında bütün bilgi ve deneyimlerini aktaran, yaptığım çalışmalar boyunca da laboratuvarının tüm imkanlarını sağladığı ve destekleri için sevgili eş danışmanım Doç. Dr. Koray Ergünay'a, geçirdiğim tüm akademik süreç boyunca her zaman bana destek veren, yaptığımız bilimsel çalışmalarla ilgili her şeyi öğreten, bütün bilgi ve deneyimlerini paylaşan tez yazımı boyunca da manevi desteğini esirgemeyen Dr. Filiz Günay'a, yüksek lisans dönemim boyunca manevi desteklerinden dolayı sevgili Dr. Özge Erişöz Kasap'a, tezde kullanılan örneklerin bir kısmını araziler yaparak toplayan ve örnekleri bağışlayan Doç. Dr. Sırrı Kar'a, çalışmada oluşturulan haritaların yapımında yardımcı olan David Pecor'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımın keyifli ve verimli olması açısından her zaman yanımda olan ve bu tezin yazım aşamasında desteklerini esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşlarım başta Yasemen Sarıkaya, Gizem Oğuz ve Ayda Yılmaz olmak üzere tüm Ekolojik Bilimler Araştırma Laboratuvarı ekibine, yardımları için özel çalışma öğrencisi Kıvanç Sevim'e, tez laboratuvar çalışmalarım boyunca yardım eden teknisyen İrfan Atmaca'ya, arazi çalışmalarında yardımcı olan Mine Altınlı'ya, çalışmamın her aşamasına dostluklarıyla bana katkıda bulunan İzgi Biçer, Esma Korkut, Gamze Şahin, İpek Düzağaç'a, yüksek lisans hayatım boyunca manevi desteğini esirgemeyen Ekin Tünay, Gözde Balcı, Çağrı Çankaya ve tüm üniversite arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi tüm destekleri aynı zamanda sevgileri ile yanımda olan, benim için yaptıkları fedakarlıklar ve beni desteklemekten hiç vazgeçmedikleri için sevgili annem Zehra Öncü ve babam Halil Öncü'ye sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **i**

ABSTRACT ..... **iii**

TEŞEKKÜR ..... **v**

İÇİNDEKİLER ..... **vi**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **viii**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **x**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xii**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1. Sivrisinekler ve Genel Özellikleri **3**

2.2. Eklembacaklı Kaynaklı Virüsler **4**

2.3. Flavivirüslerin Yapısı ve Genel Özellikleri **7**

2.4. Flavivirüslerde Hücre İçi Replikasyon **9**

2.5. Flavivirüs Konakları ve Yayılım **10**

2.6 Türkiye'de Flavivirüsler **15**

3. YÖNTEM **18**

3.1. Arazi Çalışmaları **18**

3.2. Laboratuvar Çalışmaları **19**

3.2.1. Sivrisinek havuzlarında homojenizasyon ve nükleik asit saflaştırılması **19**

3.2.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi **21**

3.2.3. Örneklerinde Flavivirüs RNA'sının Araştırılması **22**

3.2.4. Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi **24**

3.2.5. Sivrisineklerde tespit edilen flavivirüslerin tanımlanması **25**

4. BULGULAR **27**

4.1. Toplanan örnek sayısı ve dağılımı **27**

4.2. Sivrisinek Örneklerinde Flavivirüs İncelemeleri 29

5. TARTIŞMA 37

KAYNAKLAR 43

EKLER 50

ÖZGEÇMİŞ 52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. İnsan için önemli Bunya, Flavi ve Togavirüslerin özellikleri..... 7
Çizelge 2. Böceğe özgü flavivirüslerin coğrafi dağılımı ve doğal konakçı aralığı [30]. 14
Çizelge 3. İki turlu Flavivirüs PZR için kullanılacak jenerik primer dizileri ve BNV NY99-flamingo382–99 izolatı genomundaki yerleşimleri (GenBank ulaşım kodu:AF196835)..... 22
Çizelge 4. İki turlu flavivirüs 1.tur PZR için karışım içeriği ve reaksiyon koşulları 23
Çizelge 5. İki turlu flavivirüs 2.tur PZR için karışım içeriği ve reaksiyon koşulları 23
Çizelge 6. Örnekleme zamanına ve bölgesine göre sivrisinek dağılımı 28
Çizelge 7. Flavivirüs pozitif olarak izlenen havuzların özellikleri 29
Çizelge 8. Çalışmada saptanan Flavivirüs AV-2011 ve benzeri dizilerin nükleotid (422 bç) karşılaştırma matrisi. Benzerlikler yüzde olarak verilmektedir (T11:KU958176, T5:KU958167)..... 30
Çizelge 9. Çalışmada saptanan Flavivirüs AV-2011 ve benzeri dizilerin amino asit (140 amino asit) karşılaştırma matrisi. Benzerlikler yüzde olarak verilmektedir (T11:KU958176, T5:KU958167)..... 30
Çizelge 10. Çalışmada saptanan Anofeles flavivirüslarının nükleotid (598 bç) karşılaştırma matrisi. Benzerlikler yüzde olarak verilmektedir (AFvar1: Anofel flavivirüsu varyant 1 (KX148546); AFvar2: Anofel flavivirüsu varyant 2 (KX148547); AFvar1L: Anofel flavivirüsu varyant 1- benzeri virüs (KX148548); A7352: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH007352 (KM088035); A0210: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH010210 (KM088039); A0122: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH010122 (KM088036); A3236: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH003236 (KM088037); A3274: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH003274 (KM088038)). 35
Çizelge 11. Çalışmada saptanan Anofeles flavivirüslarının amino asit (198 amino asit) karşılaştırma matrisi. Benzerlikler yüzde olarak verilmektedir (AFvar1: Anofel flavivirüsu varyant 1 (KX148546); AFvar2: Anofel flavivirüsu varyant 2 (KX148547); AFvar1L: Anofel flavivirüsu varyant 1- benzeri virüs (KX148548); A7352: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH007352 (KM088035); A0210:

Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH010210 (KM088039); A0122: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH010122 (KM088036); A3236: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH003236 (KM088037); A3274: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH003274 (KM088038)). 35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İnsanların tesadüfi ya da son konak olduğu arbovirüslerin yaşam döngüsü [13]. 5
Şekil 2. Flavivirüslerin virion ve genom yapısı [24], [25]. 8
Şekil 3. Flavivirüs cinsinin filogenetik ağacı 12
Şekil 4. Örnekleme yapılan bölgeler haritası..... 19
Şekil 5. Flavivirüs PZR agaroz jel görüntüsü (bp: baz çifti)..... 25
Şekil 6. Örnekleme süresince aylara göre şehirlerden toplanan sivrisinek dağılımı 27
Şekil 7. Toplanan sivrisineklerin bölgelere göre cinsiyet dağılımı 28
Şekil 8. TK698, TR366, TR379, TR380, TR381 ve TR370 kodlu havuzlarda saptanan kısmi flavivirüs nükleotid dizilerinin analizi. Filogenetik ağaç "Maximum likelihood" yöntemi ve "Tamura-Nei" modeli ile oluşturulmuştur. "Bootstrap" değerleri ağaçta gösterilmiş ve 1000 replikasyon için hesaplanmıştır. Karşılaştırmada kullanılan virüslar GenBank ulaşım kodları ve izolat isimleri ile belirtilmiştir. Ülkemizden rapor edilen diziler ilgili kaynak ve GenBank ulaşım kodları ile belirtilmiştir (kırmızı daire: Çalışmada elde edilen dizi; mavi ters üçgen: Türkiye kaynaklı diziler) 31
Şekil 9. TK698, TR366, TR379, TR380, TR381 ve TR370 kodlu havuzlarda saptanan kısmi flavivirüs amino asit dizilerinin analizi. Filogenetik ağaç "Maximum likelihood" yöntemi ve "Jones-Taylor-Thornton" modeli ile oluşturulmuştur. "Bootstrap" değerleri ağaçta gösterilmiş ve 1000 replikasyon için hesaplanmıştır. Karşılaştırmada kullanılan virüslar GenBank ulaşım kodları ve izolat isimleri ile belirtilmiştir. Ülkemizden rapor edilen diziler ilgili kaynak ve GenBank ulaşım kodları ile belirtilmiştir (kırmızı daire: Çalışmada elde edilen dizi; mavi ters üçgen: Türkiye kaynaklı diziler)..... 32
Şekil 10. Flaviviral DNA formu saptanan örneklerde elde edilen dizilerin RNA formu dizileri ve prototip DNA formu dizisi (AV2011) ile karşılaştırılması. Prototip dizide bulunan "stop" kodonları (757 ve 796. pozisyonlar, işaretli), saptanan dizilerde yer almamaktadır. 34

Şekil 11. Elde edilen Anofeles flavivirüs dizisinin, Afrika kökenli Anofeles flavivirüsu varyantları ile hizalanması. İncelenen bölge Anofeles flavivirüsu varyant 1 genomunda 9049-9641. nükleotidlere karşılık gelmektedir (AFvar1: Anofel flavivirüsu varyant 1 (KX148546); AFvar2: Anofel flavivirüsu varyant 2 (KX148547); AFvar1L: Anofel flavivirüsu varyant 1- benzeri virüs (KX148548) 36

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Derece santigrad
µl	Mikrolitre
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Ae.	*Aedes*
An.	*Anopheles*
bç	Baz çifti
BNV	Batı Nil Virüsü
BÖF	Böceklere Özgü Flavivirüs
cDNA	Komplementer DNA
CFAV	Cell fusing agent virus
Cs.	*Culiseta*
CSA	Cell silent agent
CTFT	*Cx. Theileri* flavivirüsü Türkiye
Cx.	*Culex*
DENV	Deng virüs
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleozit trifosfat
EBAL	Ekolojik Bilimler Araştırma Laboratuarı
EEE	Doğu At Ensefaliti
ER	Endoplazmik Retikulum
HFRS	Renal Sendromlu Hemorajik Ateş
HPS	Hantavirüs Pulmoner Sendromu
JEV	Japon Ensefaliti Virüsü
KKHFV	Kırım-Kongo Hemorajik Ateşi Virüsü
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı RNA
n	Örnek sayısı
nt	Nükleotid

Oc.	*Ochlerotatus*
ACFT	*Aedes caspius* flavivirüs Türkiye
ORF	Open Reading Frame
pm	Pikomol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
s.l.	Sensu lato
s.s.	Sensu stricto
sdH_2O	Distile su
SLEV	St. Louis Ensefalit Virüs
SSS	Santral Sinir Sistemi
TR	Türkiye
Ur.	*Uranotaenia*
UTR	Untranslated Region
VEE	Venezuela At Ensefaliti
WEE	Batı At Ensefaliti

1. GİRİŞ

Türkiye önemli vektör türleri içeren sivrisineklerin dağılımı açısından kritik coğrafi konumda olan bir ülkedir. Daha önce yapılan çalışmalarda Türkiye'de bulunan sivrisinek türlerinin 64 taksondan oluştuğu bulunmuştur. Bunlar içinde en önemli sivrisinek taksonları *Culex, Anopheles* ve *Aedes* türleridir. Ülkede bulunan tür çeşitliliği vektör kaynaklı oluşan hastalıkların da çeşitliliğine yön vermiştir. Bu hastalıkların yayılımı ve vektör kaynaklı olması halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır [1], [2].

Hastalık yapıcı arbovirüslerin önemli bir kısmı sivrisinekler tarafından taşınmaktadır. Arbovirüs grubu içinde yer alan flavivirüsler dünya genelinde halk sağlığı açısından önemli olan yüksek derecede patojenik virüsleri içermektedir. Bu virüslerin en önemlileri Batı Nil Virüsü (BNV), Japon Ensefalit Virüsü (JEV), Kene kaynaklı Ensefalit Virüsü ve Deng Virüsü (DENV) olarak sıralanabilir [3]. Daha önce yapılan çalışmalarda ülkemizde flavivirüs gruplarından Batı Nil Virüsü Trakya bölgesinde tespit edilmiştir. Trakya bölgesi bulunduğu coğrafi konum, barındırdığı kozmopolit insan popülasyonu ve kuş göçlerinin ana rotalarının üzerinde bulunması gibi nedenler açısından virüs konaklarına rezervuar olabilecek potansiyelde bir bölgedir. Bu bölgenin özellikle kuş göçlerinin önemli bir geçiş noktası olması, bölgedeki virüs sirkülasyonu açısından büyük önem taşımaktadır [4]. Bununla birlikte ülkemizin son yıllarda Suriye'den göç alması ve bu insanların karşılaştığı çeşitli faktörler; örneğin barınak yetersizliği, sağlık hizmet koşullarının uygun olmaması, hijyen olmayan yaşam koşulları, sivrisinek üreme alanlarına yakın yerleşim yerlerinde çoklukla bulunma gibi nedenlerden dolayı, sivrisineklerle bulaşan hastalıkların daha fazla ve hızlı yayılmasına elverişli ortam hazırlamaktadır. İnsan göçü önemli bir faktör olduğundan dolayı Trakya bölgesinde de virüsün dinamiklerini değiştirme ihtimalini ortaya çıkarmıştır. Bu Tez çalışmasının temel amacı olan, Trakya bölgesinde özellikle mülteci yerleşim yerleri ve çevrelerinde yapılan flavivirüs taraması, bölgede virüslerin patojen yayılımlarını daha ayrıntılı ve net görmek açısından yararlı olmuştur.

Bu tez çalışması ile, Trakya bölgesinin belirli lokalitelerinden yapılan arazi çalışmalarından toplanan örneklerde bölgede bulunan sivirisinek türlerinin örneklenmesi ve örneklenen tüm ergin sivrisinek bireyleri için flavivirüs taraması yapılarak, Trakya bölgesi için flavivirüs dağılımının ortaya koyulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sivrisinekler ve Genel Özellikleri

Sivrisinekler, tıbbi entomoloji ve veterinerlik alanlarında en önemli eklem bacaklı gruplarından biridir. Dünya'da 3.500'den fazla tür ve alt tür ile temsil edilmektedirler. *Culicidae* ailesinde Diptera takımında çift kanatlılar olarak sınıflandırılmaktadır. Türlerin büyük bir kısmı *Anopheles*, *Culex* ve *Aedes* cinslerine aittir [5].

Sivrisineklerin yaşam döngüsünde ergin öncesi evreler; yumurta, 4 larva evresi ve pupa evresidir ve bu evreler durgun sularda geçer. Önemli yaşam habitatları arasında akarsu kenarları, göletleri, yağmur suyu birikintileri, bataklıklar, su ile dolu ağaç kavukları gibi doğal alanlar ile otomobil lastikleri ve su rezervuarları gibi yapay alanlar da bulunmaktadır. Ergin dişiler omurgalı hayvanların kanını emmek için özelleşmiş altı iğneli sokucu-emici ağız parçalarına sahiptirler. Hastalık taşıyan vektör olmalarına kan emici özelliğe sahip olmaları neden olmaktadır [5].

Sivrisineklerin Trias döneminden yaklaşık 200-245 milyon yıl önce ortaya çıktığı tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, ilk tanımlanan sivrisinek fosilleri Kuaterner Dönem'in (37-58 milyon yıl öncesi) Eosen çağında ortaya çıkmıştır ve bu fosiller modern *Culex* türleriyle görünüş açısından çok benzerdir. *Aedes* sivrisinek türlerine ait fosiller 30 milyon yıl önce orta Oligosen çağındaki kalıntılarda ortaya çıkmıştır [6]. Günümüzde Antarktika kıtası hariç her kıtada, hatta 3.000 metre ve üzeri yükseklikte bulunabilirler [5].

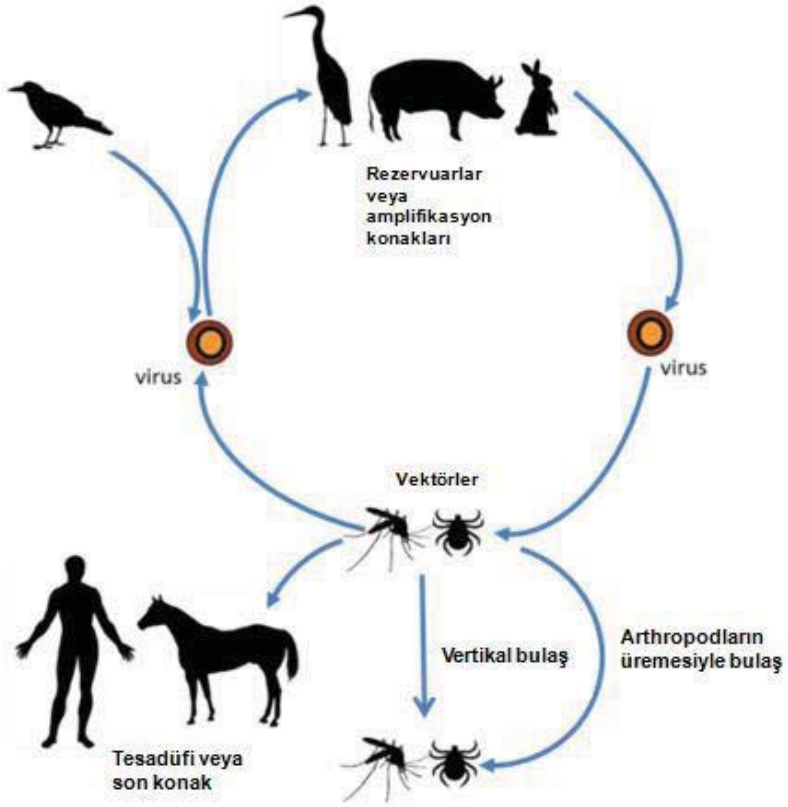
Sivrisineklerin kan emici özelliğinin kuş ve memelilerin ortaya çıktığı geç mezozoik çağda yani 100 milyon yıl önce geliştiği düşünülmektedir. Bu düşünce, bazı sivrisinek türlerinin yalnız belirli soğukkanlı hayvanlarla beslenmesini, memeli ve kuşların varlığını tespit etmek için gerekli bazı duyusal reseptörlerden neden yoksun olduğunu açıklamaktadır [5]. Sivrisinek ve insanların uzun süredir ilişkili

olmasına rağmen, sivrisineklerin insan patojenlerini bulaştırmasındaki rolü 19. yüzyılın ikinci yarısında fark edilmiştir. Sivrisineklerin patojen bulaştırdığı ilk olarak, 1876 yılında Sir Patrick Manson tarafından filaryal nematodun insanlarda sebep olduğu lenfatik fil hastalığının tespiti olmuştur [7]. Bunun ardından 1898'de sıtma, 1900'de sarı humma, 1902'de deng, 1933'te batı at ensefalitinin sivrisinek kaynaklı hastalıklar olduğu keşfedilmiştir [8].

2.2. Eklembacaklı Kaynaklı Virüsler

Arbovirüs (artropod kaynaklı virüs) terimi, kan emici bir eklembacaklı tarafından bulaştırılan virüsün yaşam döngüsünü tanımlamak amacıyla kullanılır [9]. Arbovirüslerin yaşam döngüsünde en az iki konakçı, bir eklembacaklı ve bir omurgalı söz konusudur. Genellikle virüsler, omurgalı konağında yeterli düzeyde viremi oluşturur ve duyarlı eklembacaklılara aktarım sağlanır. Arbovirüslerin biyolojik iletiminde yatay ya da dikey yollar söz konusu olabilir. Yatay yolla bulaşma, enfekte vektörler arası cinsel birleşme ve dişi vektörün kan emme sırasında omurgalı konakçıya virüs aktarımı yoluyla ortaya çıkar. Dikey yolla bulaşma ise, dişi bir vektörden, dişi veya erkek bir yavruya aktarım şeklinde gerçekleşir [10].

Arbovirüslerin doğal yaşam döngüleri, sıklıkla vektör eklembacaklılar ile rezervuar türler – ara konaklar arasında süregelir. İnsanlar sıklıkla virüs döngüsüne katkıda bulunmayan, tesadüfi ya da son konak olarak izlenir. Ancak sarı humma, DENV gibi bazı enfeksiyonlar, insanlarda vektörlerin enfeksiyonuna imkan tanıyan düzeyde viremi oluşması sonucunda, vektörün insandan kan emmesi, ilgili virüsün döngüsüne doğrudan katkı yapabilir [11]. Böyle virüsler, sivrisinek-insan-sivrisinek iletim döngüsünü devam ettirebilirler. Bazı enfeksiyonlarda ise şehir ve kırsal bölgelerde farklı ara konaklar ve vektörleri içeren daha karmaşık döngüler izlenebilir. Halk sağlığı açısından önemli arbovirüsler için en önemli konakçılar kuşlar ve kemirgenler, en önemli eklembacaklı vektörleri ise sivrisineklerdir [12].



Şekil 1. İnsanların tesadüfi ya da son konak olduğu arbovirüslerin yaşam döngüsü [13].

Arbovirüsler küresel bir dağılıma sahiptir, fakat sıklıkla tropikal bölgelerde, uygun iklim koşullarının izlendiği sürelerde soğukkanlı eklembacaklılarda sıklıkla bulunurlar [11], [14], [15]. Her bir arbovirüs, ekolojik faktörler tarafından sınırlandırılan ve bulaşma döngüsünü etkileyen belirli bir coğrafi dağılıma sahip olabilir. Genel olarak en önemli sınırlayıcı çevresel faktörler yağış, sıcaklık ve nemdir. Bu faktörler, eklembacaklı vektörlerinin ve omurgalı konakçılarınının diğer ekolojik faktörler ve bitki örtüsü ile, coğrafi dağılımlarının belirlenmesinde etkili olur [14].

Arboviral amplifikasyonun hızlı bir şekilde epidemik seviyelere doğru ilerlemesi için, uygun vektör ve omurgalı konakçı populasyonlarının uygun çevresel koşullarda bir araya gelmesi gerekmektedir [16]. Arboviral hastalıkların epidemiyolojik özellikleri karmaşıktır ve her etken için farklı özellikler taşıyabilir [12]. Arbovirüsler sıklıkla bir ya da birden fazla çevresel faktördeki değişiklik sonucu hızlı ve yaygın bir amplifikasyon sağlayabilecek şekilde, düşük yoğunluklu bir replikasyon düzeyini sürdürür [16]. Ortaya çıkan salgınlar, viral genomdaki

mutasyonlar, konakçı spektrumunu değiştiren ya da genişleten faktörler; ayrıca omurgalılarda virülans ya da viremi düzeyi, vektör spektrumu ya da kompetansındaki değişikliklere bağlı olabilir. Vektör veya omurgalı konak türlere bağlı salgınlar, çevresel değişikler, yeni oluşan nişler, ticaret, seyahat gibi aktivitelerden de etkilenmektedir. Küresel ısınma ve artan kentleşme, vektör ve duyarlı konak popülasyonlarını önemli derecede etkilemektedir [16]. Geçtiğimiz 20 yılda, çeşitli nedenlerle küresel ölçüde arboviral salgınları ortaya çıkmış ve birçok hastalığın prevalansında artışlar kaydedilmiştir [12], [14].

Uluslararası arbovirüs sınıflandırmasında vektör aracılığıyla bulaş gösteren kesin ya da muhtemel 534 virüs tanımlanmış ve bunların 134 'ünün insan patojeni olarak raporlanmıştır [15]. Arbovirüsler taksonomik açından zengindir; 8 viral aile ve 14 cinste yer alan birçok virüsten oluşur ve eklembacaklılar yoluyla aktarılır. Halk sağlığı açısından en önemli arbovirüsler, *Flaviviridae; Togaviridae*, ve *Bunyaviridae* ailelerinde sınıflandırılır (Çizelge 1) [17]. Tüm bu ailelerde yer alan virüsler RNA genomu taşır ve replikasyonu RNA üzerinden gerçekleşir. RNA virüslerinin genetik çeşitliliği ve yüksek mutasyon kapasitesi, arbovirüslerin omurgalı ve eklembacaklı konaklara adaptasyon ve birbirini takip eden replikasyon döngülerini gerçekleştirebilmeleri için önem taşır [18]. DNA genomu taşıyan arbovirüsler nadirdir [19], [20].

Çizelge 1. İnsan için önemli Bunya, Flavi ve Togavirüslerin özellikleri [21].

Aile	*Cins*	*Virüs*	*Rezervuar konak*	*Bulaş yolu*	*Hastalık*	*Coğrafi dağılım*
Bunyaviridae	Bunyavirüs	Kaliforniya ensefaliti, La Crosse, Tahyna	Memeli	Sivrisinek	Ateş, ensefalit	K.Amerika, Avrupa, Asya
	Phlebovirüs	Tatarcık humması	Gerbil (kemirici)	Tatarcık	Ateş, miyalji	Avrupa, Afrika, Asya
		Rift Valley ateşi	Memeli	Sivrisinek	Ateş, ensefalit	Afrika
	Nairovirüs	KKHFV	Memeli	Kene	Hemorajik ateş	Avrupa, Asya, Afrika
	Hantavirüs	Hantaan, Puumala, Sin Nombre, vb	Kemirici	Salgılarla direkt temas	HFRS, HPS	Amerika, Asya, Avrupa
Flaviviridae	Flavivirüs	Deng tip 1-4	Maymun, insan	Sivrisinek	Ateş; hemorajik ateş, şok sendromu	Tüm dünyada tropikal bölgeler
		Sarı humma	Maymun, insan	Sivrisinek	Hemorajik ateş, hepatit	Afrika, G. Amerika
		Batı Nil	Kuş	Sivrisinek	Ateş, ensefalit	Asya, Afrika, K. Amerika, Avrupa
		Japon ensefaliti	Kuş, domuz	Sivrisinek	Ateş, ensefalit	Asya
		Murray Valley ensefaliti	Kuş	Sivrisinek	Ateş, ensefalit	Avustralya
		Kyasanur Forest hastalığı	Primat, kemirici	Kene	Hemorajik ateş	Hindistan, Suudi Arabistan
		Omsk hemorajik ateşi	Memeli, kemirici	Kene	Hemorajik ateş	Asya
		St.Louis ensefaliti (SLE)	Kuş	Sivrisinek	Ateş, ensefalit	Amerika
		Powassan	Memeli	Kene	Ateş, ensefalit	Asya, Amerika
		Kene ensefaliti (TBE)	Memeli, kuş	Kene	Ateş, ensefalit	Avrupa, Asya
Togaviridae	Alphavirüs	Çikungunya, Sindbis, Ross River, Onyong-nyong, Mayaro, Semliki Forest, EEE, WEE, VEE	Kuş, kemirici, maymun	Sivrisinek	Ateş, poliartrit, ensefalit	Amerika, Asya, Avustralya, Afrika

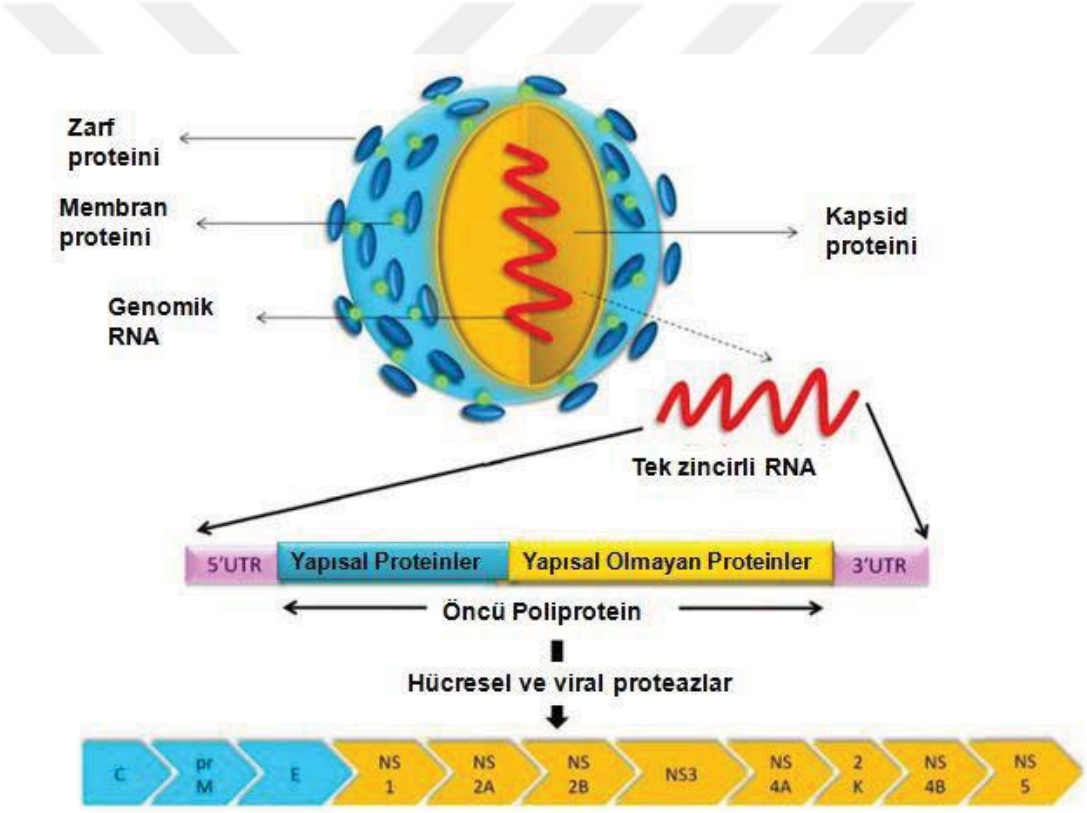
KKHFV: Kırım-Kongo hemorajik ateşi virüsu; HFRS: Renal sendromlu hemorajik ateş; HPS: Hantavirüs pulmoner sendromu; ABD: Amerika Birleşik Devletleri; EEE: Doğu at ensefaliti; WEE: Batı at ensefaliti; VEE: Venezuela at ensefaliti; SSS: Santral sinir sistemi.

2.3. Flavivirüslerin Yapısı ve Genel Özellikleri

Flavivirüs cinsi, *Flaviviridae* ailesi içerisinde yer alır ve 70'i aşkın virüsü içerir [3]. Bu virüsler tek sarmallı, pozitif polariteli, yaklaşık 11 kb olan bir RNA genomuna sahiptir [22]. Genomun 5 've 3' uçlarında yaklaşık 100 ve 400 ila 700 nt lik

kodlanmayan bölgeler (“untranslated region”, UTR'ler) bulunur; bu bölgeler tek bir açık okuma çerçevesini (“open reading frame”, ORF) sınırlandırır [23]. Flavivirüsler, ek olarak 3'-NCR genomik RNA'dan köken alan, küçük (0.3-0.5 kb) boyutlu, replikasyonu ve patojenite ile ilişkili kodlamayan bir RNA üretirler.

Viral genom yapısal proteinler olan kapsid (C), premembran / membran (PM / M) ve zarf (“envelope”, E) proteinleri ile yapısal olmayan, post-translasyonel parçalanma ile olgun viral proteinleri oluşturan büyük bir poliproteini kodlar (Şekil 2) [22] . Flavivirüslerde RNA’nın ikincil yapısı ve işlevi korunsa da, genomun dizi kompozisyonu, uzunluğu ve fonksiyonel bölgelerin konumları, farklı cinsler özellikle kene ve sivrisinek kaynaklı virüslerde farklılık gösterir.



Şekil 2. Flavivirüslerin virion ve genom yapısı [24], [25]**.**

Flavivirüs virionları 40-60 nm çapında, küresel şekilli olup lipid zarf içerir ve zarf üzerinde iki ya da üç membran proteini bulunur. Batı Nil, kene kaynaklı ensefalit ve Deng virüsünde (DENV) ana zarf gilikoprotein E, membrana paralel olan dimerik, çubuk şeklinde bulunur ve E protein dimerleri balık sırtı benzeri bir düzen içinde, ikozahedral simetriyi oluşturacak şekilde düzenlenir. Lipidler flavivirüs zarfında virion ağırlığının %17’sini oluştururlar ve bu lipidler konakçı hücre

membranlarından kazanılır. Virionlar, glikolipid ve glikokarbonhidrat yapısında, içeriği konakçı hücreye (omurgalı veya artropod) bağlı olarak değişiklik gösteren karbonhidratlar da içerir. [22]. Flaviviral kapsidi, tek bir protein kapsomer tarafından oluşturulur [22]. Olgun virionlar, C - kapsomer (11 kDa) ve E - büyük zarf (50 kDa) proteinlerini içerir. Virüsun yapısal olmayan proteinleri NS1 (46 kDa), NS2A (22 kDa), NS2B (14 kDa), NS3 (70 kDa), NS4A (16 kDa), NS4B (27 kDa) ve NS5 (103 kDa) şeklindedir. Yapısal olmayan proteinlerin temel işlevi viral replikasyon ve transkripsiyonu düzenlemek ve konağın antiviral yanıtını modüle etmektir. Bunlardan NS1, viral replikaz için kofaktör aktivitesi gösterir ve kompleman aktivasyonunu düzenler. NS2A virusün bir araya gelişinde etkilidir ve Batı Nil gibi bazı virüslerde interferon yanıtının baskılanmasından sorumludur. NS2B, proteolitik aktivite için kofaktör görevi görür. NS3 ise serin proteaz, NTPaz, RNA trifosfataz ve helikaz aktivitesi gösterir. NS4A ve NS4B endoplazmik retikulum değişiklikleri ve konak savunmasının kontrolünde görev alır. NS5 ise RNA-bağımlı RNA polimeraz aktivitesi ile virüsün ana replikaz enzimi ve en iyi korunmuş bölgesidir. Tüm cinslerde serin proteaz, RNA helikaz ve RNA-bağımlı RNA polimeraz motifleri genomun benzer bölgelerinden kodlanır [22].

2.4. Flavivirüslerde Hücre İçi Replikasyon

Flavivirüslerde replikasyon, viral hemagglutinin E'nin hücre yüzeyindeki özgül reseptöre tutunmasıyla başlar. E zarf proteini, nötralizan antikorların ana hedefidir ve koruyucu bağışıklığı uyarır. E proteini aynı zamanda flavivirüslerde izlenen nötralizan olmayan, çapraz reaktif antikorların da hedefidir. Hücre reseptörüne tutunmanın ardından virüs, reseptöre bağımlı endositoz mekanizmasını kullanarak hücre içerisine alınır. E proteinindeki pH'ya bağlı konformasyonel değişiklik sonucu virüs zarfı ile endozomal membranın füzyonu gerçekleşir ve ardından nükleokapsid sitoplazmaya geçer [22].

Viral genom replikasyonu ve translasyon ER ile ilişkili membran sisteminde gerçekleşir. Yeni viral genomların sentezi için, RNA bağımlı RNA polimeraz enzimi genoma komplementer negatif polariteli RNA sentezler ve çift iplikli replikatif formları oluşturur; bu molekülün kalıp olarak kullanılması ile yeni pozitif polariteli

viral RNA'ların oluşması sağlanır. Sentezlenen yeni RNA'lar ya viral proteinlerin sentezini sürdürür ya da kapsid içerisine paketlenir.

Genomik RNA, aynı zamanda viral proteinleri kodlayan mRNA olarak görev yapar. Viral mRNA'da tüm yapısal ve yapısal olmayan proteinleri kodlayan tek bir açık okuma çerçevesi ("open reading frame", ORF) bulunur. 5' ve 3' uçlarındaki kodlamayan bölgeler, viral RNA aktarımı, replikasyon ve paketlemeyle ilgili motifleri içerir. Flavivirüslerde genomik RNA'nın translasyonu, ailenin diğer üyelerinden farklı olarak "cap" bağımlıdır ve flavivirüslerin genomları, 5'-terminal tip I "cap" yapısını içermektedir [22]. Sentezlenen viral polipropteín, olgun yapısal ve yapısal olmayan proteinlerin ortaya çıkması için hücresel ve viral NS2B-NS3 serin proteazlar tarafından işlenir.

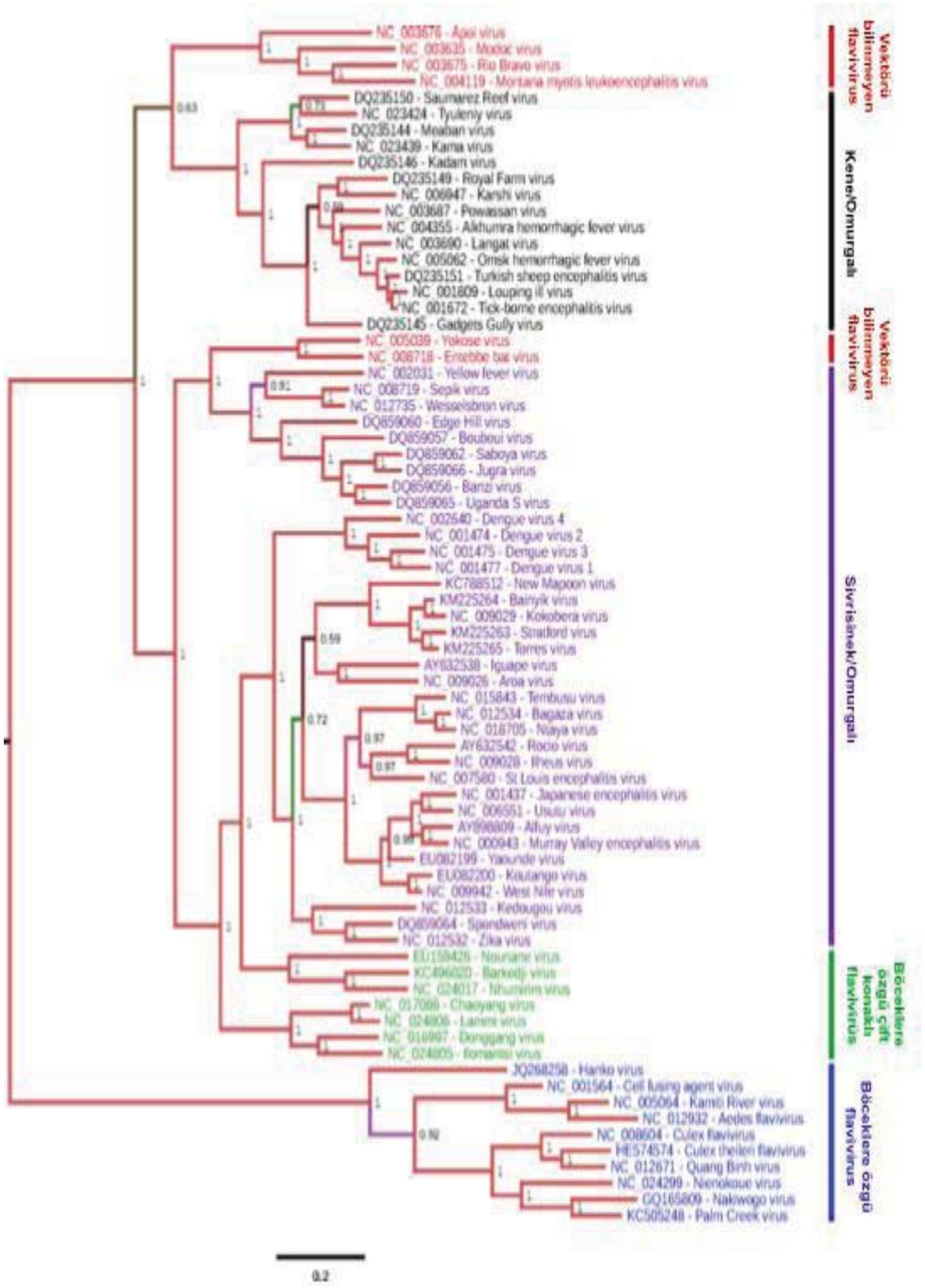
Virüsun olgunlaşması endoplazmik retikulumda gerçekleşir. Trans-golgi ağında taşınma sırasında pre M proteini parçalanır, olgun M proteini içeren enfektif virion oluşur. Viral parçacıklar ekzositoz ile salınmadan önce sitoplazmik veziküller yoluyla taşınır [22].

2.5. Flavivirüs Konakları ve Yayılım

Genom organizasyonları ve hücre içi replikasyon döngüleri özdeş olmasına karşın, flavivirüslerin konak spektrumu ve bulaşma yolları önemli düzeyde çeşitlilik gösterir. Bilinen insan patojeni olan flavivirüsler kan emici eklembacaklılar ve omurgalı konaklar arasında dolaşımlarını sürdürür ve çift konaklı virüsler olarak tanımlanır. Bunlar arasında sivrisinekler ve omurgalılar ile keneler ve omurgalılar arasında yaşam döngüsünü devam ettiren, filogenetik olarak farklı gruplar oluşturan izolatlar bulunur. Yaygın olarak tanınan ve küresel halk sağlığı sorunu oluşturan sivrisinek-omurgalı flavivirüsleri arasında en iyi bilinenler, Deng virüsü (DENV), sarı humma virüsü, Japon ensefalit virüsü (JEV) ve Batı Nil virüsü (BNV)'dür [22]. Bunların dışında St Louis ensefaliti virüsü ve (SLEV) and Murray Vadisi ensefaliti virüsü, bölgesel olmakla birlikte önemli sayıda kişiyi etkilemektedir. Halk sağlığı açısından ciddi bir yük getiren kene-omrurgalı virüsleri arasında ise kene kaynaklı ensefalit virüsü, Langat virüsü ve Powassan virüsü

sayılabilir [26], [27]. Sayılan bu virüsler, endemik bölgelerde, özellikle de sağlık olanakları kısıtlı ve gelişmekte olan ülkelerde önemli düzeyde morbidite ve mortalite oluşturan, ayrıca uygun ekolojik koşullar söz konusu olduğunda yeni bölgelerde de salgınlar oluşturabilen virüslerdir [3]. Eklembacaklılar ve omurgalılar arasında dolaşım gösteren flavivirüslerde bulaşma sıklıkla, ilgili eklembacaklının kan emmesi yoluyla meydana gelir. Bunun dışında kan ve kan ürünleri transfüzyonu, organ transplantasyonu, pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin ağız yoluyla alınımı veya aerosoller yoluyla bulaşma söz konusu olabilmektedir [22].

Birçok flavivirüs ise, eklembacaklı-omurgalı döngüsüne sahip değildir ve sadece omurgalılar ya da eklembacaklılarda saptanır. Omurgalılara özgül flavivirüsler, ki bunlar vektörü bilinmeyen flavivirüsler olarak da adlandırılmaktadır; kemirgenlerden izole edilen virüsler (örneğin Modok virüsü) ve yarasalardan izole edilen virüsler (örneğin Rio Bravo virüsü) olarak iki grupta incelenebilir [26], [27]. Bu virüslerin duyarlı türler arasında dolaşımının, horizontal geçiş yoluyla devam ettirildiği düşünülmektedir [28], [29]. Bir grup flavivirüs ise sadece eklembacaklılarda saptanır ve sıklıkla böceklere özgül flavivirüs (BÖFV) olarak isimlendirilir. Yapılan incelenemeler, BÖFV'lerin iki filogenetik grupta kümelendiğini ortaya koymuştur (Şekil 3). [30]. Bunlardan ilki, çift konaklı flavivirüslere genetik yakınlık gösterir ve çift konaklı BÖFV olarak adlandırılır. Bu gruba dahil izolatlar görece az sayıdadır ve ayrıntılı olarak incelenmeyi beklemektedir. İlk tanımlanan virüs, 2004 yılında Fildişi Sahili'nde *Uranotaenia mashonaensis* türünde saptanan Nounane virüstür [31]. Bunun dışında sekizi aşkın izolat, bu grupta yer almaktadır. Bunların doğal konakları ve yaşam döngüleri bilinmemektedir. Sivrisinek-omurgalı virüsleri ile filogenetik yakınlıkları nedeniyle, omurgalı konağı henüz saptanamamış ya da omurgalı hücrelerini enfekte edebilme yeteneklerini kaybetmiş virüsler oldukları düşünülmektedir.



Şekil 3. Flavivirüs cinsinin filogenetik ağacı [22]

İkinci grup BÖFV ise genetik olarak diğer tüm flavivirüslerden farklılık gösterir, klasik BÖFV olarak da adlandırılır ve literatürde BÖFV terimi sıklıkla bu grubu ifade etmek amacıyla kullanılır. Bu grubun üyeleri çok geniş bir coğrafik dağılıma sahiptir ve Antartika dışındaki bütün kıtalarda sivrisineklerden izole edilebilmektedir. İlk tanımlanan ajan *Aedes aegypti* hücre kültüründe izole edilmiş ve enfekte hücrelerde oluşturduğu sitopatik etkiler dolayısıyla "Cell Fusing Agent Virus" (CFAV) adı verilmiştir [32]. Takip eden çalışmalarda, bu virüsun Arjantin, Endonezya, Meksika, Porto Riko ve Tayland gibi ülkelerden toplanan sivrisineklerde bulunduğu ve laboratuvar kolonilerinde de saptanabildiği gösterilmiştir [33–37]. Ardından 1999 yılında Kenya'da Kamiti nehri virüsü ve 2003-2004 yıllarında Japonya ve Endonezya'da *Culex* flavivirüsü izole edilmiştir ve taramalarda bun ve benzeri izolatların Asya ve Amerika kıtalarında farklı bölgelerde bulunduğu ortaya konulmuştur [38]–[47]. Son on yılda, özellikler yeni nesil dizileme gibi ileri moleküler yöntemlerin kullanımının yaygınlaşması ile birçok BÖFV'ler tanımlanmış, bir kısmı da hücre kültürlerinde izole edilmiştir. Bunlar arasında farklı gruplar tarafından bağımsız olarak saptanan ve geniş bir alanda, bazı durumlarda kıtalararası varlığı gösterilmiş olan *Aedes* flavivirüsü, Palm Creek virüsü, Quang Binh virüsü, *Aedes caspius* flavivirüs, Hanko flavivirüsü, *Culex theileri* flavivirüsü yer almaktadır [36, 48–51] (Çizelge 2).

Çizelge 2. Böceğe özgü flavivirüslerin coğrafi dağılımı ve doğal konakçı aralığı [30].

Virus	İzolatı Var/Yok	Coğrafik Dağılımları	Doğal Konak Aralığı
Aedes flavivirus (AEFV)	Evet	Japonya (2003), İtalya (2008), ABD (2011), Tayland (2012)	*Ae. albopictus, Ae. flavopictus, Cx. pipiens*
Aedes galloisi flavivirus (AGFV)	Evet	Japonya (2003)	*Ae. galloisi*
Calbertado virus (CLBOV)	Evet	Kanada (2003), ABD (2006)	*Cx. tarsalis, Cx. pipiens*
Cell fusing agent virus (CFAV)	Evet	Laboratuvar (1975), Porto Riko (2002), Endonezya (2004) Meksika (2007), Tayland (2008), ABD (2012)	*Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Culex* spp.
Culex flavivirus (CxFV)	Evet	Japonya (2003), Endonezya (2004), Çin (2006), Guetamala (2006), ABD (2006), Meksika (2007), Trinidad (2008), Uganda (2008), Argentina (2009)	*Cx. interrogator, Cx. maxi, Cx. nigripalpus, Cx. pipiens, Cx. quinquefasciatus, Cx. restuans, Cx. tarsalis,Cx. tritaeniorhynchus, Cx. usquatus*
Culex theileri flavivirus (CTFV)	Evet	İspanya (2006), Portekiz (2009-2010), Yunanistan (2010), Tayland (tarihi belli değil)	*Cx. fuscocephala, Cx. pipiens, Cx. theileri*
Hanko virus (HANKV)	Evet	Finlandiya (2005), İspanya (2006), İtalya (2007), Portekiz (2007)	*Ae. caspius, Ae. detritus, Ae. vexans, Cx. pipiens, Cx. perexiguus, Cx. theileri*
Kamiti River virus (KRV)	Evet	Kenya (1999)	*Ae. macintoshi*
Nakiwogo virus (NAKV)	Evet	Uganda (2008)	*Mansonia africana nigerrima*

BÖFV'lerin eklembacaklılar arasında aktarımında vertikal ve veneral yolların etkili olduğu ortaya konulmuştur. BÖFV'lerin dişi ve erkek bireylerde ve tüm gelişim evrelerinde bulunması, vertikal yolun bu virüslerin persistansında önemli rol oynadığına işaret etmektedir. Veneral aktarım da, deneysel verilere göre vertikal yol kadar ağırlıklı olmasa da, BÖFV bulaşı ile sonuçlanmaktadır [34], [47], [50], [52], [53]. Klasik BÖFV'ler, hiçbir omurgalıda saptanamamış, virüs izolatları herhangi bir omurgalı kökenli hücre kültüründe üretilememiştir. Bu nedenle izolasyon çalışmalarında sıklıkla *Ae. albopictus* kaynaklı C6/36 hücreleri kullanılır.

Bu hücrelerde virüs izolatına göre farklı tip sitopatik etkiler izlenir [32],[54]. Enfekte bireylerde, sivrisinek ve virüse göre farklılıklar görülmek üzere orta bağırsak, tükrük bezleri, yumurtalıklar, testisler, baş ve yağ cisimlerinde viral genom saptanabilmektedir [54].

2.6 Türkiye'de Flavivirüsler

Batı Nil Virüsü (BNV), flaviviral enfeksiyonlar arasında ülkemizde en fazla bilgi bulunan etkendir. Kamuoyu ve tıbbi çevrelerin ilgisini BNV'ye yönlendiren ana gelişme, 2010 yılında ortaya çıkan ve Batı Anadolu'da birçok ili etkilemiş olan ateşli hastalık ve merkezi sinir sistemi tutulumu bulguları ile karakterize salgındır [55]. Bu salgında 12 serolojik olgu doğrulanmış ve 35 muhtemel BNV olgusu rapor edilmiş, olgu fatalite oranı %21 gibi yüksek bir düzeyde izlenmiş, mortalite açısından risk faktörleri hipertansiyon, şeker, kronik akciğer hastalıkları olarak saptanmıştır. Bu salgında tanının serumda antikor tayinine dayanması nedeniyle, enfeksiyon etkeni virüs izolatı hakkında bilgi elde edilememiştir. Bununla birlikte, 2010 yılı öncesinde çeşitli bölgeler ve gruplar üzerinde gerçekleştirilmiş sero-sürveyans çalışmaları, toplumda BNV maruziyetinin meydana geldiğini net olarak ortaya koymuştur [55]. BNV maruziyeti, çeşitli hayvan türlerinde de gösterilmiştir. BNV'nin etken olduğu sporadik olgu sunumları, salgını öncesinde de Ankara ve İzmir illerinden bildirilmiştir [56], [57]. Sıralanan bu bilgiler, ülkemizde virüs aktivitesinin mevcudiyeti ve yaygınlığı konusundaki ön verileri oluşturmuştur.

Türkiye'de dolaşımda bulunan BNV'nin genetik yapısı konusundaki ilk veriler, Eskişehir ve Ankara illerinde izlenen at ve insan olgularının incelenmesi sonucu elde edilmiştir [4]. Etkilenen olgularda tanımlanan BNV zarf geni kısmi dizileri, dolaşımdaki virüsün köken 1 ("lineage 1") soy 1a ("clade 1a") olduğunu ortaya koymuştur. BNV izolatları genomik çeşitliliklerine göre farklı köken ve soylarda incelenmektedir [58], [59]. Bunlardan köken 1, yaygın bir dağılıma sahiptir, çoğunluğu yüksek virülansa sahiptir ve Avrupa ve Akdeniz çevresi salgınlarının önemli bir bölümünden sorumludur [60], [61]. Bununla birlikte, köken 2 izolatları, son yıllarda Avusturya ve Macaristan'da saptanmış, ardından Balkan ülkeleri ve Yunanistan'a yayılarak meydana getirdiği salgınlarda önemli ölçüde insan ve kuş ölümüne sebep olmuştur [62]. İtalya gibi bazı ülkelerde her iki kökenin dolaşımı

saptanmıştır [63]. Bunların dışında Avrupa, Hindistan ve Rusya gibi ülkelerde yeni BNV kökenleri (köken 3-7) olduğu düşünülen izolatlar tanımlanmıştır [58].

Eskişehir bölgesinden rapor edilen enfekte atlardan birisinden yapılan virüs izolasyonu başarılı olmuş ve ilgili BNV izolatının (izolat T2) tüm genomu dizilenmiştir [4]. Elde edilen genom verileri, ilgili virüsün en yakın akrabasının 1967 yılında Orta Afrika Cumhuriyeti'nde izole edilen BNV ArB310/67 suşu olduğunu ortaya koymuş ve Türkiye'de bulunan BNV köken 1 izolatlarının Akdeniz Havzası, Doğu Avrupa ve Orta Doğu'da saptanan virüslerden farklı olduğunu göstermiştir. Takip eden yıllarda da Trakya ve İç Anadolu'dan BNV olgu bildirimleri yapılmış, saptanan virüslerin tamamı köken 1, soy 1a izolatlarına benzer olarak tanımlanmıştır [64], [65].

BNV'nin duyarlı konaklara bulaşmasında rol oynayan temel vektör, *Culex* cinsi sivrisineklerdir. Bununla birlikte farklı cinslerde birçok sivrisineğin de virüs replikasyonunu desteklediği ve vektör olarak işlev görebileceği bilinmektedir [66]. Avrupa'da *Cx. pipiens* s.l., *Cx. theileri*, *Cx. modestus* s.s., *Cx. univittatus*, *Aedes caspius* ve *Anopheles maculipennis* s.l., BNV vektörleri olarak kabul edilmekte ve bu türlerin bulaşmada rol oynadığı kabul edilmektedir [61]. *Cx.pipiens* s.l. Anadolu faunasında yaygın olarak bulunmaktadır ve vektör potansiyeli taşıdığı bilinen diğer sivrisinek türlerinin de bir kısmı ülkemizde saptanmıştır [1]. Ülkemizde BNV vektörü sivrisineklerin araştırıldığı çalışmalar az sayıdadır. Güneydoğu Anadolu bölgesinde, serolojik olarak virüsün tespit edildiği bir bölgede toplanılan örnekler *Cx. pipiens, Ae. caspius, ve Aedes spp.* olarak tiplendirilmiş, ancak viral antijen ya da RNA saptanmamıştır [67]. Benzer şekilde, 2010 salgınında izlenen olgularla ilişkili bölgelerden toplanılan, büyük kısmı *Cx. pipiens* s.l. olarak tanımlanmış örneklerde de virüs antijeni ve RNA'sını saptamaya yönelik çalışmalar negatif sonuç vermiştir [68]. Ankara bölgesinde yapılan bir diğer çalışmada da, *Cx. pipiens* s.l. ve diğer potansiyel vektör türler saptanmış ancak viral enfeksiyon yakalanamamıştır [69].

Türkiye kaynaklı sivrisineklerde BNV varlığı ilk defa 2012 yılında Edirne bölgesinde toplanan örneklerin incelenmesiyle gösterilmiştir [68]. Bu çalışmada

Ae. caspius (%90.9), *Cx. pipiens* s.l. (%4.7), *An. pseudopictus* (%3) ve *An. maculipennis* s.l. (%1.3) türlerinden oluşan 9261 incelenmiş; *Ae. caspius* ve *Cx. pipiens* s.l. havuzlarının sırasıyla %15.6 ve %36.3'sında BNV köken 1 soy 1a dizileri saptanmıştır. Elde edilen kısmi virüs dizileri ile Orta Anadolu kaynaklı diziler arasındaki %94.00-96.34 homoloji, sivrisinek ve omurgalı enfeksiyonları arasında dolaylı bağlantıya işaret etmiştir. Farklı bölgelerden elde edilen omurgalı ve sivrisinek örneklerinin incelendiği bir diğer çalışmada ise tüm Türkiye'de yaygın BNV maruziyeti gösterilmiş, Mersin bölgesinde toplanmış 3 *Cx. pipiens* s.l. ile Edirne bölgesi kaynaklı 1 *Ae. caspius* havuzunda BNV dizileri saptanmış, ayrıca Adana, Mersin ve Muğla illerinde atlarda viremi rapor edilmiştir [70]. Çalışmada viremik türler ve sivrisinek havuzlarında karakterize edilen tüm BNV dizileri, öncekilere yüksek düzeyde benzerlik gösteren köken 1 soy 1a olarak tanımlanmıştır. Son olarak Kırklareli ilinden 2014 yılında toplanmış bir *Cx. pipiens* s.l. havuzunda köken 1 soy 1a BNV saptanmıştır (izolat T8) [71]. Ancak çalışmada kullanılan saptama yöntemi, viral genomda daha önceki çalışmalardan farklı bir bölgeyi (NS5) hedeflemiş ve elde edilen dizinin analizlerinde, prototip Türkiye izolatı T2'ye göre %4'ü aşan varyasyon ile Amerika Birleşik Devletleri, Arjantin, İsrail ve Macaristan kaynaklı dizilerle daha yakın filogenetik ilişki gösterdiği saptanmıştır [71]. Bu durum, ülkemizde dolaşan BNV izolatlarının, daha önce kısmi zarf (E) geni dizilerine dayanan analizlerde saptanmayan bir genetik çeşitliliğe sahip olabileceğini işaret etmiştir. Yakın zamanda Marmara bölgesinde hasta bir tayda saptanan köken 2 dizileri, Türkiye'de BNV'nin önemli düzeyde genetik çeşitliliğe sahip olduğunu düşündürmektedir. Benzer bulgular İtalya ve İsrail gibi çeşitli Akdeniz çevresi ülkelerinden de rapor edilmiştir [63], [72].

BNV'nin aksine BÖFV'ler konusunda Türkiye adresli çalışmalar az sayıdadır. Ancak bazı virüslerin izole edilerek tanımlanması mümkün olmuştur. Bunların arasında Ege bölgesi'nde saptanan "*Cx. theileri* flavivirüsü-Türkiye (CTFT)" ve Trakya bölgesi'nde saptanan "*Aedes caspius* flavivirüsü-Türkiye" bulunmaktadır [71].

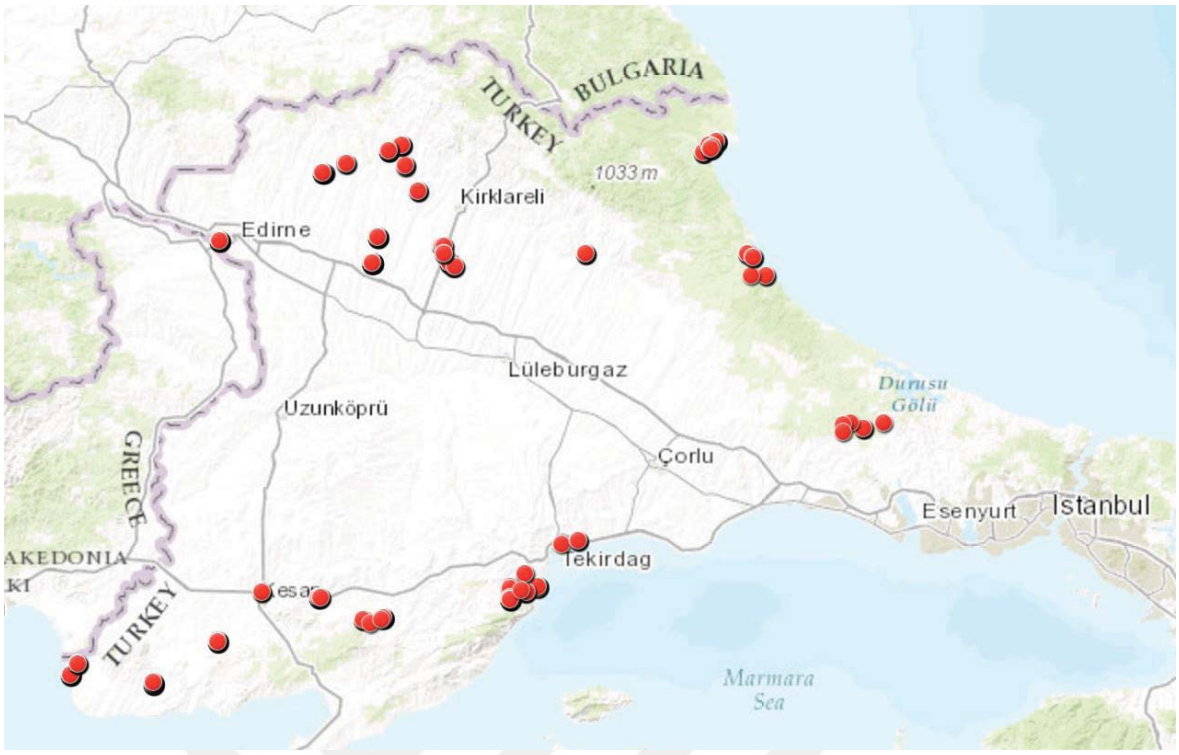
3. YÖNTEM

3.1. Arazi Çalışmaları

Bu tez çalışmasında kullanılan örnekler 2016 yılının Ağustos ve Eylül aylarında belirlenen lokalitelerden toplanmıştır (Şekil 4). Trakya bölgesi virüs rezervuarları ve konaklar açısından önemli bir bölge olduğu için arazi çalışmaları bu bölgedeki önemli şehirlerde planlanmıştır.

İstanbul ve Kırklareli şehirlerinden toplam 18 farklı lokaliteden 2016 yılı Ağustos ayında toplanan örnekler Dr. Sırrı Kar tarafından bağışlanmıştır. Ayrıca aynı yıl Eylül ayında Edirne ve Kırklareli'nin köylerinde bulunan toplam 20 farklı lokaliteden ekibimiz tarafından örnekler toplanmıştır. Ergin örneklemi akülü aspiratör, ışık tuzakları ve ağız aspiratörleri kullanılarak yapılmıştır. Tuzak lokaliteleri ve bu lokalitelere ait çevresel dış etmenlerinde kaydedildiği akıllı telefon ve tablet bilgisayarlarda kullanılabilen FASTFIELD adlı uygulama ile tüm veriler kaydedilmiştir [73].

Arazi çalışmasında toplanılan örnekler kuru buz üzerinde H. Ü. Biyoloji Bölümü Ekoloji Anabilim Dalı EBAL Labarotuvar'ına getirilmiştir. Örneklerin tür teşhisleri, uygun teşhis anahtarları, virüs RNA'sının korunması amacıyla, buz aküleri üzerinde uygun koşullarda yapılmıştır. Teşhis edilen örnekler moleküler çalışmaları yapmak üzere Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına götürülmüş ve moleküler çalışmalar yapılmıştır. Örnekler tuzak lokalitelerine göre maksimum 50 birey olacak şekilde havuzlanmıştır.



Şekil 4. Örnekleme yapılan lokaliteleri gösteren bölge haritası. (Her bir lokalite kırmızı nokta ile işaretlenmiştir.)

3.2. Laboratuvar Çalışmaları

3.2.1. Sivrisinek havuzlarında homojenizasyon ve nükleik asit saflaştırılması

Sivrisinek havuzları buz üzerinde tutularak, %5 fetal dana serumu, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin içeren Eagle's MEM (minimal essential medium) vasatı eklenmiş; 3-6 adet 4.5 mm tungsten boncuklar (QIAgen, Almanya) kullanılarak vortekslenmek suretiyle (Velp Rx3, İtalya) homojenize edilmiştir. Parçalanma sonrası örnekler 4.000 rpm'de 4 dakika santrifüjlenmiş (Hettich Mikro12-24, Almanya), süpernatan alikotlanmış ve RNA saflaştırması amacıyla kullanılmıştır.

Örneklerden nükleik asit saflaştırılması amacıyla, spin-kolon yöntemine dayanan ticari bir sistem oln High Pure Viral Nükleik Asit Kit (Qiagen, Almanya), üreticinin talimatları doğrultusunda uygulanmıştır.

High Pure Viral Nükleik Asit Kit (100) (Roche, Almanya) içeriği:

- High Pure Spin Kolonlar, 100 adet
- Tüpler (2 ml'lik), 1000 adet
- "Binding Buffer"
- "İnhibitor Removal Buffer"
- "Wash Buffer"
- Elution Buffer
- Poly A , Liyofilize
- Proteinaz K, Rekombinant, Liyofilize

High Pure Viral Nükleik Asit Kit (100) (Roche,ALMANYA) Çalışma Protokolü:

1. Liyofilize Poly A tüpün üzerine 500 µl elüsyon tamponu eklenir.
2. İnhibitör uzaklaştırma tamponu üzerine 20 ml %96-100 etanol eklenir.
3. Yıkama tamponu içerisine 40 ml %96-100 etanol eklenir.
4. Liyofize Proteinaz K üzerine 5 ml elüsyon tamponu koyulur.
5. Örnek başına 400 µl bağlama tamponu içerisine, 4 µl Poly A ve 50 µl Proteinaz-K karışımı eklenir ve ters-düz edilerek karıştırılır.
6. Hazırlanan bağlama tamponu içeren Poly-A karışımı 1,5 ml'lik tüplerin her birine 455 µl olacak şekilde dağıtılır.
7. Sivrisinek ekstratları tüplere 200 µl hacimde eklenir ve 15 saniye vortekslenir.
8. 72^{o}C de 10 dakika inkübe edilir ve spin santrifüj yapılır.
9. Spin-kolon filtreli tüpler hazırlanır ve her bir spin-kolon tüpüne 500 µl olacak şekilde inhibitör uzaklaştırma tamponu koyularak aktarılır. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir ve filtreli tüpler temiz tüplere aktarılır. Kirli tüpler atılır.

10. Üzerine 400 µl yıkama tamponu eklenir ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir, filtreli tüpler temiz tüplere aktarılır. Kirli tüpler atılır.

11. 10.adım tekrarlanır.

12. Alkolden arındırmak için boş tüpler 8000 rpm'de 1 dakika satrifüjlenir.

13. Filtreli tüplere 50 µl elüsyon tamponu eklenir ve 1 dakika inkübasyondan sonra 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir. Filtreli tüpler atılır, alta geçen sıvı ekstrakte edilen nükleik asidi içermektedir. Bir sonraki çalışma aşamasına kadar örnekler -80^{o}C derin dondurucuda saklanabilir. Çalışmalarımızda RNA parçalanmasını en aza indirmek amacıyla beklemeden komplementer DNA sentezi aşamasına geçilmiştir.Virüslere ait DNA formlarının saptanması amacıyla saflaştırılan RNA'lar alikotlanarak, komplementer DNA sentezi yapılmadan doğrudan polimeraz zincir reaksiyonuna alınmıştır.

3.2.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Ekstrakte edilen RNA'nın cDNA'ya çevrilmesi amacıyla ticari bir sistem olan "RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC, ABD)" kullanılmıştır. cDNA sentezi, elde edilen ürünlerin farklı hedeflerin taranmasına olanak vermesi amacıyla, random hekzamer primerleri ile gerçekleştirilmiştir.

<u>1 Örnek için cDNA Sentezi Protokolü:</u>

Distile su……..…..6 µl
Random primer……1 µl
RNA…….……...6 µl

- Protokolde gösterilen içerikler, 'verilen miktarlar X örnek sayısı' kadar karıştırılarak hazırlanır ve 0.2 ml'lik tüplere 7'şer µl dağıtılır.

- Üzerine 6 µl hedef RNA eklenir ve karışım 70^{o}C'de 5 dakika inkübe edilir.

- Başka bir tüpte aşağıdaki karışım hazırlanır ve inkübe edilen karışımın üzerine 7'şer µl dağıtılır.

Reaksiyon Tamponu (5X)…..……4 µl
10 mM dNTP……...…2 µl
Ters transkriptaz enzimi……1 µl

- Hazırlanan karışımlar termal döngü cihazına yerleştirilir ve 42°C'de 1 saat, 70°C'de 5 dakika inkübe edilir.

- Reaksiyon sonunda cDNA'lar elde edilmiş olur. Bir sonraki çalışma aşamasına kadar -80°C derin dondurucuda saklanır.

3.2.3. Örneklerinde Flavivirüs RNA'sının Araştırılması

Yapılan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) karışımı örnek başına, 2.4 mM $MgCl_2$, 0.6 mM dNTP ve her bir primerden 0.6 pmol olacak şekilde 1.5 ml'lik ependorf tüpünde PZR karışımı hazırlanmıştır (Çizelge 3). Toplam örnek sayısına göre hazırlanan karışım, vorteks cihazında karıştırılıp 3000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildikten sonra, her bir örnek için hazırlanan ve üzerinde numaraları yazılı steril 0.2 ml'lik PZR tüplerine 27 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra üstlerine 3'er µl c DNA örneği konulup ısı döngü cihazına (Techne® TC-3000, Techne Inc., ABD) yerleştirilmiştir (Çizelge 4). İkinci tur PZR karışımı için 1.turdan farklı olarak sadece primer dizileri değişmiştir. 2.tur PZR karışımında NS3 ve NS4 primerleri kullanılmıştır. 2. tur PZR karışımı hazırlanılıp, her bir örnek için 27 µl karışımdan alınarak PZR tüplerine dağıtılmıştır. Her bir tüpün üzerine 3 µl 1.tur PZR ürünü konulmuştur (Çizelge 5). PZR protokolünün birinci ve ikinci turları aynı sıcaklık döngüleri ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. İki turlu Flavivirüs PZR için kullanılacak jenerik primer dizileri ve BNV NY99-flamingo382–99 izolatı genomundaki yerleşimleri (GenBank ulaşım kodu:AF196835) [74].

1. Tur	**5' - GCATCTAYAWCAYNATGGG - 3'**	**(9035-9053 nt)**
	5' - CCANACNYNRTTCCANAC - 3'	**(10129-10146 nt)**
2. Tur	**5' - GCNATNTGGTWYATGTGG - 3'**	**(9103-9120 nt)**
	5' - CATRTCTTCNGTNGTCATCC - 3'	**(10103-10122 nt)**

*I:Inozin; M:A/C; N:A/T/G/C; R:A/G; Y:C/T; W:G/C

Çizelge 4. İki turlu flavivirüs 1.tur PZR için karışım içeriği ve reaksiyon koşulları

İçerik		Koşullar
10X Tampon	3 µl	94°C' de 5 dakika
$MgCl_2$ (25mM)	2.4 µl	94°C' de 1 dakika
dNTP (10mM)	0.6 µl	50°C' de 3 dakika — 40 döngü
NS1	0.6 µl	72°C' de 1 dakika
NS2	0.6 µl	72°C' de 10 dakika
Taq Polimeraz	0.3 µl	
DdH_2O	19.5 µl	
Kalıp DNA	3 µl	
Toplam hacim	30 µl	

Çizelge 5. İki turlu flavivirüs 2.tur PZR için karışım içeriği ve reaksiyon koşulları

İçerik		Koşullar
10X Tampon	3 µl	94°C' de 5 dakika
$MgCl_2$ (25mM)	2.4 µl	94°C' de 1 dakika
dNTP (10mM)	0.6 µl	50°C' de 3 dakika — 40 döngü
NS3	0.6 µl	72°C' de 1 dakika
NS4	0.6 µl	72°C' de 10 dakika
Taq Polimeraz	0.3 µl	
DdH_2O	19.5 µl	
1.tur PZR ürünü	3 µl	
Toplam hacim	30 µl	

Yukarıdaki protokoller doğrultusunda reaksiyon karışımı (10X Buffer, 25mM Mg^{+2}, Taq polimeraz 5U/µl, Biomatik, Wilmington, Delaware, ABD),(10 mM dNTP, Fermentas), hazırlanır ve tüpler termal döngü cihazına yerleştirilerek Çizelge 4'teki program çalıştırılır.

PZR işlemlerinde pozitif kontrol olarak Vero hücreleri (ATCC CCL81)'nde çoğaltılmış WNV NY99-4132 izolatı kullanılmıştır.

3.2.4. Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi

Agaroz Jelin Hazırlanması

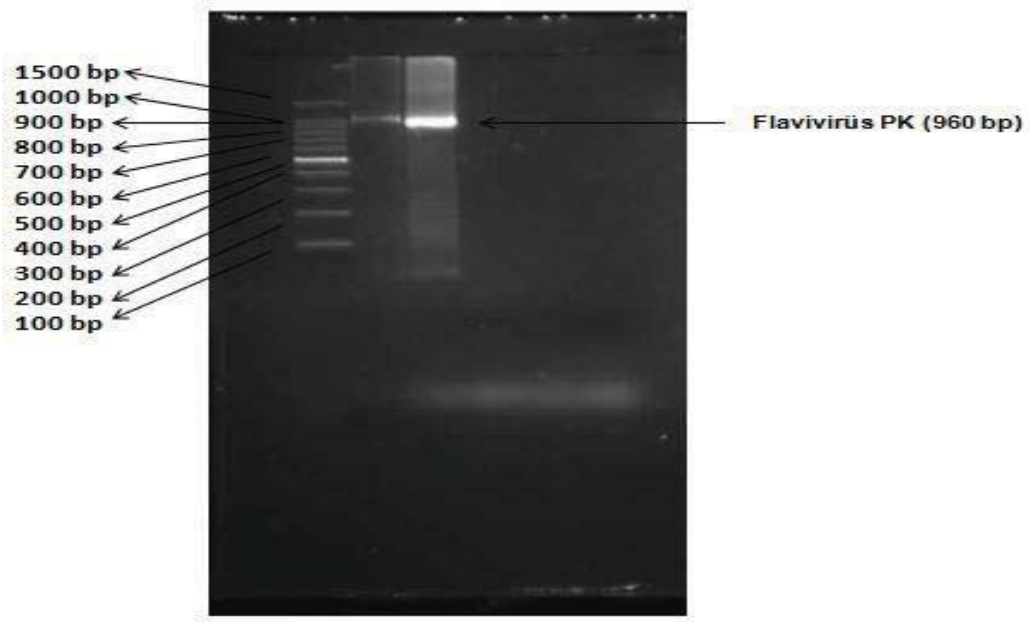
Stok 50X TAE (Tris-Baz-Asetik Asit-EDTA) solüsyonunun hazırlanması:

- Tris -Base 242 g (Applichem, Almanya)
- Asetik Asit 57.1 ml (Merck, Almanya)
- EDTA 100 ml 0,5 M (pH 8.0) (Applichem, Almanya)

Tris ve asetik asit 600 ml distile suda çözülerek üzerine 100 ml 0,5 M EDTA eklenmiş ve toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlanmış ve hazırlanan 50X TAE otoklavlanmıştır. Agaroz jelin hazırlanmasında ve yürütme tamponu olarak kullanılması sırasında 50X TAE stok solüsyonu, 1X'e çevrilerek kullanılmıştır.

1. Stok solüsyonu, 1X TAE'ye çevirilirken; 20 ml 50X TAE, 80 ml distile su içinde dilüe edilmiştir.
2. Jel için 1 gr agaroz tartılarak üzerine 50 ml 1X TAE eklenmiş, mikrodalga fırında agaroz çözününceye kadar ısıtılmıştır.
3. Agaroz çözünürken çok fazla kaynamamasına dikkat edilmiş, ısındıktan sonra soğutulmuş ve içerisine 2 µl etidyum bromür (10 mg/ml) eklenmiştir.
4. Hazırlanan jel, elektroforez tankının içindeki kalıba dökülmüş ve oda sıcaklığında jelin donması için 20 dk bekletilmiştir.
5. Jel donduktan sonra kalıp içindeki taraklar çıkartılmış ve elektroforez tankına yerleştirilerek jel yüzeyi kaplanana kadar 1X TAE tamponu ile doldurulmuştur.
6. Örneklerden 5 µl alınarak 1.5 µl yükleme tamponu (Orange G, DNA loading dye) ile pipetaj yapılarak karıştırılmış ve son kuyucuk boş bırakılarak diğer kuyucuklara 6.5'ar µl dağıtılmıştır.

7. Son kuyucuğa ölçek olarak kullanmak amacıyla 100-1500 baz çifti aralığına sahip 'DNA ladder' yüklenmiştir.
8. Güç kaynağı çalıştırılarak (Owl Lightning Volt OSP-300, ABD) 100 Voltta 25-30 dakika yürütülmüştür.
9. Yürütme işlemi bittikten sonra jel UV ışığında görüntülenmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. Flavivirüs PZR agaroz jel görüntüsü (bp: baz çifti)

3.2.5. Sivrisineklerde tespit edilen flavivirüslerin tanımlanması

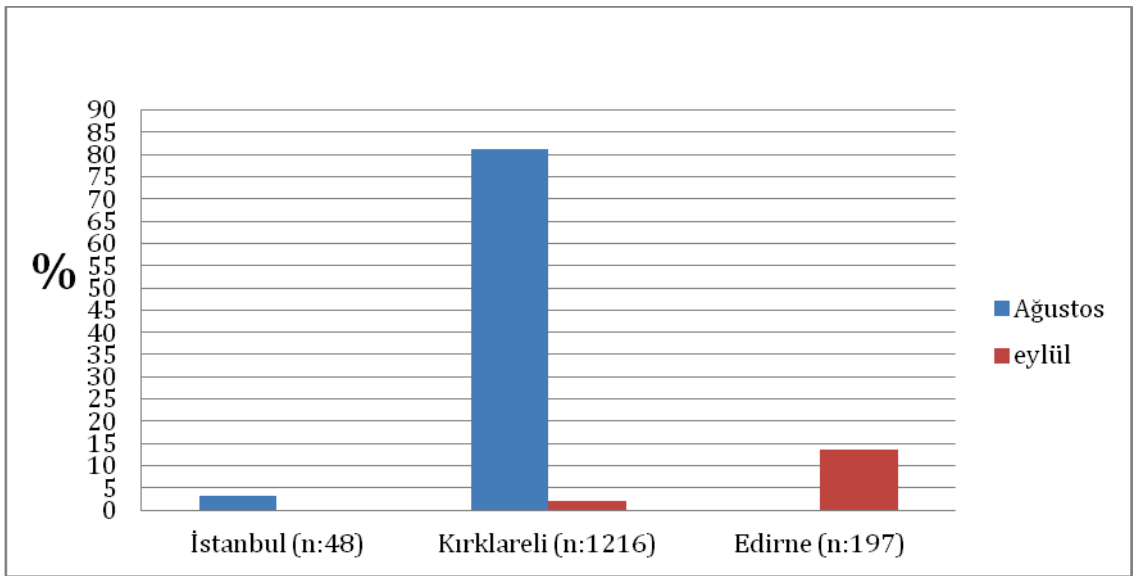
Elektroforez ile beklenen büyüklükte PZR ürünü tespit edilen örneklerde tanımlama, ikinci tur kaynaklı amplikonların her iki amplifikasyon primeri ile çift yönlü DNA dizi analizi ile gerçekleştirilmiştir. DNA dizi analizi çalışmaları hizmet alımı yöntemiyle tamamlanmıştır. Elde edilen ham dizilerin birleştirilmesi, işlenmesi ve analizinde açık erişim yazılımlar olan Bioedit (versiyon 7.0.9.0) [75] ve MEGA (versiyon 6.06) [76] programları kullanılmıştır. Nükleotid ve kodlanan protein taramaları, Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüleri Gen Bankası (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) veritabanı ve araçları kullanılarak yapılmıştır. Dizi benzerlik araştırmaları için Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon web sitesi üzerinden BLAST algoritmaları BLASTn, MEGABLAST, BLASTx ve BLASTp kullanılmıştır [77]. Nükleotid ve protein

hizalamaları ve dizi karşılaştırmaları, Bioedit paketi içerisinde yer alan CLUSTAL W yazılımı [78] kullanılarak yapılmıştır. Filogenetik ve moleküler evrimsel analizler için en uygun modellerin belirlenmesi amacıyla, MEGA yazılımı kapsamında bulunan “Find best DNA/protein-substitution model” aracı kullanmıştır. Filogenetik analizlerde “Maximum likelihood” yöntemi kullanılmış, nükleotid ve protein bazlı ağaçlar “Tamura-Nei” ve “Jones-Taylor-Thornton” modelleri kullanılarak, 1000 replikasyon için “bootstrap” analizi ile oluşturulmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Toplanan örnek sayısı ve dağılımı

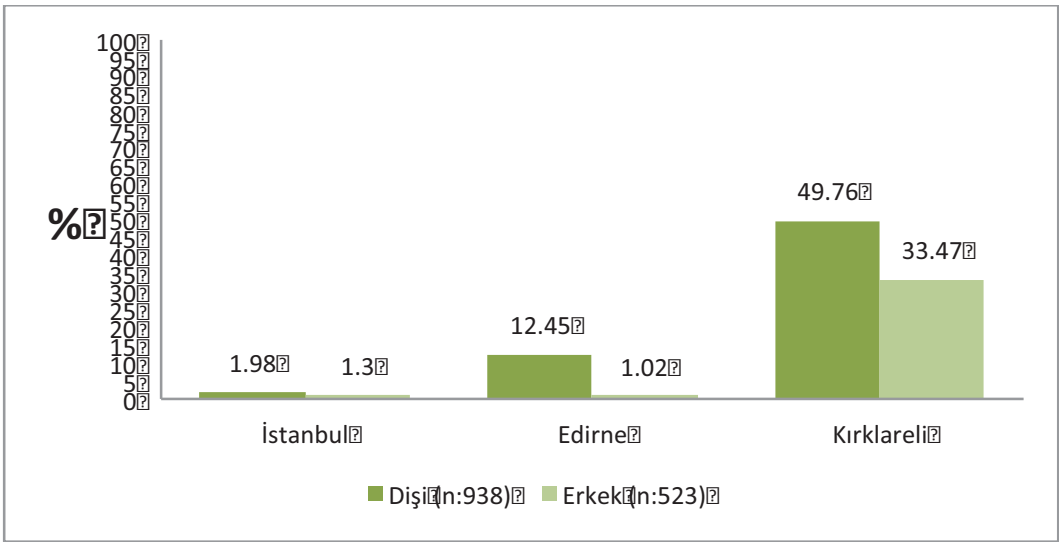
Trakya bölgesinde Ağustos ve Eylül 2016 aylarında yapılan örneklemelerde, toplam 38 lokaliteden toplam 1461 sivrisinek toplanmıştır. Ağustos ayında yapılan örneklemelerde toplam sivrisinek sayısı 1236 (%84,60), Eylül ayında yapılan örneklemelerde toplam sivrisinek sayısı 225 (%1,71) olarak saptanmıştır (Şekil 6).



Şekil 6. Örnekleme süresince aylara göre şehirlerden toplanan sivrisinek dağılımı

Örnekleme boyunca iki ayda toplanan 1461 sivrisineğin 48'i (%3,28) İstanbul bölgesinden, 1216'sı (%83,23) Kırklareli bölgesinden, 197'si (%13,4) Edirne bölgesinden toplanmıştır. Şehirlere göre sivrisinek sayıları Şekil 6'da gösterilmektedir.

Yapılan arazi çalışmaları süresince toplanan 1461 sivrisineğin cinsiyet dağılımları 938 dişi (%64,2) ve 523 erkek (%35,8) olarak saptanmıştır (Şekil 7). Laboratuvarda yaptığımız tür tayini sonucunda toplam 12 farklı sivrisinek türü tespit edilmiştir. Bölgede en yaygın olarak bulunan türler Çizelge 6' da verilmiştir.



Şekil 7. Toplanan sivrisineklerin bölgelere göre cinsiyet dağılımı

Çalışmamızda toplam 1461 sivrisinek örneği, 104 havuz içerisinde incelemeye alınmıştır. İncelenen türler arasında en sık saptanan *Cx. pipiens s.l.* olmuş (%54,4); bunu *Anopheles maculipennis s.l.* (%25,66), *Aedes albopictus* (%6,09) ve *Aedes caspius* (%5,68) takip etmiştir (Çizelge 6).

Çizelge 6. Bölge ve örnekleme zamanına göre sivrisinek dağılımı

	AĞUSTOS						EYLÜL								
	İSTANBUL			KIRKLARELİ			EDİRNE			KIRKLARELİ					
TÜRLER	Dişi	erkek	%	Dişi	erkek	%	Dişi	erkek	%	Dişi	erkek	%	Türler	%	Havuz
Aedes albopictus	0	0	0	79	4	6,98	0	0	0	6	0	21,4	89	6,09	6
Aedes caspius	0	0	0	16	0	1,34	64	0	32,4	3	0	10,71	83	5,68	11
Anopheles claviger	1	0	2,08	14	0	1,17	0	0	0	0	0	0	15	1,02	4
Anopheles hyr. var. pseudopictus	0	0	0	2	0	0,16	0	0	0	0	0	0	2	0,13	1
Anopheles hyrcanus s.s.	0	0	0	1	0	0,08	0	0	0	0	0	0	1	0,06	1
Anopheles maculipennis s.l.	26	17	89,5	277	26	25,5	24	5	14,7	0	0	0	375	25,66	26
Anopheles plumbeus	0	0	0	4	0	0,33	0	0	0	0	0	0	4	0,27	3
Coquillettidia richiardii	0	0	0	26	0	2,18	0	0	0	0	0	0	26	1,77	2
Culex pipiens s.l	2	2	8,33	254	451	59,3	62	9	36	10	1	39,2	791	54,14	39
Culex theileri	0	0	0	0	0	0	28	1	14,7	0	0	0	29	1,98	5
Culiseta annulata	0	0	0	0	0	0	2	0	1,01	0	0	0	2	0,13	2
Uranotaenia unguiculata	0	0	0	34	0	2,86	2	0	1,01	1	7	28,5	44	3,01	4
TOPLAM	29	19	100	707	481	100	182	15	100	20	8	100	1461	100	104

4.2. Sivrisinek Örneklerinde Flavivirüs İncelemeleri

İncelenen sivrisinek havuzlarının %5.76'sında (6/104) ön değerlendirmelerde BÖFV olarak tanımlanan diziler saptanmıştır. Diziler 3 *Ur. unguiculata,* 1 *Ae. caspius*, 1 *An. maculipennis* s.l. ve 1 *Cx. pipiens* s.l. içeren havuzlarda tespit edilmiştir (Çizelge 7). BÖFV dizileri *Ur. unguiculata* havuzlarının %2.85'i (3/104), *Ae. caspius* havuzlarının %0,01'i (1/104), *An. maculipennis* s.l. havuzlarının %0,01'i, (1/104) ve *Cx. pipiens* s.l. havuzlarının %0,01'i (1/)'inde saptanmıştır.

Çizelge 7. Flavivirüs pozitif olarak izlenen havuzların özellikleri

Örnek numaraları	Konum	Yükseklik (m)	Koordinatlar		Tarih	Örnek sayısı	Türler	Saptanan Virüsler
TK698	Kırklareli	2	41,883825	27,991461	10/08/16	58	*Culex pipiens* s.l.	Bilinmeyen flavivirüs
TR366	Edirne	196	41,814912	26,816839	08/09/16	2	*Uranoteania unguiculata*	Bilinmeyen flavivirüs
TR370	Edirne	103	41,614347	26,966446	09/09/16	7	*Anopheles maculipennis* s.l.	Anofeles flavivirüs
TR379	Kırklareli	7	41,869730	27,975023	10/09/16	6	*Uranoteania unguiculata*	Bilinmeyen flavivirüs
TR380	Kırklareli	7	41,869792	27,974980	10/09/16	2	*Uranotaenia unguiculata*	Bilinmeyen flavivirüs
TR381	Kırklareli	23	41,874105	27,981692	10/09/16	3	*Aedes caspius*	Bilinmeyen flavivirüs

Edirne ve Kırklareli çevresinden toplanmış, farklı türleri içeren toplam beş havuzda (havuz kodları: TK698, TR366, TR379, TR380, TR381), 575-875 bç'lik diziler elde edilmiştir. Saptanan dizilerde nükleotid ve amino asit dizilerinde sırasıyla %0.4-0.9 ve %0.6-1.6 çeşitlilik izlenmiştir. BLASTn taramaları, tüm dizilere en yüksek benzerlik gösteren GenBank girişlerinin, ülkemizde Edirne bölgesinde *Ur. unguiculata* türü sivrisinekte saptanmış olan ancak kesin olarak tanımlanamamış bir flavivirüs olduğunu göstermiştir (kod: T5, GenBank erişim kodu: KU958267) [71]. Ayrıca İspanya'da *Ae. vexans* türü sivrisineklerde DNA formunda saptanmış Flavivirüs AV-2011 (GenBank erişim kodları: JF707859 ve JF707860) ile aynı olduğu gözlenmiştir [79]. Flavivirüs AV-2011 dizileri ayrıca, ülkemizde Kırklareli çevresinde 2014 yılında toplanmış *Cs. annulata* örneklerinde RNA formunda da saptanmıştır (kod: T11, GenBank erişim kodu: KU958176) [71]. Adı geçen dizilerin nükleotit ve kodlanan amino asit karşılaştırmaları Çizelge 8 ve 9'da verilmektedir.

Çizelge 8. Saptanan Flavivirüs AV-2011 ve benzeri dizilerin nükleotit (422 bç) karşılaştırma matrisi. Benzerlikler yüzde olarak verilmektedir (T11:KU958176, T5:KU958167).

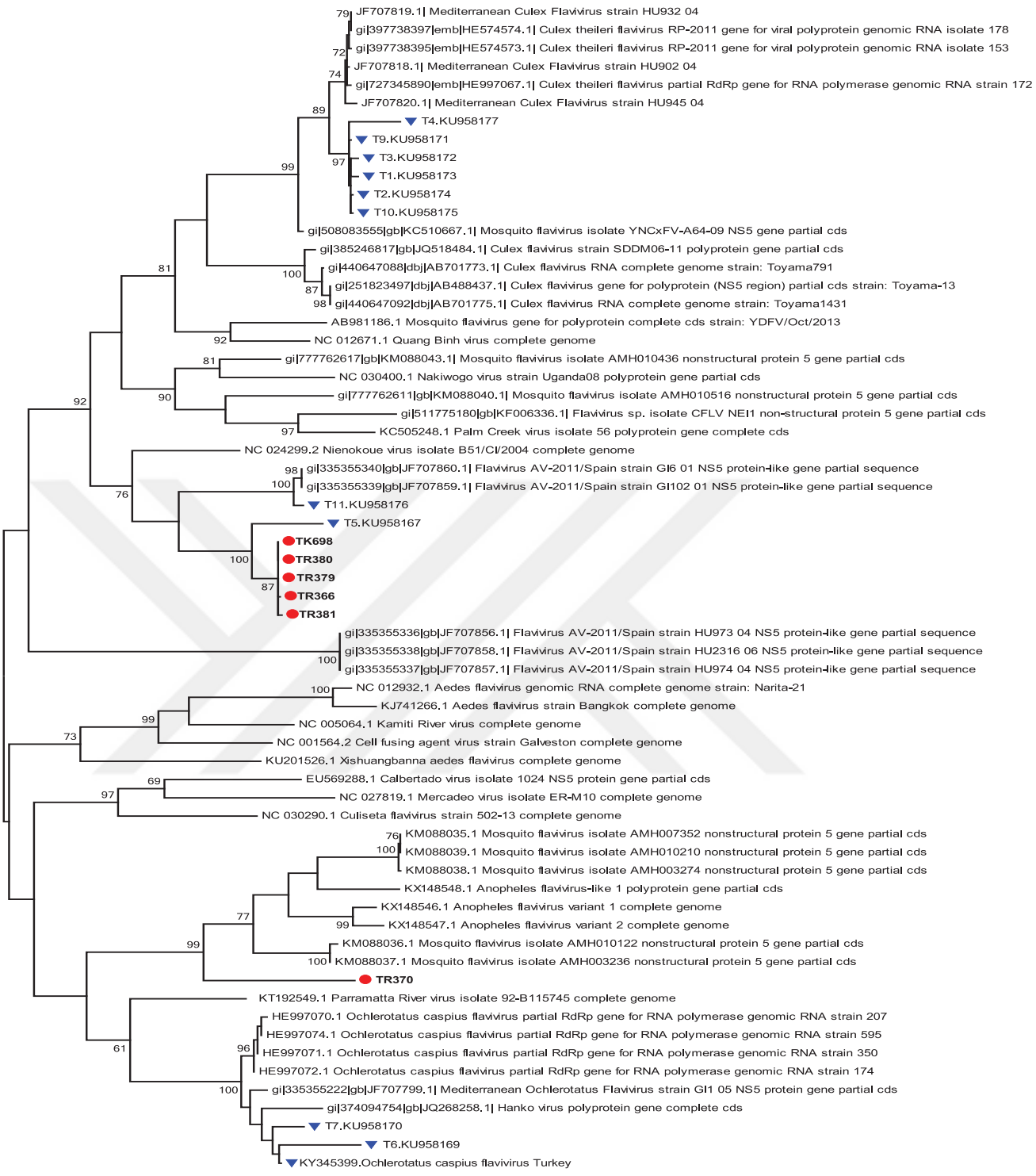
	AV2011*	T11	T5	TR366	TR379	TK698	TR380	TR381
AV2011*	-	97.3	68.2	73.9	73.6	73.6	73.6	73.6
T11	97.3	-	68.9	74.4	74.1	74.1	74.1	74.1
T5	68.2	68.9	-	86.4	86.7	86.7	86.7	86
TR366	73.9	74.4	86.4	-	99.7	99.7	99.7	99
TR379	73.6	74.1	86.7	99.7	-	100	100	99.2
TK698	73.6	74.1	86.7	99.7	100	-	100	99.2
TR380	73.6	74.1	86.7	99.7	100	100	-	99.2
TR381	73.6	74.1	86	99	99.2	99.2	99.2	-

* JF707859 ve JF707860 kodlu eş diziler

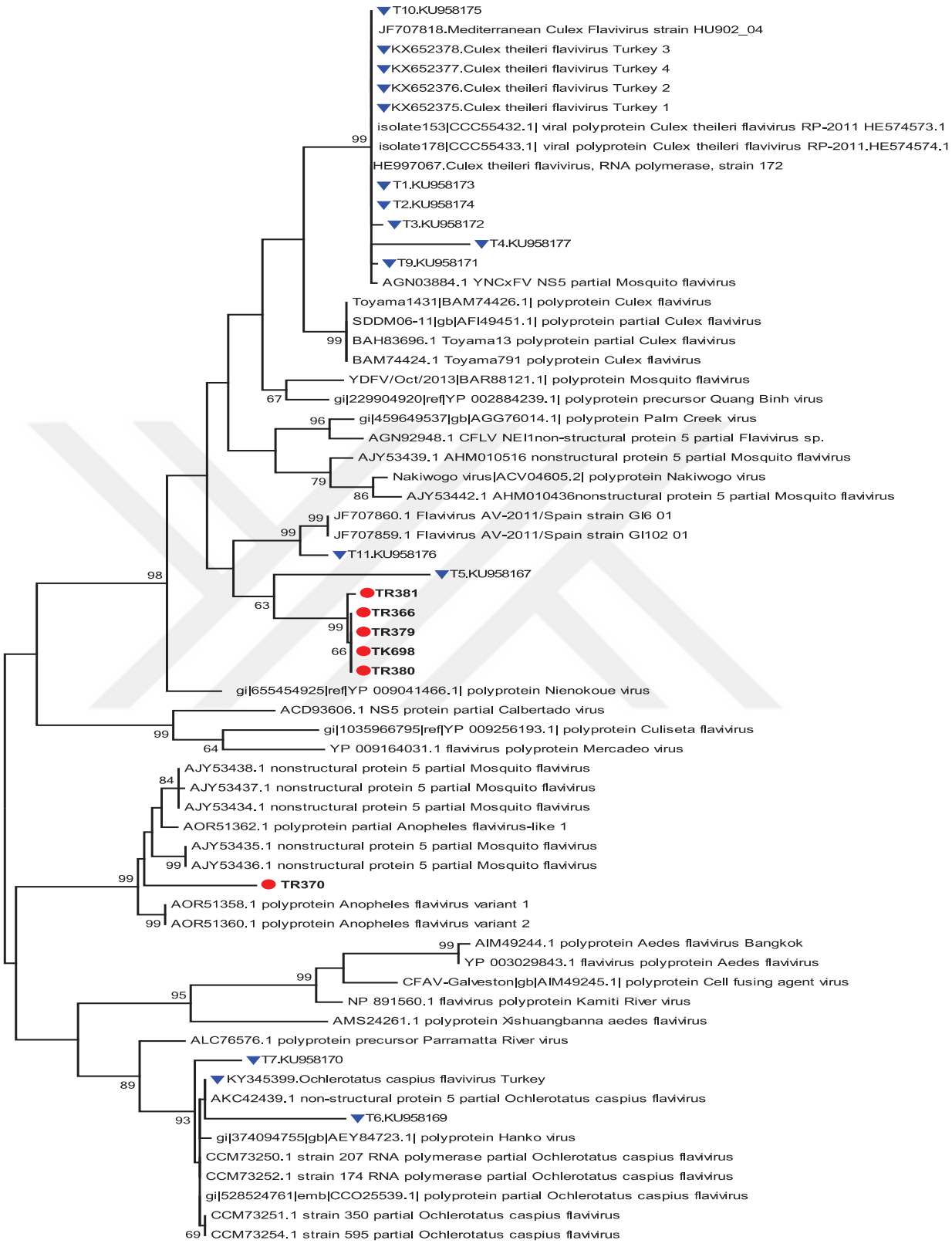
Çizelge 9. Çalışmada saptanan Flavivirüs AV-2011 ve benzeri dizilerin amino asit (140 amino asit) karşılaştırma matrisi. Benzerlikler yüzde olarak verilmektedir (T11:KU958176, T5:KU958167).

	AV2011*	T11	T5	TR366	TR379	TK698	TR380	TR381
AV2011*	-	89.2	64.2	75.5	75.5	75.5	75.5	75.5
T11	89.2	-	67.1	74.8	74.8	74.8	74.8	74.8
T5	64.2	67.1	-	74.2	74.2	74.2	74.2	72.8
TR366	75.5	74.8	74.2	-	100	100	100	98.5
TR379	75.5	74.8	74.2	100	-	100	100	98.5
TK698	75.5	74.8	74.2	100	100	-	100	98.5
TR380	75.5	74.8	74.2	100	100	100	-	98.5
TR381	75.5	74.8	72.8	98.5	98.5	98.5	0,98.5	-

* JF707859 ve JF707860 kodlu eş diziler



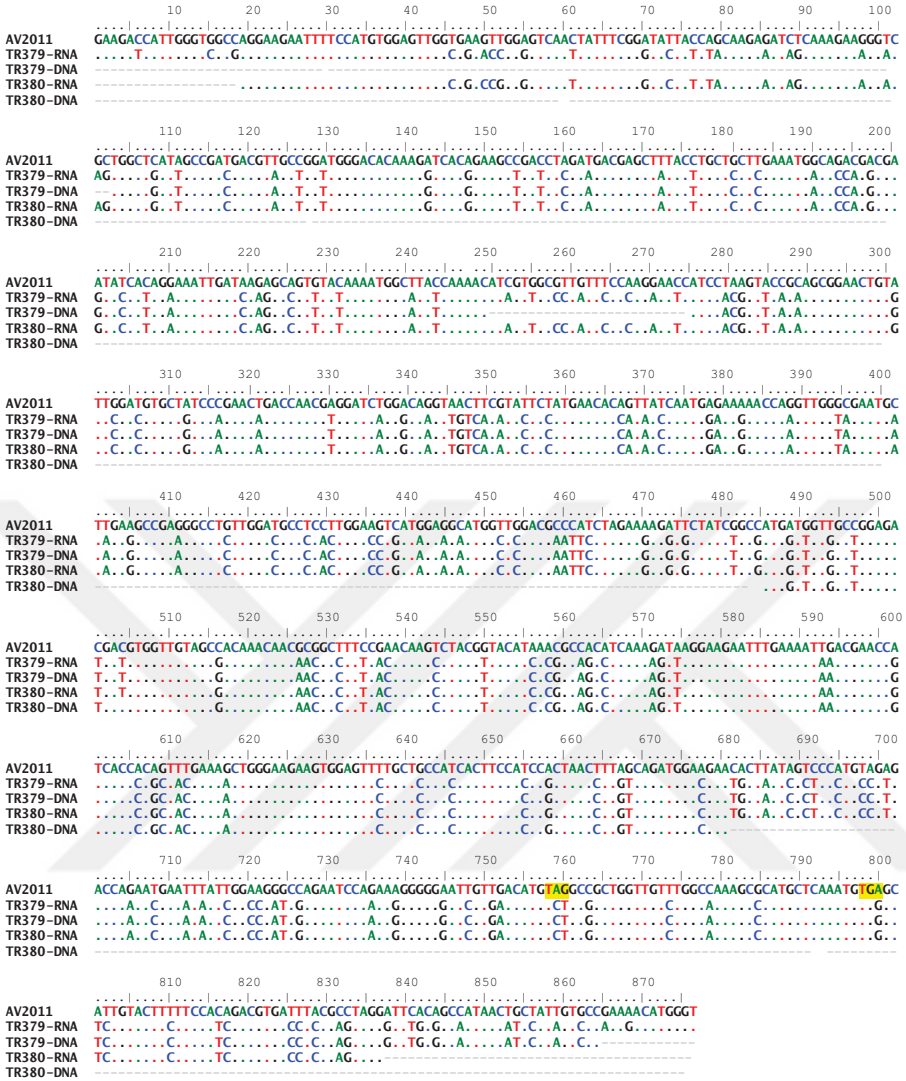
Şekil 8. TK698, TR366, TR379, TR380, TR381 ve TR370 kodlu havuzlarda saptanan kısmi flavivirüs nükleotit dizilerinin analizi. Filogenetik ağaç "Maximum likelihood" yöntemi ve "Tamura-Nei" modeli ile oluşturulmuştur. "Bootstrap" değerleri ağaçta gösterilmiş ve 1000 replikasyon için hesaplanmıştır. Karşılaştırmada kullanılan virüslar GenBank ulaşım kodları ve izolat isimleri ile belirtilmiştir. Ülkemizden rapor edilen diziler ilgili kaynak ve GenBank ulaşım kodları ile belirtilmiştir (kırmızı daire: Çalışmada elde edilen dizi; mavi ters üçgen: Türkiye kaynaklı diziler)



Şekil 9. TK698, TR366, TR379, TR380, TR381 ve TR370 kodlu havuzlarda saptanan kısmi flavivirüs amino asit dizilerinin analizi. Filogenetik ağaç "Maximum likelihood" yöntemi ve "Jones-Taylor-Thornton" modeli ile oluşturulmuştur. "Bootstrap" değerleri ağaçta gösterilmiş ve 1000 replikasyon için hesaplanmıştır.

Karşılaştırmada kullanılan virüslar GenBank ulaşım kodları ve izolat isimleri ile belirtilmiştir. Ülkemizden rapor edilen diziler ilgili kaynak ve GenBank ulaşım kodları ile belirtilmiştir (kırmızı daire: Çalışmada elde edilen dizi; mavi ters üçgen: Türkiye kaynaklı diziler)

Örneklerde muhtemel DNA formlarının araştırılması amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda, doğrudan saflaştırılmış nükleik asitler üzerinden uygulanan PZR, TR379 ve TR380 kodlu örneklerde pozitif sonuç elde edilmiştir. Takip eden dizi analizlerinde ancak kısmi okumalar elde edilmiş, TR379 kodlu örnekte 736 nükleotid, TR380 kodlu örnekte ise 196 nükleotidlik kısımlar tanımlanabilmiştir. Yapılan hizalama ve incelemelerde, örnek TR379 için DNA formunda bulunan dizinin 25 nükleotitlik bir boşluk içerdiği ancak dizi kompozisyonunun RNA formu ile %100 uyumlu olduğu görülmüştür. Örnek TR380 için ise DNA formunda bir nükleotitlik değişiklik (pozisyon 504; T-C; Şekil 10) saptanmıştır. Bu değişiklik Flavivirüs AV2011 dizilerinde de bulunmaktadır (Şekil 10). İlginç olarak, prototip dizilerde (JF707859 ve JF707860) yer alan “stop” kodonları, saptanan RNA ya da DNA formundaki dizilerde bulunmamaktadır (Şekil 10).



Şekil 10. Flaviviral DNA formu saptanan örneklerde elde edilen dizilerin RNA formu dizileri ve prototip DNA formu dizisi (AV2011) ile karşılaştırılması. Prototip dizide bulunan "stop" kodonları (757 ve 796. pozisyonlar, işaretli), saptanan dizilerde yer almamaktadır.

Edirne bölgesinden toplanan ve *Anopheles maculipennis* s.l. örnekleri içeren bir havuzda (havuz kodu: TR370) saptanan 598 nükleotidlik dizide BLASTn taraması, elde edilen dizinin, Kenya, Liberya ve Senegal'de toplanan çeşitli *Anopheles* sivrisineklerinde yeni tanımlanmış flavivirüslere (GenBank erişim kodları: KX148546-7, KM088035-9) benzerliğini ortaya koymuştur [80], [81]. En yüksek düzey benzerliğin Anofeles flavivirüsu varyant 1 ve benzeri izolatla olduğu izlenmektedir (nükleotit düzeyinde %70.4, amino asit düzeyinde %81.3, Çizelge 10

ve 11). Filogenetik analizler, Türkiye kökenli Anofeles flavivirüsunun, Afrika kökenli dizilerden farklılaşmış olduğu ancak ortak ata paylaştığını işaret etmektedir (Şekil 8 ve 9). Örnekte cDNA sentezi yapılmadan gerçekleştirilen PZR negatif sonuç vermiştir.

Çizelge 10. Çalışmada saptanan Anofeles flavivirüslarının nükleotid (598 bç) karşılaştırma matrisi. Benzerlikler yüzde olarak verilmektedir (AFvar1: Anofel flavivirüsu varyant 1 (KX148546); AFvar2: Anofel flavivirüsu varyant 2 (KX148547); AFvar1L: Anofel flavivirüsu varyant 1- benzeri virüs (KX148548); A7352: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH007352 (KM088035); A0210: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH010210 (KM088039); A0122: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH010122 (KM088036); A3236: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH003236 (KM088037); A3274: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH003274 (KM088038)).

	TR370	AFvar1	AFvar2	AFvar1L	A7352	A0210	A0122	A3236	A3274
TR370	-	70.4	69.2	69.8	67.7	67.8	68.5	68.8	68
AFvar1	70.4	-	94.3	79	78.5	78.7	76.5	76.7	78.5
AFvar2	69.2	94.3	-	78.2	78	77.9	78	77.7	77.7
AFvar1L	69.8	79	78.2	-	79.7	79.9	77.4	77	79.7
A7352	67.7	78.5	78	79.7	-	99.8	76.5	76.7	99.3
A0210	67.8	78.7	77.9	79.9	99.8	-	76.5	76.7	99.4
A0122	68.5	76.5	78	77.4	76.5	76.5	-	99.1	76.9
A3236	68.8	76.7	77.7	77	76.7	76.7	99.1	-	77
A3274	68	78.5	77.7	79.7	99.3	99.4	76.9	77	-

Çizelge 11. Çalışmada saptanan Anofeles flavivirüslarının amino asit (198 amino asit) karşılaştırma matrisi. Benzerlikler yüzde olarak verilmektedir (AFvar1: Anofel flavivirüsu varyant 1 (KX148546); AFvar2: Anofel flavivirüsu varyant 2 (KX148547); AFvar1L: Anofel flavivirüsu varyant 1- benzeri virüs (KX148548); A7352: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH007352 (KM088035); A0210: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH010210 (KM088039); A0122: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH010122 (KM088036); A3236: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH003236 (KM088037); A3274: Sivrisinek flavivirüsu izolat AMH003274 (KM088038)).

	TR370	AFvar1	AFvar2	AFvar1L	A7352	A0210	A0122	A3236	A3274
TR370	-	80.3	80.3	81.3	78.7	78.7	78.2	78.2	78.2
AFvar1	80.3	-	100	90.9	91.4	91.4	91.9	91.9	90.9
AFvar2	80.3	100	-	90.9	91.4	91.4	91.9	91.9	90.9
AFvar1L	81.3	90.9	90.9	-	93.4	93.4	91.9	91.9	92.9
A7352	78.7	91.4	91.4	93.4	-	100	91.4	91.4	99.4
A0210	78.7	91.4	91.4	93.4	100	-	91.4	91.4	99.4
A0122	78.2	91.9	91.9	91.9	91.4	91.4	-	100	91.9
A3236	78.2	91.9	91.9	91.9	91.4	91.4	100	-	91.9
A3274	78.2	90.9	90.9	92.9	99.4	99.4	91.9	91.9	-

Şekil 11. Elde edilen Anofeles flavivirüs dizisinin, Afrika kökenli Anofeles flavivirüsu varyantları ile hizalanması. İncelenen bölge Anofeles flavivirüsu varyant 1 genomunda 9049-9641. nükleotidlere karşılık gelmektedir (AFvar1: Anofel flavivirüsu varyant 1 (KX148546); AFvar2: Anofel flavivirüsu varyant 2 (KX148547); AFvar1L: Anofel flavivirüsu varyant 1- benzeri virüs (KX148548)

5. TARTIŞMA

Sivrisinekler, birçok insan patojeni mikroorganizma için vektör rolü oynamaktadır. Vektör sivrisineklerin, hastalık etkenleriyle yaşam boyunca enfekte kalarak, bu patojenleri ara konaklar ve diğer yollarla bir başka sivrisineğe kadar aktarabilmeleri, hastalık epidemiyoloji ve kontrolü açısından önemli güçlüklere neden olmaktadır [11], [14]. *Flaviviridae* ailesi *Flavivirüs* cinsi, sivrisineklerle bulaşma gösteren birçok vektör kaynaklı virüsu içermektedir. Bunlar; Batı Nil, Deng, Zika örneklerinde olduğu gibi, tüm dünyada önemli sağlık sorunu oluşturmuş ve oluşturmaya devam eden virüslerdir [14], [16]. Belirli bir bölgede hastalık varlığı, olguların birikimi ya da salgın ihtimalinin öngörülebilmesi ve epidemiyolojik özelliklerin incelenebilmesi için, vektör kaynaklı enfeksiyonlarda eklembacaklıların sürveyansı önem taşımaktadır. Sürveyans yoluyla incelenen bölgede patojenlerin varlığı kadar, vektör potansiyeline sahip eklembacaklıların belirlenmesi, patojenik olmayan mikroorganizmaların ve bunların hastalık döngülerine katkılarının belirlenebilmesi hastalık süreçlerinin anlaşılabilmesi açısından da önemlidir. Çalışmamızda daha önceden Batı Nil virüsü olgularının saptandığı, ayrıca çeşitli BÖFV'lerin ilk kez rapor edildiği Trakya bölgesinden toplanan sivrisinek örneklerinde, generik PZR yöntemiyle flavivirüs varlığı araştırılmış, saptanan virüsler ise DNA dizi analizi ile tanımlanarak elde edilen bulgular tartışılmıştır.

BÖFV çalışmaları ülkemizde çok kısıtlı sayıdadır, buna karşın çeşitli virüslerin varlığı gösterilmiş ve izolasyonları yapılabilmiştir [71], [82], [83], [65]. Edirne çevresinde sivrisineklerde BNV varlığının gösterildiği ilk çalışmada kullanılan tarama yöntemi BÖFV'leri de saptama özelliğine sahiptir. Bu nedenle, bu çalışma, bu virüslerin incelendiği ilk rapor olarak kayıda geçmiştir. Ancak daha öncede belirtildiği gibi çalışmalar sonucunda herhangi bir pozitiflik saptanamamıştır [83]. Takip eden çalışmada ise Akdeniz, Ege ve Trakya bölgesi kaynaklı sivrisinekler incelenmiş, Ege ve Trakya örneklerinde en az 3 farklı BÖFV varlığı gösterilmiş, ayrıca 2 virüs hücre kültürlerinde izole edilerek genomik karekterizasyonları yapılmıştır [71]. Bu virüsler arasında Kırklareli ve Çanakkale illerinden toplanan örneklerde izole edilen "*Cx. theileri* flavivirüsü-Türkiye (CTFT)" bulunmaktadır [65].

CTFT'ye ait 4 farklı izolat tanımlanmış, bu virüslerin Portekiz'de izole edilen ve İspanya'da kısmi diziler şeklinde tespit edilen virüslere benzerliği ortaya konulmuştur [65]. CTFT dizileri *Cx. theileri* ve *Cx. pipiens* s.l. türü sivrisineklerde saptanmaktadır. İzolasyonu yapılan bir diğer virüs ise, yine Portekiz, İspanya ve Yunanistan gibi Akdeniz çevresi ülkelerde ve Finlandiya'da benzerleri saptanmış olan "*Aedes caspius* flavivirüsü-Türkiye"dir (OCFT) [71]. Bu virüsün de Kırklareli ili çevresinde *Ae. caspius* sivrisineklerinde bulunduğu gösterilmiştir. CTFT ve OCFT'nin genomları ayrıntılı oarak incelenmiş, farklı bölgelerde tespit edilen benzerleri ve diğer BÖFV'ler ile karşılaştırmaları yapılmıştır. Bu çalışmada ise taranan sivrisinek havuzlarında CTFT ya da OCFT izlenmemiştir.

Çalışmamızda saptadığımız BÖFV'lerden ilki, Anofeles flavivirüsleri ile ilişkili diziler şeklinde tanımlanmıştır (Çizelge 10). Anofeles flavivirüsleri yakın zamanda viral metagenomik araştırmalar sırasında Liberya ve Senegal'de *Anopheles gambiae* sivrisineklerinde tespit edilmiş; incelenen örneklerde virüs varyantları saptanmış, ayrıca yapılan taramalar, virüsün farklı bölge ve yıllarda dolaşımda bulunduğunu göstermiştir [80]. Bu virüslerin bir diğer özelliği anofelin sivrisineklerde saptanan ilk flavivirüsler olmalarıdır. Rapor edilen yüksek düzey çeşitliliğine rağmen, tanımlanan BÖFV'lerin hepsi culicine sivrisineklerinde tespit edilmiştir [82]. Anofeles flavivirüsü ile ilişkili diziler Kenya kaynaklı *An. gambiae* ve *An. squamosus* sivrisineklerinde de gösterilmiştir [80]. Çalışmada tespit ettiğimiz Anofeles flavivirüsü dizisi Edirne ili çevresi kaynaklı *An. maculipennis* s.l. örnekleri içeren bir havuzda saptanmıştır (Çizelge 10-11) ve bu türde ilk kez gösterilmektedir. Dizi karşılaştırmaları, bunların, Anofeles flavivirüsu varyant 1 ve ilişkili izolatları saptanan diziye en yakın virüsler olduğunu ortaya koymaktadır. Filogenetik analizler, Türkiye kökenli Anofeles flavivirüsu dizisinin, Afrika kökenli dizilerden farklılaşmış olduğuna işaret etmektedir (Şekil 11). Flavivirüs cinsinde herhangi bir izolatın ayrı bir tür olarak kabulü için genom dizileri ve serolojik özellikler önemlidir [22]. Bununla birlikte, birçok virüsun kolayca üretilememesi ve nötralizasyon yöntemlerinin güçlükleri nedeniyle, çoğu izolat için tam ya da tama yakın genom dizileri kullanılmaktadır. Yaygın görüşe göre, nükleotit düzeyinde %16'ı aşan çeşitlilik, ilgili virüsü tür olarak tanımlamak için yeterlidir [82]. Elde ettiğimiz Anofeles flavivirüsü dizileri, Afrika kökenli dizilerden nükleotit düzeyinde %29.4, amino asit düzeyinde ise %18.7 farklılık göstermektedir (Çizelge 10-11);

dolayısıyla yeni bir virüs adayıdır. Bu görüşün doğrulanması için virüse ait kodlama yapan bölgesinin önemli bir kısmına ait diziler tanımlanmalıdır. Anofeles flavivirüsü dizilerinin dişi bireyleri içeren havuzlarda saptanmış olması nedeniyle, virüsün insanlar başta olmak üzere çeşitli omurgalılarla temasta olduğu da göz önüne alınmalıdır.

Flavivirüs taramaları sonunda, Trakya bölgesi kaynaklı beş havuzda bilinen BÖFV'lerden farklılık gösteren diziler saptanmıştır. Bu dizilere nükleotit içeriği ve filogeni olarak en yakın virüs, 2014 yılında Edirne çevresinde bir *Ur. unguiculata* sivrisineğinde tespit edilen, kesin olarak tanımlanamamış bir flavivirüstür (Çizelge 9, Şekil 10) [84]. Çalışmada saptanan diziler ve önceki dizinin, İspanya kaynaklı sivrisineklerde DNA formunda saptanmış Flavivirüs AV-2011'un belirli bir kökeni ile ortak ataya sahip oldukları izlenmiştir (Şekil 10) [79]. Flavivirüs AV-2011, ilk kez tanımlandığı İspanya kaynaklı örneklerde filogenetik olarak ayrışan iki farklı DNA formunda tanımlanmış, DNA formlarının birisi *Ae.vexans*, diğeri ise *Ae. caspius*, *Cs. annulata* ve *Oc. detritus* türü sivrisineklerde tespit edimiştir [79]. Dizilerin RNA formları ise, ilk kez Kırklareli çevresinde 2014 yılında toplanmış *Cs. annulata* örneklerinde saptanmış, böylelikle bu dizilerin replikasyon yeteneğine sahip muhtemel virüs formlarına ait ön bulgular elde edilmiştir [84]. Havuzlarda saptadığımız diziler, genel olarak İspanya ya da Türkiye kökenli Flavivirüs AV-2011 dizilerinden %25'i aşkın nükleotit ve amino asit farkı bulunmaktadır (Çizelge 8-9). **Bu nedenle ilgili virüs yeni bir tür teşkil etme potansiyeline sahiptir**. Bu virüsün dişi ve erkek bireylerde ve *Ur. unguiculata, Ae. caspius ve Cx. pipiens* s.l. örneklerinde saptanmış olması (Çizelge 8-9), geniş bir vektör çeşitliliğine sahip olduğunu düşündürmektedir.

Flavivirüslere ait DNA formları, arazi ya da laboratuvar kolonisi kaynaklı sivrisineklerde saptanabilmektedir. Önceleri "cell silent agent (CSA)" olarak tanımlanan bu formlar, *Aedes* türleri başta olmak üzere çeşitli türlerde izlenmektedir. Deneysel çalışmalar, Batı Nil ve Deng gibi patojen flavivirüslerin de, uygun koşullarda DNA formu oluşturabildiği gösterilmiştir [13]. Doğal şekilde oluşan DNA formlarının, replikasyon kompetan virüs ya da defektif partiküllerle enfeksiyon sonrası da endojen retrovirüslerin ters transkriptaz ve integraz aktiviteleri ile ilişkili olduğu düşünülmekte, bu süreçte konak hücrede kromozom

entegrasyonu da izlenebilmektedir [85]. Kromozom entegrasyonu sonrasında viral DNA formları, konak hücre bölünmesi sırasında kopyalanmaktadır. Entegre formlar genellikle kısa ve “stop” kodonları taşıyan parçalı viral diziler içermekte, bunlar da nadiren kısa viral transkriptler oluşturabilmektedir. Flaviviral DNA formlarının virüs replikasyonu ve epidemiyolojisi açısından etkileri henüz aydınlatılmamıştır.

Çalışmada muhtemel yeni BÖFV saptadığımız beş havuzun ikisinde, viral DNA formları da tespit edilmiştir. Bu örnekler dişi ve erkek *Ur. unguiculata* sivrisinekleri içermektedir. Dizi analizlerinde RNA’lara göre parçalı ve kısmi okumalar elde edilebilmiş, ancak dizilerin genel olarak iyi korunmuş olduğu ve “stop” kodonu taşımadığı izlenmiştir (Şekil 10). Bu bulgular, doğadan toplanmış sivrisinek örneklerinde ayni BÖFV’e ait RNA ve DNA formlarının gösterildiği ilk verileri teşkil etmektedir ve doğal enfeksiyon sırasında bu formların oluşabildiğini açık şekilde ortaya koymaktadır. Benzer dizilere ait RNA formlarının farklı tür sivrisineklerde bulunabilmesine karşın DNA formlarının sadece *Ur. unguiculata* örneklerinde saptanması, sivrisinek türleri arasında farklı mekanizmaların etkili olduğunu düşündürmektedir. Çalışmada, saptama yöntemi nedeniyle, tespit edilen DNA’nın entegre ya da ekstrakromozomal formda olduğunun incelenmesi mümkün olmamıştır.

Sonuç ve Öneriler:

Vektör kaynaklı virüsler, değişen epidemiyolojik özellikler ve özellikle küreselleşen dünyada hızlı seyahat ve ticaret ile de ilişkili olmak üzere, halk sağlığı açısından sorun oluşturmaya devam etmektedir. İklim ve coğrafi özellikleri nedeniyle birçok etken açısından uygun koşullara sahip ülkemizde, salgınlar ve vaka grupları ile birlikte tüm dünyada dikkat çeken Zika virüs gibi enfeksiyonlarla konuya ilgi artmakla birlikte, uygun sürveyans ve eldeki bilgi, muhtemel risklerin değerlendirilebilmesi açılarından yeterli düzeyde değildir. Viral patojen vektörü olarak görev yapan sivrisineklerin toplanması ve taşıdıkları etkenlerin araştırılması, dolaşımda bulunan hastalık etkeni virüslerin ortaya konulması kadar, bunlarla ya

da vektörle doğrudan etkileşime girebilecek diğer etkenlerin de saptanabilmesi için kritik öneme sahiptir.

Çalışmamızda, Trakya bölgesinde yer alan 3 büyük ilimizde sahadan toplanan sivrisinekler tanımlanmış, taşıdıkları olası virüsler patojenik ve non-patojenik çeşitli flavivirüsleri saptayabilen, önceden tanımlanmış bir PZR yöntemi ile taranmıştır. Çalışma 2016 yılında, sivrisineklerin yüksek düzeyde aktif oldukları Ağustos ve Eylül aylarında gerçekleştirilmiş ve toplamda 1461 örnek elde edilmiştir. Yapılan flavivirüs taraması ile örneklerin %6.6'sında viral diziler tespit edilmiştir.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz temel sonuçlar aşağıda sıralanmış, takip edilmesi gereken hususlar belirlenmiştir:

1. Örnekleme sırasında, vektör potansiyeline sahip olan ve daha önceden ülkemizde varlığı saptanan BNV taşıyıcısı türler tespit edilmiştir. Bu gözlem, BNV olguları ya da muhtemel salgınlar için gerekli tedbirlerin alınması gerekliliğine işaret etmektedir. Bununla birlikte, bölgede daha önceden tespiti yapılmış olmasına karşın, örneklerimizde BNV dizileri saptanmamıştır.

2. Edirne ili çevresinden toplanmış *An. maculipennis* s.l. örnekleri içeren bir havuzda Anofeles flavivirüslerine benzerlik gösteren diziler saptanmıştır. **Böylece, bu virüsler Afrika kıtası dışında ülkemizde ilk kez tespit edilmiştir. Elde edilen kısmi diziler, Türkiye'de saptanan virüsün, tanımlanmış Anofeles flavivirüslerinden önemli ölçüde genomik farklılık içerdiğini ortaya koymuş, yeni bir flavivirüs olabileceğini göstermiştir.** Bu nedenle pozitif havuzda uygun hücrelerle virüs izolasyon çalışmaları yapılmalı, ek olarak virüsün tüm genomunun tanımlanabilmesi için alternatif yaklaşımlar uygulanmalıdır. Ayrıca saptanan Anofeles flavivirüsünün yaygınlığının belirlenebilmesi için de, takip eden sezonlarda çevre bölgelerde kapsamlı çalışmalar planlanmalıdır.

3. **Flavivirüs saptanan örneklerin önemli bir kısmında, daha önceden tanımlanmamış bir flavivirüs bulunduğunu düşündüren veriler elde edilmiştir**. Bu yeni virüs, 2014 yılında Trakya bölgesinde farklı bir örnekleme alanında tespit edilmiştir. İlgili virüsün, bölgedeki sivrisinek türlerinde yaygınlığı

araştırılmalı, ayrıca hücre kültürü izolasyon ve genomik karekterizasyon çalışmaları yapılmalıdır.

4. Muhtemel yeni flavivirüs saptanan havuzların bir kısmında, virüse ait RNA ile DNA yapısında kısmi diziler, aynı havuzlarda gösterilmiştir. **Belirli BÖFV'lerin DNA formları, sahadan toplanmış sivrisineklerde saptanmakla birlikte, DNA formları ile birlikte RNA'ların da saptanması literatürde ilk kez dokümante edilmiştir.** Dizayn edilecek yeni primerler ile viral genomun muhtemel kromozom entegrasyonu yoluyla, bunun gerçekleştiği bölgeler belirlenebilecektir. DNA formlarını sadece belirli bir sivrisinek türünde saptanmış olması, farklı türlerin bu virüs ve diğer flavivirüslerin DNA formunun oluşumu açısıdan farklılık gösterebileceği, böylelikle virüs epidemiyolojisinde farklılıkların ortaya çıkabileceği olasıdır. İlgili bölgelerden yeni örneklemeler, bu konuda daha fazla bilgi elde edilebilmesine olanak sağlayacaktır.

5. Daha önceden bölgede sivrisineklerde yaygın olarak saptanmış olan BNV, 2014 yılı tarihli örneklemede görece düşük insidans ile tespit edilmiş, çalışmamızda ise saptanamamıştır. Bu durum örneklemelerde yapılan eksiklikler ya da diğer birçok faktöre bağlı olabileceği gibi, BÖFV'lerin, çift konaklı patojen flavivirüslerin replikasyonuna olan muhtemel etkileri sonucu da ortaya çıkmış olabilir. Böyle bir baskılama, önemli halk sağlığı sorunu olan bu virüslerin prevalansını azaltma konusunda, doğal ve etkili bir yaklaşım olanağı sunuyor olabilir. Konuyla ilgili çeşitli in vitro çalışmalar yapılmasına karşın, bu konuda net bulgular henüz elde edilememiştir. Her iki grup flavivirüslerin dolaşımda olduğu bölgelerde yapılacak vektör sürveyansı çalışmaları, bu konuda doğrudan saha kaynaklı bilgiler sağlayabilme olasılığı nedeniyle de önemlidir. Bahsi geçen virüslerin izolasyonu ile de, bölgesel şartları oluşturan in vitro koenfeksiyon çalışmaları planlanabilmesine yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

[1] Ramsdale, C. D., Alten, B., Road, L., A revised annotated checklist of the mosquitoes Diptera, *European Mosquito Bulletin*, 9, 18–27, **2001**.

[2] Gunay, F., *Türkiye Sivrisinek Faunası Üzerine DNA Barkodlama Yöntemiyle Moleküler Analizler*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2015**.

[3] Patel, P., Landt, O., Kaiser, M., Faye, O., Koppe, T., Lass, U., Sall, A. A., Niedrig, M., Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses, *Virology Journal*, 10, 1, 58, **2013**.

[4] Ozkul, A., Ergunay, K., Koysuren, A., Alkan, F., Arsava, E. M., Tezcan, S., Emektas, G., Hacioglu, S., Turan, M., Us, D., Concurrent occurrence of human and equine West Nile virus infections in Central Anatolia, Turkey: The first evidence for circulation of lineage 1 viruses, *International Journal of Infectious Diseases*, 17, 2–7, **2013**.

[5] Marquardt, W. C., *Biology of Disease Vectors*, İkinci Baskı, Elsevier Academic Press, ,**2005**.

[6] Edwards, F. W., *Diptera, Family Culicidae. In Genera insectorum*, (eds: P. Wytsman), Brussels, 258, **1932**.

[7] Eldridge, B. F., Patrick Manson and the discovery age of vector biology, *Journal of the American Mosquito Control Association*, 8, 3, 215–220, **1992**.

[8] Philip, C. B., Rozeboom, L. E., Medico-veterinary entomology: a generation of progress. In History of Entomology (eds: Smith,R., F., Mittler, T. E.), *Annual Reviews.*, 333–359, **1973**.

[9] WHO, *Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases World Health Organization*, Technical Report, No.719, Geneva, Switzerland," **1985**.

[10] Murphy, F. A., Nathanson, N., The emergence of new virus diseases: an overview, *Seminars in Virology*, 5, 2, 87–102, **1994**.

[11] Gubler, D. J., The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems, *Archives of Medical Research*, 33, 4, 330–342, **2002**.

[12] Gubler, D., Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem, *Dengue and dengue hemorrhagic fever*, (eds: Gubler, K. G.), CAB International, London, 1-22, **1997.**

[13] Nag, D. K., Brecher, M., Kramer, L. D., DNA forms of arboviral RNA genomes are generated following infection in mosquito cell cultures, *Virology*, 498, 164–171, **2016**.

[14] Gubler, D., The global resurgence of arboviral diseases, *Transections of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*, 90, 449–451, **1996**.

[15] Karabatsos, N., International catalogue of arboviruses, including certain

other viruses of vertebrates (San Antonio, TX, USA); 1985. 2001 update, *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **2001**.

[16] Weaver, S. C., Reisen, W. K., Present and future arboviral threats, *Antiviral Research*, 85, 2, 328–345, **2010**.

[17] Gubler, D., Roehrig, J., *Arboviruses (Togaviridae and Flaviviridae). In: Topley and Wilson's microbiology and microbial infections,* Virology., 1, Oxford University Press, New York, 579-600, **1998**.

[18] Domingo, E., Webster, R. G., Holland, J. J., Preface to the First Edition," in *Origin and Evolution of Viruses*, (eds: Domingo, E., Parrish, C. R., Holland, J. J.), İkinci Baskı, Academic Press, London, **2008**.

[19] Calisher, C., Karabatsos, N., *Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution.," in The Arboviruses: Epidemiology and Ecology,* (eds: Monath), T. P., CRC Press., Boca Raton, Florida, 19–57, **1988**.

[20] M. H. V. van Regenmortel, Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., Wickner, R. B., *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Academic Press, San Diego, **2000**.

[21] Us, D., Ergunay, K., *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*, (eds: Ergunay, K., Us, D.), Bilimsel Tıp Kitabevi, Ankara, 393–425, **2012**.

[22] Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., *Fields virology*, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **2007**.

[23] Markoff, L., 5'- and 3'-Noncoding Regions in Flavivirus RNA, *Advances in Virus Research*, 59, 1–3, **2003**.

[24] Ahmed, A. M., Shaalan, E. A., Aboul-Soud, M. A. M., Tripet, F., Al-Khedhairy, A. A., Mosquito Vectors Survey in the AL-Ahsaa District of Eastern Saudi Arabia, *Journal of Insect Science*, 11, 176, 1–11, **2011**.

[25] Kocak, A. A., *Atipik menenjit/ensefalit tanısı almış hastalarda, enterovirüsler, herpesvirüsler (1, 2, 6, 7), flavivirüsler ve flebovirüslerin polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile araştırılması ve genetik karakterizasyonlarının incelenmesi*, Gazi Üniversitesi, **2017**.

[26] Burns, K. F., Farinacci, C. J., Virus of bats antigenically related to St. Louis encephalitis, *Science*, 123, 3189, 227, **1956**.

[27] Johnson, H. N., Ecological implications of antigenically related mammalian viruses for which arthropod vectors are unknown and avian associated soft tick viruses, *Japanese Journal of Medical Science of Biology*, 20, Suppl, 160–6, **1967.**

[28] Constantine, D. G., Woodall, D. F., Latent infection of Rio Bravo virus in salivary glands of bats, *Public Health Reports*, 79, 12, 1033–1039, **1964**.

[29] Fairbrother, A., Yuill, T. M., Experimental infection and horizontal transmission of Modoc virus in deer mice (Peromyscus maniculatus), *Journal of Wildlife Disease*, 23, 2, 179–185, **1987**.

[30] Blitvich B. J., Firth, A. E., Insect-Specific Flaviviruses: A Systematic Review of Their Discovery, Host Range, Mode of Transmission, Superinfection Exclusion Potential and Genomic Organization, *Viruses*, 7, 4, 1927–1959,

2015.

[31] Junglen, S., Kopp, A., Kurth, A., Pauli, G., Ellerbrok, H., Leendertz, F. H., A New Flavivirus and a New Vector: Characterization of a Novel Flavivirus Isolated from Uranotaenia Mosquitoes from a Tropical Rain Forest, *Journal of Virology*, 83, 9, 4462–4468, **2009**.

[32] Stollar V., Thomas, V. L., An agent in the Aedes aegypti cell line (Peleg) which causes fusion of Aedes albopictus cells, *Virology*, 64, 2, 367–377, **1975**.

[33] Bolling, B. G., Vasilakis, N., Guzman, H., Widen, S. G., Wood, T. G., Popov, V. L., Thangamani, S., Tesh, R. B., Insect-specific viruses detected in laboratory mosquito colonies and their potential implications for experiments evaluating arbovirus vector competence, *the American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92, 2, 422–428, **2015**.

[34] Cook, S., Bennett, S. N., Holmes, E. C., De Chesse, R., Moureau, G., de Lamballerie, X., Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico, *Journal of General Virology*, 87, 4, 735–748, **2006**.

[35] Espinoza-Gomez, F., *Lopez-Lemus,* A. U., Rodriguez-Sanches, I. P., Martinez-Fierro, M. L., Newton-Sanchez, O. A., Chavez-Flores, E., Delgado-Enciso, I., Detection of sequences from a potentially novel strain of cell fusing agent virus in Mexican Stegomyia (Aedes) aegypti mosquitoes., *Archieves of Virology*, 156, 7, 1263–1267, **2011**.

[36] Hoshino, K., Isawa, H., Tsuda, Y., Sawabe, K., Kobayashi, M., Isolation and characterization of a new insect flavivirus from Aedes albopictus and Aedes flavopictus mosquitoes in Japan, *Virology*, 391, 1, 119–129, **2009.**

[37] Kihara, Y., Satho, T., Eshita, Y., Sakai, K., Kotaki, A., Takasaki, T., Rongsriyam, Y., Komalamisra, N., Srisawat, R., Lapcharoen, P., Sumroiphon, S., Iwanaga, S., Ushijima, H., Endoh, D., Miyata, T., Sakata, A., Kashige, N., Miake, F., Fukushi, S., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S., Mizutani, T., Rapid determination of viral RNA sequences in mosquitoes collected in the field, *Journal of Virology Methods*, 146, 1–2, 372–374, **2007**.

[38] Bolling, B. G., Eisen, L., C., Moore, C. G., Blair, C. D., Insect-specific flaviviruses from Culex mosquitoes in Colorado, with evidence of vertical transmission, *the American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85, 1, 169–177, **2011**.

[39] Crabtree, M. B., Sang, R. C., Stollar, V., Dunster, L. M., Miller, B. R., Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus, Kamiti River virus, *Archives Virology*, 148, 6, 1095–1118, **2003**.

[40] Goenaga, S., Fabbri, C. M., García, J. B., Rondán, J. C., Gardenal, N., Calderón, G. E., Enria, D. A., New Strains of Culex flavivirus Isolated in Argentina, *Journal of Medical Entomology*, 51, 4, 900–906, **2014**.

[41] Hoshino, K., Isawa, H., Tsuda, Y., Yano, K., Sasaki, T., Yuda, M., Takasaki, T., Kobayashi, M., Sawabe, K., Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from Culex pipiens mosquito in Japan, *Virology*, vol. 359, no. 2, pp. 405–414, **2007**.

[42] Huanyu, W., Haiyan, W., Shihong, F., Guifang, L., Hong, L., Xiaoyan, G.,

Lizhi, S., Rayner, S., Aiqiang, X., Guodong, L., Isolation and identification of a distinct strain of Culex Flavivirus from mosquitoes collected in Mainland China., *Virology Journal*, 9, 1, 73, **2012**.

[43] Kim, D. Y., Guzman, H., Bueno, R., Dennett, J. A., Auguste, A. J., Carrington, C. V. F., Popov, V. L., Weaver, S. C., Beasley, D. W. C., Tesh, R. B., Characterization of Culex Flavivirus (Flaviviridae) strains isolated from mosquitoes in the United States and Trinidad, *Virology*, 386, 1, 154–159, **2009**.

[44] MacHado, D. C., Mondini, A., Dos Santos Santana, V., Yonamine, P. T. K., Chiaravalloti Neto, F., De Andrade Zanotto, P. M., Nogueira, M. L., First identification of culex flavivirus (flaviviridae) in Brazil, *Intervirology*, 55, 6, 475–483, **2012**.

[45] Morales-Betoulle, M. E., Monzón Pineda, M. L., Sosa, S. M., Panella, N., López, M. R. B., Cordón-Rosales, C., Komar, N., Powers, a, Johnson, B. W.,., Culex flavivirus isolates from mosquitoes in Guatemala., *Journal of Medical Entomology*, 45, 1187–1190, **2008**.

[46] Newman, C. M., Cerutti, F., Anderson, T. K., Hamer, G. L., Walker, E. D., Kitron, U. D., Ruiz, M. O., Brawn, J. D., Goldberg, T. L., Culex Flavivirus and West Nile Virus Mosquito Coinfection and Positive Ecological Association in Chicago, United States, *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, vol. 11, no. 8, pp. 1099–1105, 2011.

[47] Sang, R. C., Gichogo, A., Gachoya, J., Dunster, M. D., Ofula, V., Hunt, A. R., Crabtree, M. B., Miller, B. R., Dunster, L. M., Isolation of a new flavivirus related to Cell fusing agent virus (CFAV) from field-collected flood-water Aedes mosquitoes sampled from a dambo in central Kenya, *Archieves Virology*, 148, 6, 1085–1093, **2003**.

[48] Huhtamo, E., Moureau, G., Cook, S., Julkunen, O., Putkuri, N., Kurkela, S., Uzcátegui, N. Y., Harbach, R. E., Gould, E. A., Vapalahti, O., de Lamballerie, X., Novel insect-specific flavivirus isolated from northern Europe, *Virology*, 433, 2, 471–478, **2012**.

[49] Parreira, R., Cook, S., Lopes, Â., de Matos, A. P., de Almeida, A. P. G., Piedade, J., Esteves, A., Genetic characterization of an insect-specific flavivirus isolated from Culex theileri mosquitoes collected in southern Portugal, *Virus Research*, vol. 167, 2, 152–161, **2012**.

[50] Farfan-Ale, J. A., Lorono-Pino, M. A., Garcia-Rejon, J. E., Soto, V., Lin, M., Staley, M., Dorman, K. S., Bartholomay, L. C., Hovav, E., Blitvich, B. J., Detection of flaviviruses and orthobunyaviruses in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico in 2008., *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 10, 8, 777–783, **2010**.

[51] Crabtree, M. B., Nga, P. T., Miller, B. R., Isolation and characterization of a new mosquito flavivirus, Quang Binh virus, from Vietnam, *Archieves Virology*, 154, 5, 857–860, **2009**.

[52] Bolling, B. G., Olea-Popelka, F. J., Eisen, L., Moore, C. G., Blair, C. D., Transmission dynamics of an insect-specific flavivirus in a naturally infected Culex pipiens laboratory colony and effects of co-infection on vector competence for West Nile virus, *Virology*, 427, 2, 90–97, **2012**.

[53] Haddow, A. D., Guzman, H., Popov, V. L., Wood, T. G., Widen, S. G., Haddow, A. D., Tesh, R. B., Weaver, S. C., First isolation of Aedes flavivirus in the Western Hemisphere and evidence of vertical transmission in the mosquito Aedes (Stegomyia) albopictus (Diptera: Culicidae), *Virology*, 440, 2, 134–139, **2013**.

[54] Singh, K., Cell cultures derived from larvae of Aedes albopictus (Skuse) and Aedes aegypti (L.), *Current Science India*, 36, 8, 506–508, **1967**.

[55] Kalaycioglu, H., Korukluoglu, G., Ozkul, A., Oncul, O., Tosun, S., Karabay, O., Gozalan, A., Uyar, Y., Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey , 2010 to 2011, **2012**.

[56] Ergunay, K., Ozkul, A., Confirmation of West Nile Virus Seroactivity in Central Nervous System Infections of Unknown Etiology from Ankara Province, Central Anatolia, Turkey, *Mikrobiyoloji Bülteni*, **2013**.

[57] Ergunay K., Multicentre evaluation of central nervous system infections due to Flavi and Phleboviruses in Turkey, *Journal of Infection*, 65, 4, 343–349, **2012**.

[58] Hayes, E. B., Sejvar, J. J., Zaki, S. R., Lanciotti, R. S., Bode, A. V., Campbell, G. L., Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease., *Emerging Infectious Diseases*, 11, 8, 1174–1179, **2005**.

[59] May, F. J., Davis, C. T., Tesh, R. B., Barrett, A. D: T., Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas., *Journal of Virology*, 85, 6, 2964–2974, **2011**.

[60] Bakonyi, T., Ivanics, E., Erdelyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Weissenbock, H., Nowotny, N., Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, Central Europe, *Emerging of Infectious Diseases*, 12, 4, 618–623, **2006**.

[61] Calistri, P., Giovannini, A., Hubalek, Z., Ionescu, A., Monaco, F., Savini, G., Lelli, R., Epidemiology of west nile in europe and in the mediterranean basin, *the Open Virology Journal*, 4, 29–37, **2010**.

[62] Bakonyi, T., Ferenczi, E., Erdelyi, K., Kutasi, O., Csorgo, T., Seidel, B., Weissenbock, H., Brugger, K., Ban, E., Nowotny, N., Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009., *Veterinary Microbiology*, 165, 1–2, 61–70, **2013**.

[63] Engler, O., Savini, G., Papa, A., Figuerola, J., Groschup, M. H., Kampen, H., Medlock, J., Vaux, A., Wilson, A.J., Werner, D., Jöst, H., Goffredo, M., Capelli, G., Federici, V., Tonolla, M., Patocchi, N., Flacio, E., Portmann, J., Rossi-Pedruzzi, A., Mourelatos, S., Ruiz, S., Vázquez, A., Calzolari, M., Bonilauri, P., Dottori, M., Schaffner, F., Mathis, A., Johnson, N., European surveillance for West Nile virus in mosquito populations, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 10, 4869–4895, **2013**.

[64] Ergunay, K., Bakonyi, T., Nowotny, N., Ozkul, A., Close relationship between west nile virus from turkey and lineage 1 strain from central African Republic, *Emerging Infectious Disease*, 21, 2, 352–355, **2015**.

[65] Ergünay, K., Litzba, N., Brinkmann, A., Günay, F., Kar, S., Öter, K., Örsten, S., Sarıkaya, Y., Alten, B., Nitsche, A., Linton, Y. M., Isolation and genomic

characterization of Culex theileri flaviviruses in field-collected mosquitoes from Turkey, *Infection, Genetics and Evolution*, 46, 138–147, **2016**.

[66] Hayes, E. B., Komar, N., Nasci, R. S., Montgomery, S. P., O'Leary, D. R., Campbell, G. L., Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile Virus Disease, *Emerging Infectious Diseases*, 11, 8, 1167–1173, **2005**.

[67] Ozer, N., Ergünay, K., Simsek, F., Kaynas, S., Alten, B., Çağlar, S. S., West Nile virus studies in the Sanliurfa Province of Turkey, *Journal of Vector Ecology*, 32, 202–206, **2007.**

[68] Ozbel, Y., *Presentation at the West Nile virus Symposium September 20–21th, 2012 Ankara, Turkey*, in West Nile virus Symposium, **2012**.

[69] Ergunay, K., Whitehouse, C. A., Ozkul, A., Current status of human arboviral diseases in Turkey, Vector Borne Zoonotic Disease, 11, 6, 731–741, **2011**.

[70] Ergünay, K., Günay, F., Erişöz Kasap, O., Öter, K., Gargari, S., Karaoğlu, T., Tezcan, S., Çabalar, M., Yıldırım, Y., Emekdaş, G., Alten, B., Özkul, A., Serological, Molecular and Entomological Surveillance Demonstrates Widespread Circulation of West Nile Virus in Turkey, *PLoS Neglected Tropical Disease*, 8, 7, 1–10, **2014**.

[71] Ergünay, K., Litzba, N., Brinkmann, A., Günay, F., Sarıkaya, Y., Kar, S., Örsten, S., Öter, K., Domingo, C., Erisoz Kasap, Ö., Özkul, A., Mitchell, L., Nitsche, A., Alten, B., Linton, Y. M., Co-circulation of West Nile virus and distinct insect-specific flaviviruses in Turkey, *Parasite and Vectors*, 10, 1, 149, **2017**.

[72] Lustig, Y., Hindiyeh, M., Orshan, L., Weiss, L., Koren, R., Fifteen years of mosquito surveillance reveals high genetic diversity of West Nile Virus in Israel, *Journal of Infectious Disease,* **2015**.

[73] Mitchell, L., Alten, B., Ergunay, K., Hijjawi, N., Linton, Y. M., *Field Data Submission (FDS) of Biosurveillance Data*, Syria Project | Project poster, http://www.syriaproject.info/project-poster, **2017**.

[74] Vazquez, A., Sanchez-Seco, M., Palacios, G., Molero, F., Reyes, N., Ruiz, S., Aranda, C., Marques, E., Escosa, R., Moreno, J., Figuerola, J., Tenorio, A., Novel Flaviviruses Detected in Different Species of Mosquitoes in Spain, *Vector- Borne and Zoonotic Diesases,* 12, 3, 223, **2012**

[75] Hall, T. A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, **1999**.

[76] Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Molecular Biology and Evolution*, 30, 12, 2725–2729, **2013**.

[77] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., Basic local alignment search tool, *Journal of Molecular Biology*, 215, 3, 403–410, **1990**.

[78] Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research*, 22, **1994**.

[79] Vázquez, A., Ruiz, S., Herrero, L., Moreno, J., Molero, F., Magallanes, A., Sánchez-Seco, M.P., Figuerola, J., Tenorio, A., West Nile and Usutu viruses in mosquitoes in Spain, 2008-2009, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85, 1, 178–81, **2011**.

[80] Fauver, J.R., Grubaugh, N.D., Krajacich, B.J., Weger-Lucarelli, J., Lakin, S.M., Fakoli, L.S., West African Anopheles gambiae mosquitoes harbor a taxonomically diverse virome including new insect-specific flaviviruses, mononegaviruses, and totiviruses., *Virology*, 498, 288–299, **2016**.

[81] Villinger, J., Mbaya, M. K., Ouso, D., Kipanga, P. N., Lutomiah, J., Masiga, D. K., Arbovirus and insect-specific virus discovery in Kenya by novel six genera multiplex high-resolution melting analysis, *Molecular Ecology Resources*, 17, 3, 466–480, **2017**.

[82] Kuno, G., Chang, G. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N., Cropp, C. B., Phylogeny of the genus Flavivirus, *Journal of Virology,* 72,1, 73–83, **1998**.

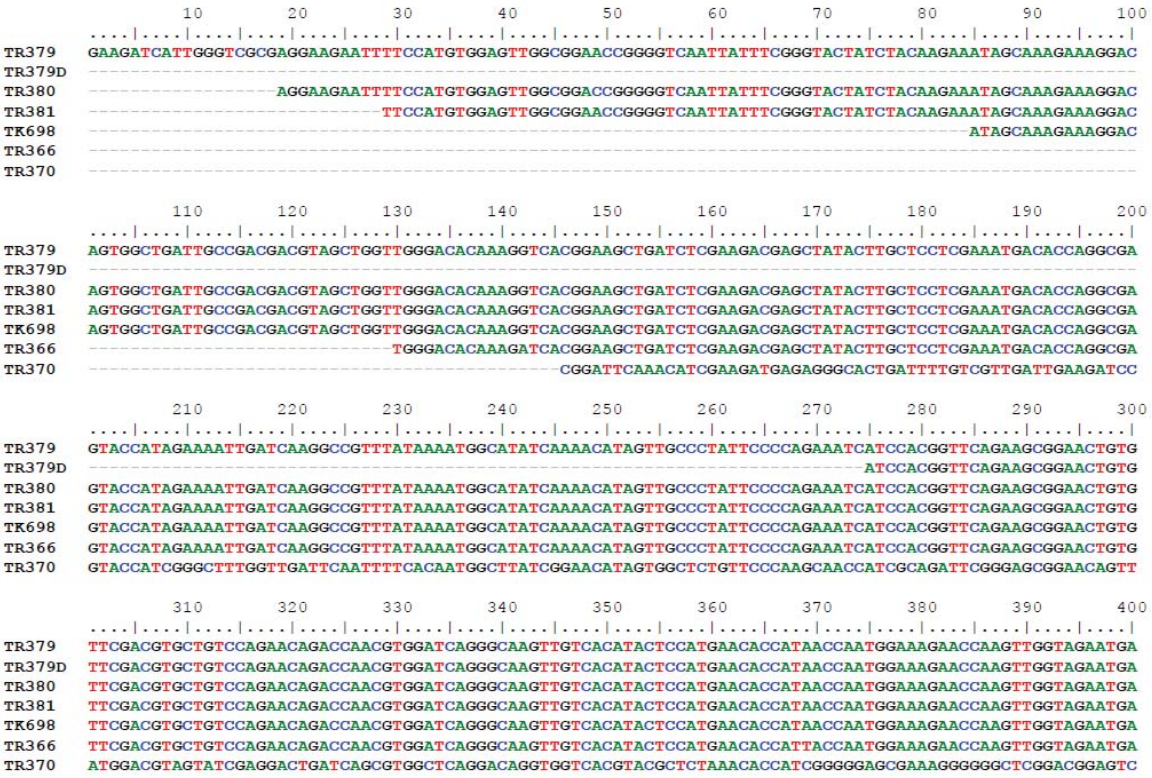
[83] Ergunay K., Günay, F., Öter, K., Kasap, Ö. E., Örsten, S., Akkutay, A. Z., Erdem, H., Özkul, A., Alten, B., Arboviral Surveillance of Field-Collected Mosquitoes Reveals Circulation of West Nile Virus Lineage 1 Strains in Eastern Thrace, Turkey, *Vector Borne Zoonotic Disease*, 13, 10, 744–752, **2013**.

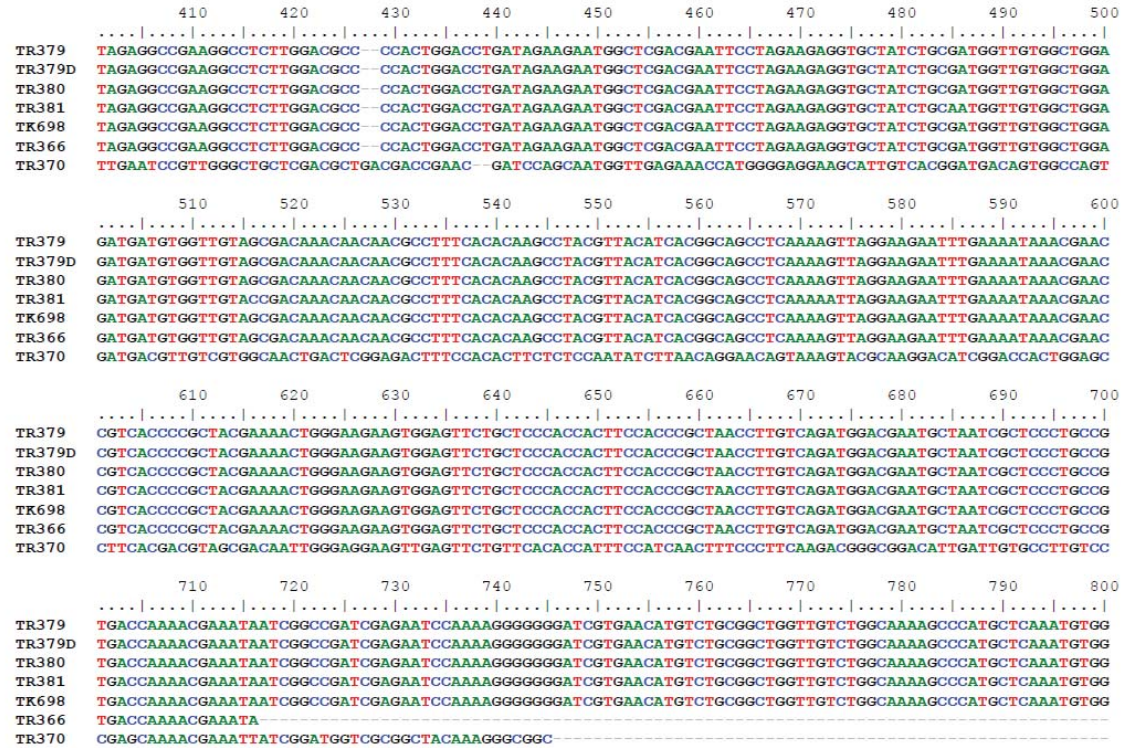
[84] Ergünay K., Bringmann, A., Litzba, N., Günay, F., Kar, S., Öter, K., Örsten, S., Sarıkaya, Y., Alten, B., Nitsche, A., Linton, Y.M., A novel rhabdovirus, related to Merida virus, in field-collected mosquitoes from Anatolia and Thrace, *Archives Of Virology*, **2017**.

[85] Blitvich, B. J., Firth, A. E., Insect-specific flaviviruses: A systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization, *Viruses,* 7, 4, **2015**.

EKLER

Ek 1. Pozitif havuzların sekans analizi





TR379D: İlgili havuzun DNA formuna ait dizi

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Ceren Öncü

Doğum Yeri : Yenimahalle - ANKARA

Medeni Hali : Bekar

E-posta : cerenoncu_@hotmail.com

Adresi : Yeni ziraat mahallesi 657.sokak 4/6 Altındağ/ANKARA

Eğitim

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans :

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : 60

İş Deneyimi

Deneyim Alanları

Çeşitli türlerden kum sineği ve sivrisinek örnekleme çalışmaları,

Kum sineği ve sivrisinek laboratuvar kolonisi oluşturma ve yetiştirme çalışmaları,

Sivrisinek tür teşhisi,

Moleküler laboratuvar çalışmaları.

Projeler ve Bütçesi

“Insect Disease Vector Surveillance and Arbovirus Testing along Syrian Refugee Routes in Turkey, Lebanon and Jordan” adlı proje, Global Emerging Infection Surveillance (GEIS) tarafından desteklenmekte ve Smithsonian Institution ile ortak gerçekleştirilmektedir.

Yayınlar

Ergünay, K., Litzba, N., Brinkmann, A., Günay, F., Sarıkaya, Y., Kar, S., Örsten, S., Öter, K., Domingo, C., Erisoz Kasap, Ö., Özkul, A., Mitchell, L., Nitsche, A., Alten, B., Linton, Y.-M. Co-circulation of West Nile virus and distinct insect-specific flaviviruses in Turkey. Parasites and Vectors 10, 149, **2017**.

Dogan, M., Gunay, F., Puggioli, A., Balestrino, F., Oncu, C., Alten, B., Bellini, R. Establishment of a satellite rearing facility to support the release of sterile Aedes albopictus males. I. Optimization of mass rearing parameters. *Acta Tropica*, 159, 62–68, **2016**.

Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih:21/06/2017

Tez Başlığı / Konusu: Trakya Bölgesi'nde Sivrisinek Flavivirüslerinin Tespiti ve Kısmi Genomik Karakterizasyonu

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 67 sayfalık kısmına ilişkin, 21/06/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 8 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

1- Kaynakça hariç
2- Alıntılar hariç/~~dâhil~~
3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza
21.06.2017

Adı Soyadı:	Ceren Öncü
Öğrenci No:	N14325026
Anabilim Dalı:	Biyoloji
Programı:	Ekoloji
Statüsü:	☑ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. S. Bülent ALTEN

(Unvan, Ad Soyad, İmza)