

Şanlıurfa'da Yerleşik Damızlık Atlarda Batı Nil Virüsü (BNV) Enfeksiyonu'nun Serolojik ve Virolojik Olarak Araştırılması*

Rahime Adalet Duyum¹, Taner Karaoğlu²

¹Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Ankara

²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 17.03.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 19.04.2019

Özet: Batı Nil Virüsü (BNV) *Flaviviridae* ailesine mensup olup arthropodlarla bulaşan, insanlar, atlar, kuşlar ve çeşitli vahşi hayvanlarda ensefalit vakası ile seyredilen ve salgınlara sebep olabilen bir zoonoz hastalık etkenidir. BNV'nin doğal vektörü *Culex* ve *Aedes* cinsi sivrisinekler olup, bu arthropodlar ile yabani kuşlar arasında önemli bir bulaşma zinciri mevcuttur. BNV'nin enfeksiyon spektrumunda at, insan, köpek, koyun gibi memeli hayvanlar ile tavuk gibi evcil kanatlı hayvanlar da bulunabilmektedir. Bu çalışmada Şanlıurfa'da yerleşik damızlık atlarda Batı Nil virüsü enfeksiyonunun serolojik (ELISA ve PRNT) ve virolojik (Real Time RT-PCR) olarak araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla Şanlıurfa ilinde 10 farklı merkezde bulunan toplam 277 damızlık attan alınan kan serumu örnekleri kullanıldı. Örnekler öncelikle BNV Ab ELISA testine tabi tutularak antikor varlığı açısından değerlendirildi. Örneklerden 42 adedi (%15.16) seropozitif, 16 adedi (%5.77) şüpheli, 219 adedi (%79.06) seronegatif olarak değerlendirildi. Mevcut seropozitif ve şüpheli örnekler PRNT'ye tabi tutuldu. Söz konusu 42 seropozitif örnekten 11 adedi (%26.19)'nin spesifik Batı Nil virüs antikorunu taşıdığı tespit edildi. Şüpheli örneklerin hiçbirinde PRNT seropozitifliğine rastlanmadı. Örneklenen 277 damızlık atın 11 adedinde (%3.97) spesifik Batı Nil virüs antikoruna saptandı. BNV Ab ELISA testi ile seropozitif olarak tespit edilen 42 örnek ile 16 adet şüpheli örneğin hiçbirisinde Real Time Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (rtRT-PCR) ile viral RNA saptanamadı.

Anahtar kelimeler: Batı Nil Virüs, ELISA, PCR, PRNT

Serological and Virological Investigation of West Nile Virus Infection in Resident Breeder Horses at Şanlıurfa Province

Abstract: The West Nile Virus (BNV) is a zoonotic disease agent that is a member of the *Flaviviridae* family and which is transmitted by arthropods and can cause encephalitis in humans, horses, birds and various wild animals. The natural vector of the BNV is the *Culex* and *Aedes* genus mosquitoes, and there is an important contamination chain between these arthropods and wild birds. In the infection spectrum of BNV, mammalian animals such as horses, humans, dogs, sheep, and domestic poultry such as chickens can be found. In this study, it was aimed to investigate West Nile virus infection in serological (ELISA and PRNT) and virological (Real Time RT-PCR) in breeding horses in located in Şanlıurfa. For this purpose, blood serum samples taken from 277 breeding horses in 10 different centers in Şanlıurfa province were used. Samples were first subjected to BNV Ab ELISA and evaluated for antibody presence. 42 (15.16%) of the samples were seropositive, 16 (5.77%) were suspected and 219 (79.06%) were seronegative. Existing seropositive and suspicious samples were subjected to PRNT. Eleven (26.19%) of the 42 seropositive samples were identified to carry specific West Nile virus antibodies. None of the suspicious specimens had PRNT seropositivity. Eleven (3.97%) of 277 breeding horses were identified with specific West Nile virus antibodies. No viral RNA could be detected by Real Time Revers Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (rtRT-PCR) in 42 samples seropositive by BNV Ab ELISA test.

Key words: ELISA, PCR, PRNT, West Nile Virus

Giriş

Batı Nil Virüsü (BNV) insanlar, atlar, kuşlar ve çeşitli vahşi hayvanlarda ensefalit vakası ile seyreden salgınlara sebep olabilen, arthropodlarla bulaşan, *Flaviviridae* ailesine mensup zoonoz bir hastalık etkenidir [2,4,8]. Virüsün doğal taşıyıcısı *Culex* ve *Aedes* cinsi sivrisineklerdir. Yabani kuşlarla bu arthropodlar arasında önemli bir geçiş zincirine sa-

hip olan virüs insan, at, köpek, koyun gibi memeli hayvanlar ile tavuk gibi evcil kanatlı hayvanları da enfekte edebilmektedir [18,19,20].

Ülkemizin, kuşların önemli göç yolları arasında yer alması enfeksiyonun yayılması açısından önem arz etmektedir. Aynı zamanda ülkemizin at yetiştiriciliği açısından oldukça ileri bir noktada olması, enfeksiyonunun at yetiştiriciliğinde sebep olabile-

* A.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde tamamlanan bir Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

Yazışma adresi / Correspondence: Prof. Dr. Taner Karaoğlu, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara E-posta: taner.karaoğlu@ankara.edu.tr

ceği performans düşüklüğü ve kayıplardan dolayı Batı Nil Virüs enfeksiyonunu ekonomik yönden önemli bir hale getirmektedir. Bu çalışmanın yapıldığı coğrafi konumun göçmen kuşların göç yolları üzerinde yer alması, bölgenin ılıman iklim kuşağında bulunması ve sulak arazi oranının yüksek olması ve araştırmada örneklenen yerleşik at popülasyonu yanında yılın belirli zamanlarında yarış programı kapsamında olan Şanlıurfa'ya ülkenin değişik şehirlerinden gelen yarış atları için de Batı Nil Virüs enfeksiyonu riskinin algılanması ve bu yolla yurdun değişik bölgelerine virüs iletimi olasılıklarının değerlendirilmesi adına Şanlıurfa'da yerleşik atlarda Batı Nil Virüsü enfeksiyonunun serolojik ve virolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Örneklenen İşletmeler

Çalışmada Şanlıurfa merkez ve çevre ilçelerinde damızlık at yetiştiriciliği yapan 10 ayrı işletmede bulunan toplam 277 attan alınan kan serumu örnekleri kullanıldı (Tablo 1). Mevcut işletmelerde bulunan atların yaşamları boyunca buldukları il/ilçe'den farklı bir yere götürülmedikleri ve Batı Nil virüsü enfeksiyonuna karşı aşılanmadıkları öğrenildi.

Tablo 1. Örnekleme yapılan işletmeler.

İşletme No	İşletmenin Bulunduğu İlçe	Örneklenen Hayvan Sayısı
I	Merkez/Eyyübiye	21
II	Merkez/Karaköprü	51
III	Siverek	47
IV	Siverek/Haliliye	44
V	Suruç	53
VI	Hilvan	47
VII	Akçakale	5
VIII	Halfeti	2
IX	Viranşehir	1
X	Bozova	6
Toplam		277

Hücre Kültürü

BNV'nin üretilmesi, virüsün titresinin hesaplanması ve Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testinde (PRNT) Vero E6 (ATCC CCL81-Afrika Yeşil Maymun Böbrek) devamlı hücre kültürü kullanıldı.

Virüs

Araştırmada, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarı koleksiyonunda mevcut BNV suşu (West Nile virus NY-99 strain) kullanıldı. Virüs Vero E6 hücre kültüründe üretildi ve PRNT'de 3×10^6 /mL plak oluşturan ünite titresinde kullanıldı.

Kan Serum Örneklerinin Hazırlanması

Silikonlu tüplere alınan kan, pıhtılaştıktan sonra 2000 devirde 10 dakika santrifüj edilip serumları ayrıldı. Serumlar test edilinceye kadar -20°C 'de muhafaza edildi. PRNT öncesi serum örnekleri 56°C 'de 30 dakika tutulmak suretiyle inaktive edildi.

BNV Ab ELISA Testi

BNV proteinlerine karşı oluşan antikorların tespiti amacıyla bütün serum örnekleri INGEZIM West Nile COMPAC antikor ELISA testine tabi tutuldu. Testin uygulama basamakları ve değerlendirme ölçütleri üretici firmanın belirlediği kriterlere göre yapıldı.

BNV IgM ELISA Testi

BNV Ab ELISA test kiti ile seropozitif olarak tespit edilen örnekler ile şüpheli olarak değerlendirilen bütün serum örnekleri BNV'ye spesifik akut dönem antikorlarının tespiti amacıyla IDEXX West Nile Virus IgM Antikor ELISA testine tabi tutuldu. Testin yapım aşamaları ve değerlendirme kriterleri üretici firmanın belirttiği prosedüre göre uygulandı.

Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT)

BNV Ab ELISA test kiti ile seropozitif olarak tespit edilen 42 serum örneği ile şüpheli olarak değerlendirilen 16 serum örneği plak redüksiyon nötralizasyon testine tabi tutuldu. Virüs kontrol gözlerindeki plak sayısının % 80 ve daha yüksek oranda azalmasına yol açan serum sulandırması o örneğin BNV'ye karşı spesifik nötralizan antikor taşıdığı yönünde değerlendirildi.

Real Time Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (rtRT-PCR)

BNV Ab ELISA test kiti ile seropozitif (42) ve şüpheli olarak değerlendirilen (16) serum örnekleri rtRT-PCR'a tabi tutuldu. Öncelikle viral ge-

nomik RNA izolasyonu amacıyla ticari QIAamp Viral RNA Mini Kiti üretici firmanın önerdiği Şekilde kullanılarak RNA ekstraksiyonu yapıldı. Söz konusu örnekler viral genomik RNA varlığı açısından gerçek zamanlı ters transkripsiyonlu poli-

meraz zincir reaksiyonuna tabi tutuldu. Bu amaçla Thermo Fisher tarafından geliştirilmiş Lineage-1 ve Lineage-2'yi tespit etme özelliğine sahip primer ve prob kullanıldı.

Testte kullanılan Primer ve prob dizaynları aŐađıda sunuldu.

NS2A-Fwd	5'-GGG CCT TCT GGT CGT GTT C-3'
NS2A-Prob	5'-FAM-CCA CCC AGG AGG TCC TTC GCA A-TAMRA-3'
NS2A-Rev	5'-GAT CTT GGC YGT CCA CCT C-3'

Kullanılan internal pozitif kontrol için primer ve prob dizaynları aŐađıda sunuldu.

NS5-2-Fwd	5'-GAA GAG ACC TCG GGC TCA TG-3'
NS5-2-Prob	5'-VIC-CCA ACG CCA TTT GCT CCG CTG-TAMRA-3'
NS5-2-Rev	5'-CGG TAG GGA CCC AAT TCA CA-3'

Realtime RT-PCR (rtRT-PCR) reaksiyon karışımını hazırlamak için gerekli bileŐenler ve miktarları tablo 2'de gösterildi.

Tablo 2. rtRT-PCR karışım bileŐenleri ve miktarları.

BileŐen	Miktar(μ L)
2 x Reaksiyon Karışımı	12,5 μ L
Primer Forward (50 pmol/ μ L)	1 μ L
Primer Reverse (50 pmol/ μ L)	1 μ L
DNase, RNase ari H ₂ O	5,0 μ L
Superscript mix	0,5 μ L
Toplam	20 μ L

Elde edilen rtRT-PCR reaksiyon karışımı 5 μ L RNA ekstraktı ile +4°C'deki soğutucu bloklarda karıştırıldı. Elde edilen 25 μ L üründeki saptama CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System cihazı ile tablo 3'de verilen süre ve döngülerden oluşan programla gerçekleştirildi.

Tablo 3. Real Time RT-PCR ısı döngüsü ve döngü sayısı.

Safhalar	Sıcaklık	Süre	Siklus sayısı
cDNA Sentezi	50°C	15 dk	1
Ön Denatürasyon	95°C	120 sn	1
Denatürasyon	95°C	10 sn	35
Bağlanma/Uzama	60°C	30 sn	

Test örneklerine ait sonuçlar pozitif ve negatif kontrollerle karışılaştırılarak değerlendirildi. Pozitif

kontrol ve pozitif örneklerde Ct değerı 35'den küçük ve yükselen bir sigmoid logaritmik eğri olarak, Negatif kontrol ve negatif örneklerde ise Ct değerı 35'ten büyük ve düz bir floresan çizgisi Şeklinde izlendi. Ct değerı 30-35 arasında olan örnekler ise zayıf pozitif olarak değerlendirildi ve tekrar test edildi.

Bulgular

BNV Ab ELISA ve BNV IgM ELISA Testi Sonuçları

Örnekleme yapılan toplam 10 adet ŐiŐetmenin 6 tanesinde Batı Nil virüsüne ait antikor varlığı tespit edildi. Toplam 277 ata ait kan serum örneğinin BNV Ab ELISA ile kontrolü sonucunda örneklerin 42 adeti seropozitif olarak belirlendi. On altı adet serum örneği ise testin değerlendirme kriterine göre Şüpheli olarak kabul edildi. Söz konusu Şüpheli örnekler ikinci kez aynı teste tabi tutuldu ve yine Şüpheli aralıkta değerlendirildiler. Seropozitif olarak tespit edilen örnekler (42 adet) ile Şüpheli aralıkta kalan örnekler (16 adet) IgM ELISA testi ile ikinci bir teste tabi tutularak söz konusu seropozitif hayvanların kaçının akut enfekte olduğunun tespiti yapıldı. Söz konusu 42 seropozitif örnekten 1 adeti IgM pozitif olarak bulunurken geri kalan 41 örnek IgG olarak değerlendirildi. Şüpheli aralıkta yer alan 16 adet örnekten hiçbirinde IgM varlığı tespit edilmedi. Örneklere uygulanan ELISA testlerinin sonuçları tablo 4'de sunuldu.

Tablo 4. İşletmelere göre ELISA sonuçlarının dağılımı.

İşletme No	İşletmenin Bulunduğu İlçe	Örneklenen Hayvan Sayısı	Pozitif (%)	
			BNVAb (+)	IgM (+)
I	Merkez/Eyyübiye	21	3 (14.28)	-
II	Merkez/Karaköprü	51	5 (9.8)	-
III	Siverek	47	7 (14.89)	-
IV	Siverek/Haliliye	44	3 (6.81)	1* (2.27)
V	Suruç	53	11 (20.75)	-
VI	Hilvan	47	13 (27.65)	-
VII	Akçakale	5	0	-
VIII	Halfeti	2	0	-
IX	Viranşehir	1	0	-
X	Bozova	6	0	-
	Toplam	277	42 (15.16)	1 (0.36)

* Örnek aynı zamanda BNV Ab (+) örneklerden biri

Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT)

Sonuçları

ELISA testi ile tespit edilen seropozitifliklerin Batı Nil virüs'ü'ne karşı spesifik olup olmadığının saptanmasına yönelik olarak BNV Ab ELISA testi ile seropozitif olarak tespit edilen 42 örnek ile şüpheli aralıkta değerlendirilen 16 örnek Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testine alındı. Seropozitif 42 örnekten 11 adedi (%26.19) PRNT'de pozitif olarak

tespit edildi ve bu bireyler BN virüse karşı spesifik antikor oluşturan bireyler olarak kabul edildi. IgM ELISA testi ile seropozitif olarak tespit edilen bir örnek PRNT'de negatif sonuç verdi. BNV Ab ELISA testi ile şüpheli aralıkta değerlendirilen örneklerin hiçbirinde PRNT seropozitifliği saptanmadı. BNV Ab ELISA ve PRNT sonuçları karşılaştırmalı olarak tablo 5'de sunuldu.

Tablo 5. BNV Ab ELISA ve PRNT sonuçlarının ilçelere göre dağılımı.

İşletmenin Bulunduğu İlçe	Örneklenen hayvan sayısı	ELISA Pozitif hayvan sayısı (%)	PRNT Pozitif hayvan sayısı (%)
Merkez/Eyyübiye	21	3 (14.28)	1 (4.76)
Merkez/Karaköprü	51	5 (9.8)	4 (7.84)
Siverek	47	7 (14.89)	3 (6.38)
Siverek/Haliliye	44	3 (6.81)	0
Suruç	53	11 (20.75)	1 (1.88)
Hilvan	47	13 (27.65)	2 (4.25)
Akçakale	5	0	0
Halfeti	2	0	0
Viranşehir	1	0	0
Bozova	6	0	0
Toplam	277	42 (15.16)	11 (3.97)

Real Time Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

BNV Ab ELISA pozitif 42 ve şüpheli 16 adet örneğin ekstraksiyonu yapıldı ve elde edilen ürünler

Real Time RT-PCR ile test edildi. Örneklerin hiçbirinde Lineage 1 ve Lineage 2'ye ait BNV genomik RNA'sı tespit edilemedi.

Tartışma ve Sonuç

Virüs ilk kez Uganda'da Batı Nil adı verilen bölgede yüksek ateşli bir kadın hastadan izole edilmiştir [17]. BNV'nin sebep olduğu at ensefaliti olguları ise ilk kez 1960'lı yılların başlarında Mısır ve Fransa'da bildirilmiştir [3]. Batı Nil virüs enfeksiyonu çeşitli zamanlarda Asya, Afrika, Orta doğu, Balkanlar, Avrupa'nın doğusu ve güneyinde atlar ve diğer memelilerde salgınlara neden olmuştur.

Güney Afrika'da 1974 yılında BNV'nin sebep olduğu yaklaşık 10.000 ateşli insan olgusu, en büyük BNV salgını olarak bilinmektedir [3]. Romanya'da 1996 yılında BNV, arboviral ensefalitin büyük bir sebebi olarak ortaya çıkmış olup, altısı ölüm ile sonuçlanan 393 ensefalitli insan olgusu bildirilmiştir. Bindokuzyüz doksanaltı yılından sonra insanlarda ve atlarda BNV ensefalit olgularının Akdeniz havzasında, Rusya ve Avusturya'da hızlı bir şekilde arttığı bildirilmiştir [3].

Ülkemizde Batı Nil virüs enfeksiyonu ile ilgili insanlarda da yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu konuda yapılmış ilk serolojik araştırmada İzmir, Erzurum, Adana ve Diyarbakır illerinde beş yaş altında, 6-15 yaş arasında ve 16 yaş üzerinde olmak üzere üç farklı yaş grubundan alınan toplam 559 serum örneğinde hemaglutinasyon inhibisyon testiyle Batı Nil veya buna benzer bir ajanla meydana gelen bir enfeksiyonun ülkemizde varlığı gösterilmiştir [9].

Serter [14] tarafından yapılan bir araştırmada 1966 yılında İzmir ve civarından sinirsel belirtilerle hastaneye gelen bireylerin üçte birinin bu ajanlarla enfekte olduğu ve bunların çoğunun Arbovirüsler tarafından meydana gelen enfeksiyonlar olduğu ileri sürülmüştür. Serter tarafından 1964-1966 yılları arasında İzmir ve civarında 20 hastanın kan serumlarında arbovirüslerin araştırıldığı araştırma bulguları, Batı Nil başta olmak üzere bazı Arbovirüsler için pozitif reaksiyonları ve muhtemelen geçirilmiş enfeksiyonları işaret etmektedir.

Araştırıcı benzer şekilde 1968'de İzmir ve çevresinde tick-borne virüs meningoensefalitlerini araştırmış ve Tick-borne, West Nile, Dengue Fever, Tahyna ve Sindois virüslerine karşı antikor varlığını tespit etmiştir [15].

Meço [10] Güneydoğu Anadolu Bölgesinde 1970'lerde yaptığı bir çalışmada 937 bireye ait kan

serumu örneğinde hemaglutinasyon inhibisyon testi ile BNV seropozitifliğini araştırmış ve bu bölgedeki farklı illerde %38 - 47.8 arasında değişen oranlarda seropozitiflik bulmuş ve seropozitifliğin yaşla birlikte arttığını vurgulamıştır.

Serter'in 1980'de yürüttüğu bir başka çalışmada ise Ege illerinde yaptığı örneklemeelerde hemaglutinasyon inhibisyon testi ile 1074 bireyin %29,1'inde virüse spesifik antikorlar saptanmış, bunun %74'ü de nötralizasyon testi ile doğrulanmıştır [16]. Fakat elde edilen verilerin yüksek oranda Flavivirüsler arasında meydana gelen antijenik çapraz reaksiyonlardan kaynaklandığı belirtilmiştir.

Batı Nil virüs enfeksiyonu ülkemizde son 15 yıl içerisinde özellikle at yetiştiriciliği yapılan işletmelerde önemli bir enfeksiyon olarak karşımıza çıkmaktadır. Ülkemizde yapılan bildirimler incelendiğinde enfeksiyonun özellikle ilkbahar yaz mevsimlerinde havanın ısınması ile artış gösterdiği, göçmen kuş popülasyonlarının durak yerlerinde ve sulak arazi oranının fazla olduğu bölgelerde yayılımı sahip olduğu görülmektedir [5].

Özkul ve ark. (13) farklı türlerin kan serumlarına uyguladıkları PRN testinde 40 katır örneğinin 1'inde (%2.5), 100 sığır örneğinin 4'ünde (%4), 114 köpek örneğinin 43'ünde (%13.5), 259 at örneğinin 35'inde (%13.5), 88 insan örneğinin 18'inde (%20.4) ve 100 koyun örneğinin 1'inde (%1) batı Nil virüs nötralizan antikorlarını tespit etmiş, elde edilen sonuçları geniş bir memeli yelpazesinin virüse maruz kaldığı şeklinde değerlendirmiştir.

Bu alışmada Şanlıurfa merkez ve evre ilçelerinde yerleşik bulunan ve sağlıklı görünen Batı Nil virüs enfeksiyonunun son konakçısı olan damızlık atlarda hastalığın serolojik ve virolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla Şanlıurfa merkez ve çevresindeki ilçeleri kapsayan toplam 10 farklı merkezde yer alan ve mevcut yerlerinden örnekleme anına kadar farklı bir yere götürülmeyen ve yer değişikliği yapılmayan toplam 277 sağlıklı görünümlü damızlık ata ait kan serumu örnekleri kullanılmıştır. Söz konusu örnekler öncelikle Batı Nil virüsüne karşı antikor ELISA testine tabi tutulmuş, test edilen toplam 277 ata ait kan serumu örneğinin 42 adedinde (%15.16) antikor varlığı saptanmıştır. On altı adet serum örneği testin değerlendirme kriterine göre şüpheli aralıktaki bulunmuş bu sebeple 2.

kez aynı teste tabi tutulmuş ve yine şüpheli aralıkta saptanmıştır.

Çalışmada örneklenen hayvanların kan serumlarına yapılan BNV Ab ELISA testi ile öncelikli olarak hayvanların enfeksiyona maruz kalıp kalmadığı tespit edildi. Antikor pozitif olarak tespit edilen hayvanlar bu defa Batı Nil virüsü IgM ELISA testine tabi tutularak hangilerinin akut enfekte, hangilerinin ise konvelesan dönemde olduğunun tespitine yönelik bir çıkarıma tabi tutuldular. Bu amaçla seropozitif olarak tespit edilen 42 adet örnek ile 16 adet şüpheli örnek BNV IgM ELISA testine tabi tutuldu. BNV Ab ELISA testi ile seropozitif olarak saptanan 42 örneğin 1 adeti IgM pozitif olarak saptanırken geri kalan 41 örnek IgG pozitif olarak değerlendirildi. Şüpheli 16 örnekten herhangi birisinde ise IgM seropozitifliği saptanmadı. Söz konusu IgM seropozitif hayvanın IV no'lu merkezden örneklendiği ve mevcut 3 adet seropozitifliğin iki adedinin IgG ve bir adedinin IgM şeklinde olduğu sonucuna varıldı (Tablo 4).

Örneklemlerin yapıldığı on adet merkezden 6 adedinde (I, II, III, IV, V, VI) antikor varlığı tespit edilirken, 4 adet merkezden örneklenen hayvanların kan serum örneğinde (VII, VIII, IX, X) antikor varlığına rastlanmadı.

Antikor varlığı tespit edilen merkezler tek tek değerlendirildiğinde (tablo 4); en yüksek seropozitiflik oranı VI no'lu merkezde %27.65 (13/47) olarak tespit edildi. Bunu sırasıyla; V nolu merkezde %20.75 (11/53), III no'lu merkezde %14.89 (7/47), I no'lu merkezde %14.28 (3/21), II no'lu merkezde %9.8 (5/51) ve IV no'lu merkezde %6.81 (3/44)'lik seropozitiflik değerleri takip etti.

Araştırmaya katılan VII, VIII, IX ve X no'lu merkezlerde ise herhangi bir antikor türü yönünden seropozitifliğe rastlanamamıştır. Söz konusu merkezlerde örneklenen hayvan sayısına bakıldığında VII no'lu merkezden 5, VIII no'lu merkezden 2, IX no'lu merkezden 1 ve X no'lu merkezden 6 hayvanın örneklendiği görülmektedir. Bu merkezlerden yapılan örneklemlerden elde edilen sonuçlar enfeksiyonun o işletmelerdeki varlığı veya yokluğu hakkında söz söyleyebilmek için son derece yetersizdir. Ancak örneklem büyüklüğünün biraz daha fazla olduğu komşu ilçelerin sonuçlarına bakıldığında, söz konusu hastalığa yönelik seroprevalansın

%6.81 (IV no'lu merkez) ile %27.65 (VI no'lu merkez) arasında değiştiği görülmektedir.

Batı Nil Virüse ilişkin serokonversiyonların tespiti için üretilen ELISA temelli test sistemleri, Flavivirüs cinsi içindeki diğer virüslere karşı oluşan antikorlar ile çapraz reaksiyon verebilmektedir. Yapılan çeşitli araştırmalarda BNV ELISA Antikor test sistemlerinin St Louis ensefalitis virüs, Japon ensefalitis virüs, Usutu virüs veya tick-borne ensefalitis (TBE) gibi diğer bazı flavivirüslere karşı oluşan antikorlar ile çapraz reaksiyon verebildiği belirtilmektedir. Nitekim Dünya Hayvan Sağlığı Organizasyonu'nun [1] ilgili web sayfalarında da konu ile ilgili dikkat çekilerek, Batı Nil virüs'e karşı serolojik testler içinde en spesifik olan testin PRNT olduğu ifade edilmekte ve önerilmektedir.

Sırbistan'da yapılan bir çalışmada da 2007-2011 yılları arasında 252 attan toplanan serum örnekleri ELISA (Ingezim West Nile Compac ELISA, İspanya) testine tabi tutulmuş ve 72 adet örnek (%28.57) seropozitif olarak tespit edilmiştir. Mevcut 72 seropozitif örneğe yapılan PRNT sonucunda örneklerden 48 adedinin (%19.04) spesifik Batı Nil virüse karşı oluşmuş antikor taşıdığı sonucuna varılmıştır [11].

Bizim çalışmamızda da seropozitif olarak tespit edilen toplam 42 adet ELISA seropozitif ve 16 adet şüpheli örneğe PRNT uygulanmıştır. Test sonucunda toplam 42 adet pozitif serum örneğinin 11 adedinde (%26.19) Batı Nil virüsü antikorunu tespit edilmiştir. PRNT sonuçları göz önüne alındığında örneklemlerin yapıldığı toplam 10 adet merkezin 5'inde Batı Nil virüse karşı spesifik antikor taşıyan bireyler tespit edilmiştir. Örneklemlerin yapıldığı merkezler tek tek değerlendirildiğinde ise Batı Nil virüse karşı oluşmuş spesifik antikor varlığının en yüksek II no'lu merkezde %7.84 (4/51) olduğu tespit edilmiştir. Diğer seropozitif merkezlerde bu oran sırasıyla; III no'lu merkezde %6.38 (3/47), I no'lu merkezde %4.76 (1/21), VI no'lu merkezde %4.25 (2/47) ve V no'lu merkezde %1.88 (1/53) olarak bulunmuştur (Tablo 5). Araştırmada IV, VII, VIII, IX ve X no'lu merkezlerden yapılan örneklemlerde ise Batı Nil virüse spesifik antikor varlığı taşıyan bireylere rastlanmamıştır. ELISA testi ile seropozitif olarak tespit edilen ancak PRNT'de negatif olarak değerlendirilen örneklerdeki ELISA antikor pozitif-

liğinin, aynı grup virüslerle olası çapraz reaksiyonlara bağlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Bölgesel virüs sirkülasyonunun doğrulanmasına yönelik olarak bölgedeki insanlarda yapılan farklı serolojik taramalar da çalışmamızın sonuçlarını destekler mahiyettedir. Şanlıurfa'da ve Siverek ilçesinde 2007 yılında yürütölen bir araştırmada, 181 adet sağlıklı bireyden alınan kan serum örneklerinde indirekt immüfloresan yöntemi kullanılarak virüse spesifik IgG antikorlarının tespiti amaçlanmıştır. Araştırma kapsamında çalışılan örneklerde %16 oranında seropozitiflik elde edilmiş ve bu seropozitifliklerin %9.5'i PRNT ile teyit edilmiştir. Araştırma sonunda bölgedeki sivrisinek hareketliliği ile doğru orantılı olarak bireylerde olası Batı Nil virüs enfeksiyonu varlığı da kanıtlanmıştır [6, 12].

Orta Anadolu bölgesinde 2516 bireyde yapılan başka bir araştırmada ise virüse karşı oluşan IgG antikorlarının ELISA testiyle taraması yapılmıştır. Araştırma sonucunda %0.99 (25/2516) oranında IgG pozitifliği belirlenmiş ve örneklerin %0.56 (14/2516)'sı PRNT ile doğrulanmıştır. Bu araştırma Orta Anadolu'da virüsün bölgedeki aktivitesini ispatlamıştır [7].

Bu araştırma ile Şanlıurfa merkez ve çevre ilçelerinde yerleşik damızlık atlarda enfeksiyonun varlığı ve yaygınlığı araştırılmış, BNV Ab ELISA testi ile % 15.16 (42/277) seropozitif olarak değerlendirilen örneklere yapılan PRNT ile spesifik Batı Nil virüs antikor oranının %3.97 (11/277) olduğu sonucuna varılmıştır. Gerek bu araştırmada elde edilen sonuçlar ve gerekse yukarıda açıklanan diğer araştırma sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, özellikle BNV'a spesifik antikor varlığının tespitinde serolojik testler içinde PRNT'nin yüksek spesifiteye sahip olduğu unutulmamalıdır.

Çalışma kapsamında birinci aşamada BNV Ab ELISA ile seropozitif olarak değerlendirilen 42 örnek ile şüpheli olarak değerlendirilen 16 örneğe (toplam 58 örnek) uygulanan Real Time RT-PCR testinde pozitiflik saptanamadığından moleküler epidemiyolojik değerlendirmeye tabi tutulacak bir veriye ulaşılamamıştır. Enfeksiyona maruz kalan tek tırnaklılarda viremi döneminin olduğu kısa sürdüğu bilinen bir gerçektir. Dolayısıyla çalışma kapsamında örneklenen hayvanlarda örnekleme anında herhangi bir akut hastalık tablosunun da bil-

dirilmemiş olması ve virüsün doğasında tanımlanmış bir uzun süreli viremi bulunmaması sebebiyle bu sonuç normal karşılanmıştır. Bu anlamda virüsün ölkemizdeki sirkülasyonun belirlenmesi için daha geniş saha çalışmalarına gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca zoonoz olan Batı Nil Virüsünün muhtemel insan vakalarına da sebep olabileceği göz önüne alındığında özellikle hastalığın bulaştırılmasında rol oynayan sokucu sinek popölasyonlarının yaşamını daha uzun süre sürdürebildiği, mevsimsel olarak daha ılıman bölgelerde enfeksiyonun her zaman akılda tutulmasında fayda bulunmaktadır.

Araştırma bulguları, çalışmanın yapıldığı coğrafi konumun göçmen kuşların göç yolları üzerinde yer alması, bölgenin ılıman iklim kuşağında bulunması ve sulak arazi oranının yüksek olması enfeksiyonun yayılması açısından önemli ipuçları verirken, araştırmada örneklenen yerleşik at popölasyonu yanında yılın belirli zamanlarında yarış programı kapsamında olan Şanlıurfa'ya ölkeden değişik şehirlerinden gelen yarış atları için de Batı Nil Virüs enfeksiyonu riskinin algılanması ve bu yolla yurdun değerlik bölgelerine virüs iletimi olasılıklarının değerlendirilmesi adına önem arz etmektedir.

Kaynaklar

1. Anonim, (2008). *OIE World Organisation for Animal Health*. Erişim Adresi: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_wnf.pdf , Erişim Tarihi: 1.11.2017.
2. Bernkopf H, Levine S, Nerson R (1953). *Isolation of West Nile virus in Israel*. The Journal of Infectious Diseases, 7: 128-132.
3. Chambers T, Monath T (2003). *The Flaviviruses: Detection, Diagnosis, and Vaccine Development*. Advances in Virus Research (61): 577.
4. Diamond MS (2009). *West Nile Encephalitis Virus Infection: Viral Patogenesis and the Host*. Immune Response 1-3.
5. Ergünay K, Aydoğan S, Menemenlioğlu D, şener B, Lederer S, Steinhagen K, Haşelik G, Pınar A, Özkul A, Us D (2010). *Investigation of West Nile Virus in central nervous system infections of unknown etiology in Ankara, Turkey*. Mikrobiyol Bul, 44(2): 255-262.
6. Ergünay K, Özer N, Us D, Özkul A, şimşek F, Kaynaş S, Ustaçelebi S (2007). *Seroprevalence of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in southeastern Turkey: First evidence for tick-borne encephalitis virus infections*. Vector-Borne Zoonot, 7: 157-161.
7. Ergünay K, Saygan MB, Aydoğan S, Menemenlioğlu D, Turan HM, Özkul A, Us D (2010). *West Nile Virus*

- Seroprevalence in Blood Donors from Central Anatolia, Turkey*. Vector Borne Zoonotic Dis, 10(8): 771-5.
8. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL (2005). *Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease*. Emerg Infect Dis, 11(8): 1174-9.
 9. Heperkan Y, Arı A (1964). *Türkiye'de ARBO virüsleri üzerinde bir çalışma*. Türk Hij Tec Biyol Derg, 24: 113-117.
 10. Meço O (1977). *West Nile arbovirus antibodies with hemagglutinationinhibition (HI) in residents of Southeast Anatolia*. Mikrobiyol Bul, 11: 3-17.
 11. Medic S, Hoven RVD, Petrovic T, Lupulovic D, Nowotny N (2014). *Serological evidence of West Nile virus infection in the horsw population of northern Serbia*. Journal of Infection in Developing Countries, 8(7), 914-918.
 12. Özer N, Ergünay K, Şimşek F, Kaynas S, Alten B, Çağlar SS, Ustaçelebi Ş (2007). *West Nile virus studies in the Sanliurfa Province of Turkey*. J Vector Ecol, 32(2): 202-6.
 13. Özkul A, Yıldırım Y, Pınar D, Akçalı A, Yılmaz V, Çolak D (2006). *Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey*. Epidemiol. Infect, 134: 826–829.
 14. Serter F (1966). *Arthropodlarla bulaşan virus hastalıklarının (Arbovirus enfeksiyonları) memleketimizdeki durumu*. XII. Türk Mikrobiyoloji Kongre raporu, 104.
 15. Serter F (1968). *Tick-borne meningo-encephalitis cases in Izmir area*. EU Tıp Fak Mec, 7(1): 1-13.
 16. Serter F (1980). *Ege Bölgesinde Arbovirus seroepidemiolojisinin mevcut durumu*. Zbl Bakt, (9): 155-61.
 17. Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH (1940). *A neurotropic virus isolated from blood of a native of Uganda*. Am J Trop Med Hyg, 20(4): 471-492.
 18. Taylor RM, Hurlbut HS, Dressler HR, Spangler EW, Thrasher D (1953). *Isolation of West Nile virus from Culex mosquitoes*. J Egypt Med Assoc, 6 (3): 199–208.
 19. Tosun S (2011). *Sorun enfeksiyonlarda yaklaşım ve tedavi*. Batı Nil Virüsü. 3. Türkiye EKMUD Bilimsel Platformu. 1-5 Mart 2011, İstanbul, 203-212.
 20. Zaayman D, Human S, Venter M (2009). *A highly sensitive method for the detection and genotyping of West Nile virus by real time PCR*. J Virol Methods, 157(2): 155-60.