



T.C.

NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ (NKÜBAP)

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ SONUÇ RAPORU

NKUBAP.00.23.AR.14.08 Nolu Proje

“TEKİRDAĞ İLİ *CULICOIDES* (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE) FAUNASININ
BELİRLENMESİ, MAVİ DİL VIRUS VE SCHMALLEMBERG VIRUS VARLIĞI
YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI”

Yürütücü: Yrd.Doç.Dr.Dilek MUZ

Araştırmacılar: Prof.Dr.Bilal DİK

Doç.Dr.Mustafa Necati MUZ

Dr.Rahile ÖZTÜRK

2016

ÖNSÖZ

Enfeksiyöz hastalıklar ruminant yetiştiriciliğinde neden oldukları ölümler, yavru kayıpları, anomalili yavru doğumları ve verim özelliklerinde düşüşlerle büyük ekonomik öneme sahiptirler. Virus kaynaklı enfeksiyonların duyarlı oldukları konağa taşınması ve doğada devamlılıklarını sürdürmelerinde sokucu sinek, kene gibi arthropod vektörlerin önemli rolleri bulunmaktadır. *Culicoides* cinsi sokucu sinekler insan ve hayvanlardan kan emme sırasında taşıdıkları virusları duyarlı konağa naklederler. Bu sinekler arbovirusların mekanik ve biyolojik vektörlüğünde önemli rol oynarken enfeksiyonların bölgeler arasında geçişinde çok etkilidirler. *Culicoides* cinsindeki sinekler; Diptera takımı, Nematocera alt takımı, Ceratopogonidae ailesinde yer alırlar. Dünyada, bugüne kadar bu ailede yaklaşık 1400 tür tanımlanırken Türkiye'de 100'e yakın türün varlığı belirlenebilmiştir. Türkiye arthropod tür çeşitliliği ve hareketliliği açısından önemli bir coğrafik konuma sahiptir. *Culicoides* türleriyle taşındığı bilinen ve Türkiye'de görülen viral hastalıkların vektörleri üzerine yapılan çalışma sayısı azdır. *Culicoides* cinsi sokucu sineklerle bulaşan, ruminantlarda abort, yavru ölümleri ve anomalili yavru doğumlarıyla karakterize bir hastalığa neden olan Scmallenberg virus (SBV) yetiştiricilikte ekonomik öneme sahiptir. Diğer bir arbovirus olan Mavi Dil Virusu (MDV) neden olduğu salgınlar Türkiye'nin değişik bölgelerinde zaman zaman rastlanmaktadır. Mavi Dil salgın bildirimini en son 2013 yılında Trakya Bölgesi'nden yapılmıştır. Marmara Bölgesi'nde rapor edilmiş SBV vektörlüğü ve salgınların yoğun görüldüğü Trakya Bölgesi'nde MDV vektörlüğü ile ilgili yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile Tekirdağ ili sınırları içerisinde toplanan *Culicoides* örneklerinin tür çeşitliliği tanımlanmış, MDV ve SBV varlığının araştırılması sağlanmıştır. SBV vektör ilişkisine yönelik Türkiye'de ilk veriler elde edilmiş, Trakya Bölgesi için MDV vektör ilişkisine yönelik ilk veriler elde edilmiştir.

Proje Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (NKÜBAP) tarafından NKUBAP.00.23.AR.14.08 numarası ile desteklenerek Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı bünyesinde yürütülmüştür. Projeye maddi destek sağlayan Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, dizi analizi reaksiyonunda emeği geçen NABİLTEM genomik laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

ÖZET

Culicoides cinsi sokucu sinekler arbovirusların mekanik ve biyolojik vektörlüğünde önemli rol oynarken enfeksiyonların bölgeler arasında geçişinde çok etkilidirler. *Culicoides* türleriyle taşındığı bilinen ve Türkiye’de görülen viral hastalıkların vektörleri üzerine yapılan çalışma sayısı azdır.

Bu projenin amacı, Tekirdağ ili *Culicoides* tür çeşitliliğinin belirlenmesi, Mavi Dil virus (MDV) ve Schmallenberg virus (SBV) yönünden varlığının araştırılmasıdır. Bu amaçla Haziran-Eylül 2015 döneminde, Tekirdağ il ve ilçelerinden *Culicoides* örnekleri toplanmıştır. *Culicoides* örneklerinin moleküler analizleri ve virus varlığı yönünden araştırılmıştır. Bu amaçla *Culicoides* genomu ITS-1 genine spesifik PCR testleri ve MDV ve SBV varlığının araştırılması amacıyla real time-PCR testleri gerçekleştirilmiştir. Saha çalışmalarında toplam 27 seyahat sonucu 812 adet *Culicoides* örneği elde edilmiştir. Toplanan örneklerin mikroskopik incelemelerine göre; *C.newsteadi*, *C.schultzei*, *C.obsoletus*, *C.nubeculosus* komp., *C.punctatus*, *C.circumscriptus*, *C.obsoletus* komp., *C.gejgelensis*, *C.festivipennis*, *C.longipennis*, *Culicoides* sp., *C.pulicaris*, *C.picturatus*, *C.odiatus*, *C.kurensis*, *C.flavipulicaris* türlerin varlığı tanımlanmıştır. Yapılan moleküler analiz sonucunda 5 tür *Culicoides* örneği sekansı yapılmıştır. Proje sonunda, elde edilen veriler yönünde SBV ve MDV için vektör potansiyeli bulunan *Culicoides* türlerinin Tekirdağ ili içerisindeki örneklemelerde rastlanmıştır. Real time-PCR testlerinin sonucunda örnekler MDV yönünden negatif bulunurken, SBV varlığı yönünden bir örnek pozitif bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Culicoides*, MDV, SBV, ITS-1 gen, PCR

ABSTRACT

Culicoides insect flies play an important role in the mechanical and biological vector of arboviruses, and are very effective in the transmission of infections between regions. The number of studies carried out on vectors of viral diseases known to be carried by *Culicoides* species and seen in Turkey are few.

The aim of this project is to determine the *Culicoides* species diversity of Tekirdağ province, the existence of Blue Tongue virus (BTV) and Schmallenberg virus (SBV). For this purpose, *Culicoides* samples were collected from Tekirdağ province in June-September 2015 period. Molecular analysis of *Culicoides* samples and investigation for presence of viruses were performed. For this purpose, *Culicoides* genomic ITS-1 gene-specific PCR tests and qPCR tests were carried out. In the field studies, 817 *Culicoides* samples were obtained from total 27 travels. According to the microscopic examinations of collected samples; *C. newsteadii*, *C. schultzei*, *C. obsoletus*, *C. nubeculosus* komp., *C. punctatus*, *C. circumscriptus*, *C. obsoletus* komp., *C. geigelensis*, *C. festivipennis*, *C. longipennis*, *Culicoides* sp., *C. pulicaris*, *C. picturatus*, *C. odiatus*, *C. kurensis*, *C. flavipulicaris* were determined. As the result of the molecular analysis, five *Culicoides* samples sequences were made. At the end of the project, the *Culicoides* specie obtained from Tekirdağ province found to have vector potential for SBV and MDV. As a result of the Q-PCR tests, samples were found to be negative for MDV while a sample for SBV was found positive.

Keyword: *Culicoides*, BTV, SBV, ITS-1 gene, PCR

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	2
ÖZET.....	3
ABSTRACT.....	4
ŞEKİL LİSTESİ.....	6
TABLO LİSTESİ.....	7
1.GİRİŞ.....	8
1.1.GENEL BİLGİLER.....	9
2.GEREÇ VE YÖNTEM.....	11
2.1.Araştırma Yeri ve Zamanı.....	11
2.2.Culicoides örneklerinin yakalanmaları ve tür teşhisleri.....	11
2.3.Nükleik Asit Ekstraksiyonu.....	12
2.4. RT-PCR ve PCR.....	12
2.5.Agar Jel Elektroforezis	14
2.6. Real Time- PCR.....	14
2.7. Dizi Analizi.....	15
3.BULGULAR.....	14
3.1. Culicoides Örneklerinin Tür Çeşitliliği.....	15
3.2. PCR ve Dizi Analizi.....	19
3.3.Real Time PCR.....	22
4.TARTIŞMA.....	23
5.SONUÇ.....	26
6.KAYNAKLAR.....	27

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil.1: Çalışmada kurulan tuzak odakları.....	16
Şekil 2. Aylara göre <i>Culicoides</i> tür dağılımı.....	19
Şekil 3: <i>Culicoides</i> örneklerinin <i>panCul</i> primerleri ile yapılmış PCR sonuçları.....	20
Şekil 4: Dizi analizi yapılan <i>Culicoides</i> ITS-1 gen bölgelerinin filogenetik ağacı.....	21
Şekil 5: Mavi Dil Virus (BTV) real time-PCR reaksiyonu grafiği.....	22
Şekil 6: Schmallenberg Virus (SBV) real time-PCR reaksiyonu grafiği.....	23

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: RT-PCR uygulamaları.....	13
Tablo 2: <i>Culicoides</i> örnekleri için kullanılan primerler.....	13
Tablo 3: PCR uygulamaları.....	14
Tablo 4: RealTime PCR uygulamaları.....	15
Tablo 5: Tekirdağ il ve ilçelerinden toplanan <i>Culicoides</i> türleri.....	18

1. GİRİŞ:

1.1. GENEL BİLGİLER

Culicoides cinsi dişi sinekler 0,5- 3 mm büyüklüğünde küçük sokucu sineklerdir. Yaşam döngülerinde üreme ve doğada bulunma zamanları mevsimsel olması *Culicoides* türlerinin coğrafik bölgelere göre değişkenlik göstermesine neden olmaktadır. Böylece kıtalara, ülkelere ve hatta bölgelere göre tür çeşitliliği göstermektedir. *Culicoides* cinsindeki sineklerin dişileri insan ve hayvanlardan kan emerek beslenirler. Asıl önemleri hayvan ve insanlarda hastalık oluşturan önemli viral ve paraziter hastalıklara vektörlük yapmalarından kaynaklanmaktadır (Dik 1997). Biyolojik veya mekanik vektörlüğünü yaptıkları arbovirusların kan emme sırasında memeli konağa bulaşmasında önemli bir rol oynarlar. Uçuş kapasiteleri sayesinde, virusların bir yerden farklı bir bölgeye taşınmasına neden olmaktadır.

Culicoides'lerin biyolojisi iklime bağlıdır. *Culicoides*'lerin biyolojik vektörü olduğu enfeksiyonlar sadece yaşam siklusunu tamamlayabileceği iklim kuşağında görülmektedir. Ergin *Culicoides*'lerin en aktif olarak 18-29°C arasında, 10°C altı ve 30°C nin üzerinde inaktif, 0°C de iki saat kadar yaşayabileceklerini göstermiştir. Olgun *Culicoides*'lerin yaşam süreleri yaklaşık 2 ay kadardır ve bu süre içinde 2-3 nesil verirler. Deniz seviyesinden 4200 mt yüksekte yaşayabilen türleri yanında gelişimi iki yılı bulan kutup türleri, toprak altında bir yıl canlı kalabilen pupalardan, rüzgarlar ile kıtalar arasında taşınabilen türlere kadar çok farklı genetik özelliğe sahip türleri mevcuttur.

Culicoides cinsindeki sinekler; *Diptera* takımı, *Nematocera* alt takımı, *Ceratopogonidae* ailesinde yer alırlar. Bazı *Culicoides* türleri vektörlük görevleri vardır. Dünyada, bugüne kadar yaklaşık 1400 *Culicoides* türü tanımlanmıştır ve 50'den fazla türden virüs izole edilmiştir (Mellor ve ark 2000). Türkiye'de ise bugüne kadar 60 civarında tür belirlenmiştir. *Culicoides* türlerinin vektörlük yaptıkları virüsler arasında en önemlileri; Mavi Dil Virusu (MDV), Schmollenberg Virus (SBV), Epizootic Haemorrhagic Disease Virusu, Afrika At Vebası Virusu, At Ensefalitis Virusu, Akabane Virus (AKAV), Ephemeral Fever Virusu (EFV)'dur (Mellor ve Wittmann 2002). Arbovirus (Arthropod kaynaklı virus) salgınları yetiştiricilikte hayvan sağlığını tehdit etmesi, oluşan ölümler ve verim kayıpları nedeniyle özellikle yetiştiricilikte ekonomik

önemleri vardır. Arbovirus salgınlarının ortaya çıkışında taşıyıcı vektörlerin epidemiyolojik öneme sahip olduklarından *Culicoides* fauna çeşitliliğinin araştırılması ve bilinmesine gerek duyulmaktadır. Arbovirus enfeksiyonları özellikle dünyanın ılıman iklime sahip bölgelerinde ciddi sorunlar doğurmaktadır. Örneğin Avrupa' da Portekiz, Güneybatı İspanya, İtalya, Türkiye, Kıbrıs ve Balkan ülkelerini içine alan geniş alanda görülen MDV salgınları küçük ruminant yetiştiriciliğinde ciddi ekonomik kayıplara yol açmıştır.

Mavi Dil (MD), enfeksiyonu ruminant yetiştiriciliğinde abort, anomalili yavru doğumları ve ölü doğumlara karakterize hemorajik bir hastalıktır. Virus ilk kez 19. yüz yılda Güney Afrika' daki ithal Merinos ırkı koyunlarda tanımlanmıştır. Sonraki yıllarda Afrika' da yayılmış ve hemen hemen tüm kıtalarda (Amerika, Afrika, Avustralya ve Asya) Türkiye'nde içinde yer aldığı 40° güney ve 53° kuzey enlemleri arasındaki bölgelerde enzootik bir hastalık olarak tanımlanmıştır. MD Türkiye' de ilk kez 1977 yılında Batı Anadolu Bölgesi'nde Aydın ilinde tanımlanmıştır (Yonguç ve ark. 1982) ve bugüne kadar Türkiye'nin değişik bölgelerinde zaman zaman bildirilmiştir (Yonguç ve ark 1982, Ertürk, 1994, Ertürk ve ark 2004, Mellor ve Witmann 2002, Özkul ve ark. 2009).

Etken Reoviridae familyasında içerisinde Orbivirus genusunda yer alan Mavi Dil virusu (Bluetongue virus, MDV) olarak adlandırılır. Çoğunlukla koyunlarda, gebe sığırlarda ve bazı geyik türlerinde hemorajik bir hastalığa neden olmaktadır (Mertens ve ark. 2004). Enfeksiyon gebe sığırlarda abort, anomalili yavru doğumlarına yol açar. MDV genomu linear yapıda, çift iplikçikli on segmentten oluşan RNA molekülü yaklaşık 19,2 kb büyüklüğündedir. Bu güne kadar virusun 26 serotipi tanımlanmıştır. Ülkemizde meydana gelen MD salgınlarında serotip 4, 9 ve 16 bildirilmiştir. Enfeksiyözite özelliğini -70°C ve daha düşük ısılarda yıllarca koruyan virus, 20°C ve 4°C de dayanıklı ancak -20°C ve 60°C de hızla inaktive olmaktadır (Roy 1989; Ertürk ve ark 2004).

MD enfeksiyonu *Culicoides* cinsine bağlı sokucu sinekler aracılığı ile memeli konakçılara nakledilirler. Hastalığın naklinde temel rol oynayan sinek varlığı daha önce Türkiye'de bildirilen *C. imicola* olarak kabul edilse de, *C. obsoletus* ve *C. pulicaris* gibi diğer türler de duyarlı bireyler arasında virus naklini başarıyla gerçekleştirebilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı serotiplerin belirli *Culicoides* türleri tarafından nakledildiği ortaya konulmuştur (Mellor ve Witmann, 2002). Hastalığın dominant vektörü olabilecek *C.imicola'* nın daha çok güney ve batı Anadolu bölgelerinde

olduğu, Trakya'da ise bu sokucu sineğe sadece Gelibolu yarımadasında rastlandığı saptanmıştır (Tufan, 2006). Trakya'nın Gelibolu dışında kalan bölgelerinde ise en sıklıkla tespit edilen tür *C.obsoletus* olarak bildirilmiştir. MDV' na vektörlük yaptığı belirtilen *C. imicola*, *C. pulicaris* kompleks ve *C.obsoletus* kompleks türlerinin ülkemizde bulunduğu tespit edilmiştir (Dik 1993, Dik ve Dinçer 1992, Dik ve ark 2006, Dik 2007). Türkiye'nin iç ve iç-batı bölgelerinde yapılan bir çalışmada; *C.circumscriptus*, *C.punctatus* ve *C.kibunensis* örneklerinde One Step RT-PCR'da MDV viral genom varlığı saptanmıştır.

SBV enfeksiyonu ilk kez 2011 yılında Almanya ve Hollanda'da hipertermi ve süt verimi düşüklüğü görülen ineklerde tanımlanmıştır (Hofmann ve ark 2012). Bazı vakalarda gebe koyun ve sığırlarda MD benzer klinik tablosu ile bildirilmiştir. Abort, kongenital anomalili yavru doğumlarına neden olmaktadır. Virus *Bunyaviridae* ailesinin *Orthobunyavirus* genusunda *Simbu* antijenik grup içerisinde yer alır. Aynı grup içerisindeki Akabane, Aino ve Shamonda virusları ile benzerliği vardır. Virus zarlı sferik yapıda yaklaşık 80-120nm büyüklüğünde kapside sahiptir. Viral genom negatif polariteli, 3 segmentten oluşan RNA molekülünü içerir. Teşhiste sıklıkla kullanılan bölge S segmenti olup virus teşhisi için RT-PCR ve RT-qPCR kullanımı önerilmektedir. Kuzey Avrupa'da tanımlanan enfeksiyon orta ve güney Avrupa'da da bildirilmiştir. Ağustos 2012'de 5500 den fazla SBV enfeksiyonu kuzey Avrupa'da sığırlarda tanımlanmıştır. Sığırlarda olduğu kadar koyunlarda da özellikle abort ve anomalili yavru doğumlarında virus varlığı bildirilmiştir (Doceul ve ark 2013, Hubalek ve ark 2014). Türkiye'de yapılan çalışmalarda virus varlığı serolojik ve moleküler yöntemlerle gösterilmiştir. Marmara Bölgesi'deki atık vakalarında virusun moleküler teşhisi yapılırken (Yılmaz ve ark 2014), başka bir çalışmada SBV'e karşı antikor varlığı sığır, koyun ve keçilerde tespit edilmiştir (Azkur ve ark 2013). Avrupa'da yapılan çalışmalarda virusun *Culicoides* cinsi sineklerle nakledildiği rapor edilirken Türkiye'de bu konu hakkında yapılan bir çalışma bulunmamaktadır.

Marmara Bölgesi'nde ve ülkemizde son yıllarda rapor edilen, yetiştiricilikte ekonomik kayıplara neden olan bu iki virus enfeksiyonu *Culicoides* cinsi sokucu sineklerle taşındığı bilinmektedir. MDV zaman zaman Türkiye'nin değişik bölgelerinde de rastlanmakta iken (Bolat 1986, Gürtürk ve ark 1980, Mellor ve Wittmann 2002, Mellor ve ark 2008, Yavru ve ark 2009) SBV varlığı son yıllarda bildirilmiştir (Azkur ve ark 2013, Yılmaz ve ark 2014).

Bu çalışmada Trakya bölgesi Tekirdağ ili *Culicoides* tür çeşitliliği araştırılması, MDV ve SBV varlıkları yönünden araştırılması, virus vektör ilişkisi konusunda yeni güncel verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Trakya bölgesi Tekirdağ ili *Culicoides* tür çeşitliliği araştırılmasında klasik ve moleküler yöntemler kullanılmıştır. Bu bölgedeki *Culicoides* türlerine ait ITS-1 gen profilleri çıkarılmış, toplanan sinek örneklerinde MDV ve SBV varlıkları Real Time-PCR ile araştırılmıştır.

2.1. Araştırma Yeri ve Zamanı:

Proje kapsamında *Culicoides* örneklemelerinin gerçekleştirmek amacıyla yapılan Tekirdağ il ve ilçelerine seyahatler düzenlenmiştir. Bu amaçla, saha örneklemeleri Süleymanpaşa, Muratlı, Malkara, Hayrabolu, Saray, Kapaklı, Çerkezköy, Marmaraereğlisi, Şarköy ve Çorlu ilçeleri olmak üzere 10 bölgeye seyahat yapılmıştır. Bu araştırmanın saha çalışmaları; 2015 yılı Haziran-Eylül ayları arasında, her araştırma merkezine birer kez gidilerek gerçekleştirilmiştir. Seyahatler ve örnekleme tuzaklarını yeri, iklim koşullarının (sıcaklık, nem koşulları, yağış, rüzgarın yönü gibi) *Culicoides* için uygun olduğu günlerde gerçekleştirilmiştir. Tuzaklar için ahır, ağıl ve çevresindeki sazlıkların olduğu bölgeler öncelikli olarak saha çalışma alanı olarak tercih edilmiştir.

2.2. *Culicoides* örneklerinin yakalanmaları ve tür teşhisleri

Saha çalışmalarında 220 W siyah floresan lamba, fan ve toplama ünitesinden oluşan Ondersteepport tipi ışık tuzağı *Culicoides* örnekleri yakalamak amacıyla kullanılmıştır. Tuzaklar, güneşin batışına yakın saatlerde kurularak bırakılmış, ertesi sabah gün doğumundan sonra toplanmıştır. Her tuzak altındaki toplama kutularının içindeki sinekler ayrı steril plastik tüplere konulduktan sonra, üzerlerine örneklerin nereden ve hangi tarihte yakalandıkları kaydedilmiştir. Toplanan *Culicoides* örnekleri Selçuk ve Namık Kemal Üniversitelerinin Veteriner Fakültelerinin Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında, stereo mikroskopta incelenerek tür seviyesinde teşhis edilmiştir. Tür teşhislerinde kanatlardaki beneklerin dağılımları esas alınmıştır. Kanatları beneksiz olan veya kanat beneklerinin dağılımlarına göre teşhis edilemeyen

örnekler *Culicoides* sp. olarak değerlendirilmiştir. *Culicoides* örnekleri tür düzeyinde teşhis edildikten sonra steril eppendorf tüpler içine konulmuştur. Yakalanan *Culicoides* türünün ismini, hangi tarihte ve nerede yakalandığını belirtilen etiketler tüp üzerine yapıştırıldıktan sonra virolojik incelemelere kadar -80 C°de saklanmışlardır.

2.3. Nükleik Asit Ekstraksiyonu

Çalışma moleküler analizlerinin yapılması amacıyla tüplerdeki *Culicoides* örnekleri homojenize edilmiştir. Bu amaçla sayılarına uygun olacak şekilde 250- 750 µl steril PBS (Fosfat buffer solusyonu) içerisinde homojenize edilmiştir. Karışım vortekslelendikten sonra 12000 rpm devirde santrifüj yapılmış, supernatant steril başka bir tüpe aktarılmıştır. *Culicoides* örneklerinden nükleik asit ekstraksiyonu amacıyla bir ticari ekstraksiyon kiti (QIAamp® cador® Pathogen Mini Kit- Qiagen) kullanılmıştır ve kitin kendi protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Bu yöntemde kısaca; 200 µl miktarlarında alınan homojenat sıvılarının üzerine 20 µl proteinaz K ve 100 µl VLX solüsyonu konulduktan sonra vortekslenmiş 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. Karışıma 350 µl ACB buffer konularak mini spincolumnlarına aktarılmış ve santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası mini spincolumnların üzerine 600 µl AW1 solüsyonu ilave edilerek aynı şartlarda santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası mini spincolumn'ların üzerine 600 µl AW2 solüsyonu ilave edilmiş ve aynı şartlarda tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası mini spincolumnlar 1,5 ml'lik yeni bir eppendorf tüpüne yerleştirilerek üzerine 60 µl elution buffer ilave edilmiş ve 1 dk süreyle santrifüj edildikten sonra mini spincolumn'lar atılmıştır. Eppendorf tüplere toplanan sıvı, Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction (RT-PCR) uygulamalarında kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir.

2.4. RT-PCR ve PCR

Ekstraksiyon sonrası elde edilen RNA'ların cDNA sentezi için ticari bir RT-PCR kiti (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, K1622, Fermentas, Litvanya) kullanılmıştır ve kitin prosedüründe bildirilen metoda uygun olarak birbirini izleyen iki aşamalı reaksiyon gerçekleştirilmiştir (Tablo 1). RT-PCR ve PCR uygulamaları termal döngü cihazında (Biorad, USA) yapılmıştır. Tablo 1'de RT-PCR için kullanılan reaksiyon şartları verilmiştir.

Tablo 1: RT-PCR uygulamaları

Bileşen/Karışım-I	Miktar	Reaksiyon-I
Random hekzamer primer	1 µl	70°C 5dk 4°C 5dk
Nükleaz free su	5 µl	
RNA	6 µl	
Toplam	12 µl	
Bileşen/Karışım-II		Reaksiyon-II
M-MuLVReverse transkriptaz	1 µl	25°C 5dk 37°C 1sa 70°C 5dk
RiboLockRNase inhibitörü	1 µl	
dNTP mix	2 µl	
5X reaksiyon buffer	4 µl	
Toplam	8 µl	

Elde edilen cDNA'lar *Culicoides* genomu ITS-1 genine spesifik seçilmiş primerlerin (Tablo 2) (Cetre-Sossah ve ark 2004) kullanıldığı PCR uygulanmıştır.

Tablo 2: *Culicoides* örnekleri için kullanılan primerler

Primer	Hedef gen bölgesi	Beklenen ürün (bp*)	Primer dizisi	Referans
PanCul-F	ITS-1	300-490	GTAGGTGAACCTGCGGAAGG	Cetre-Sossah ve ark 2004
PanCul-R			TGCGGTCTTCATCGAACCCA T	

* :Baz çifti

PCR uygulamalarında Hot Start Taq polimeraz kiti (Maxima Hot Start Taq DNA Polimerase, Fermentas) setin protokolüne uygun olarak hazırlanarak kullanılmıştır. Toplam reaksiyon karışımı 50 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR uygulamalarındaki cDNA miktarları ekstraksiyonda kullanılan *Culicoides* sayılarına göre 3-8 µl olacak şekilde kullanılmıştır. Tüm PCR uygulamaları için kullanılan ısı şartları ve bileşim miktarları Tablo 3'de gösterildiği gibi yapılmıştır.

Tablo 3. PCR uygulamaları

Bileşen/Karışım	Miktar	Reaksiyon Şartları
10X Taq buffer	5 µl	95°C'de 5 dk 95°C'de 1 dk 56°C'de 1 dk 70°C'de 1 dk 72°C'de 7 dk 35 siklus
MgCl ₂	3 mM	
dNTP	5µl (her bir nükleotid 0,2mM içerir)	
Primer-Forward	1 µM	
Primer-Reverse	1 µM	
Taq DNA polimeraz	2 ünite	
cDNA	3-8 µl	
Nucleaz ari su	Değişken	
Toplam	50 µl	

2.5. Agar Jel Elektroforezis

PCR ürünü olarak çoğaltılan spesifik DNA bölgelerini görüntüleyebilmek amacıyla agar jel elektroforez sistemi kullanılmıştır. Bu amaçla, hazırlanan 0,5xTAE tampon solüsyonu içinde % 2 oranında hazırlanan agaroz (Prona, Amerika) 5 µl/ml oranında EtBr (Invitrogen, Amerika) ilave edilerek hazırlanmıştır. PCR ürünleri sırasıyla konulup 8volt/cm oranında akım ayarlanarak 40 dk sürede DNA bantlarının göçü gerçekleştirilmiştir. Örneklerin pozitifliğinin değerlendirilmesi, bir jel Transilluminatör (WiseDoc) yardımıyla UV ışığı altında jel görüntülenmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir.

2.6. Real Time- PCR

Culicoides örneklerinden izole edilen RNA örneklerinde viral RNA yüklerinin araştırılması amacıyla virotype-BTV RT-PCR (Qiagen, Almanya) ve virotype-SBV RT-PCR (Qiagen, Almanya) kitleri kullanılmıştır. Analizler kitlerin kendi bufferları ile 20 5 µl'lik ayrı hazırlanan karışımlara 5 µl RNA eklenerek hazırlanmıştır. Reaksiyon şartları Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4:RealTime PCR uygulamaları

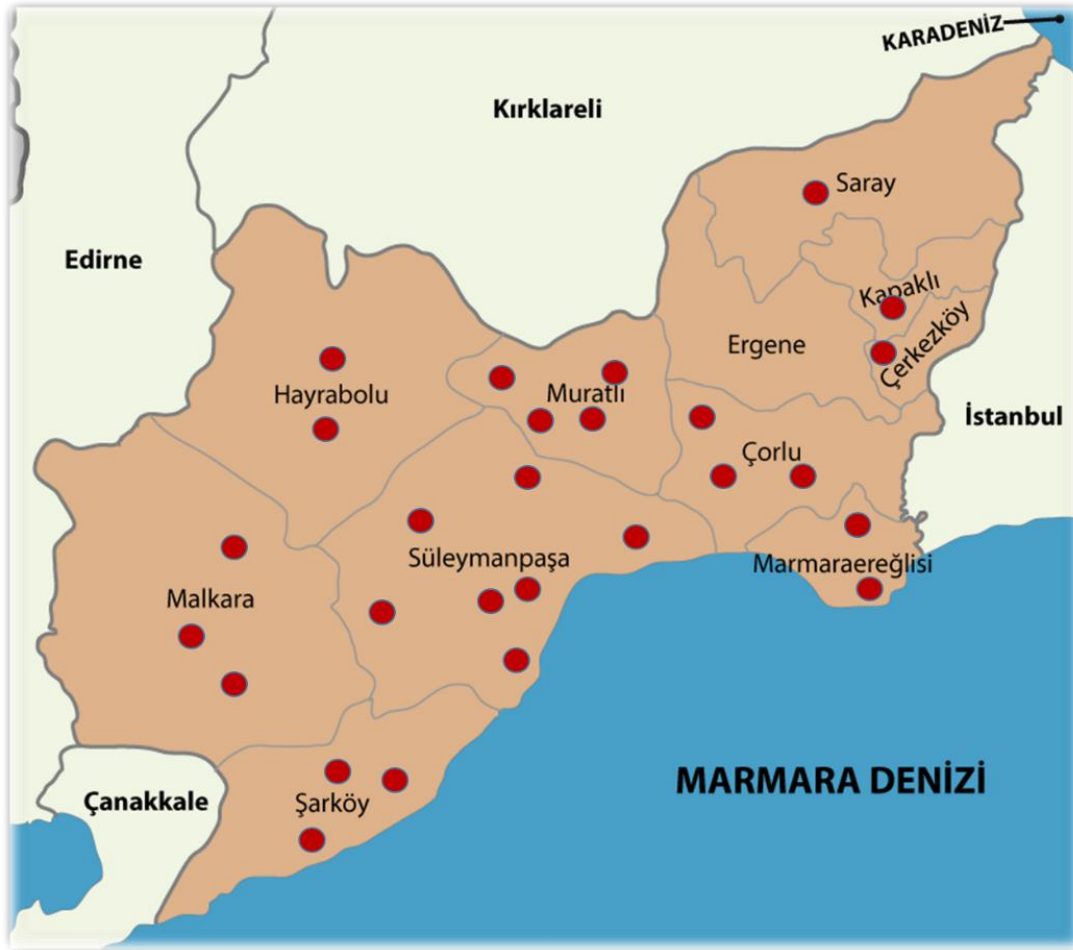
Reaksiyon Şartları		
50°C	20 dakika	
95°C	15 dakika	
95°C	30 saniye	} 45 siklus
56 ⁰ -57°C	45 saniye	
68°C	45 saniye	

2.7. Dizi Analizi

Konvansiyonel PCR'da pozitif bulunan örnekler ticari bir jel ekstraksiyon kiti (Genelute Gel Extraction Kit, Sigma) kullanılarak temizlenip saflaştırıldıktan sonra dizi analizi reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi NKÜ NABİLTEM laboratuvarlarında hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilecek veriler BLAST'ta tanımlandıktan sonra biyoinformatik programlar (Bioedit, Mega) kullanılarak değerlendirilerek filogenetik analizleri yapılmıştır.

3. BULGULAR:

Araştırmanın saha çalışmaları için düzenlenen seyahatlerde toplam 35 odakta ışık tuzakları kurulmuş ve örnekleme yapılmıştır. Bu amaçla, saha örnekleme Süleymanpaşa (7 seyahat), Muratlı (4 seyahat), Malkara (3 seyahat), Hayrabolu (2 seyahat), Saray (1 seyahat), Kapaklı (1 seyahat), Çerkezköy (1 seyahat), Marmaraereğlisi (2 seyahat), Çorlu (3 seyahat), Şarköy (3 seyahat) ilçeleri olmak üzere 10 ilçeye toplam 27 adet seyahat yapılmıştır (Şekil 1).



Şekil.1: Çalışmada kurulan tuzak odakları

3.1. Culicoides Örneklerinin Tür Çeşitliliği

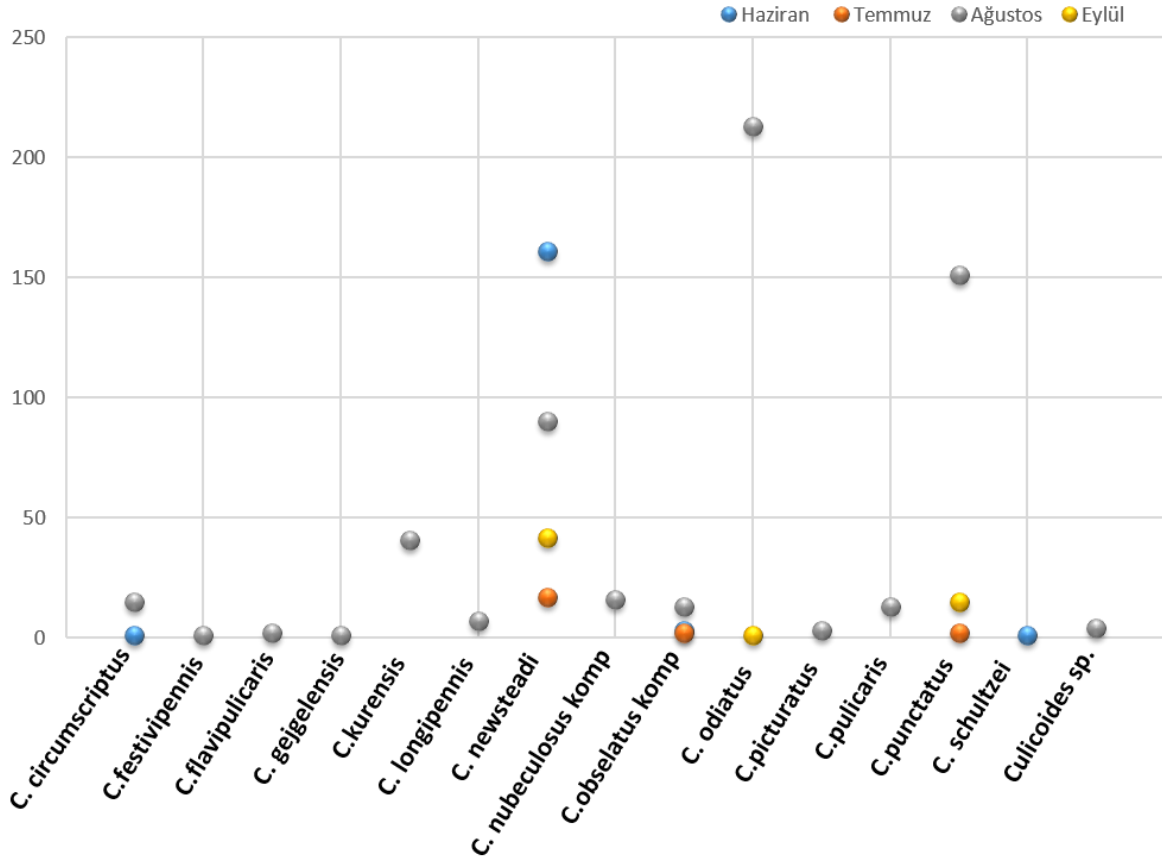
Toplanan *Culicoides* örnekleri tür tayini amacıyla kanat morfolojilerine göre mikroskopik incelemeleri tamamlanmış, örneklenen bölgeye göre tür, cinsiyet ve adet bilgileri örnekleme zamanına dayanarak kayıt edilmiştir (Tablo 5). Toplanan örneklerin mikroskopik incelemelerine göre, tür seviyesinde teşhis edilemeyen ve *Culicoides sp.* olarak tanımlan örnekler dışında; *C.newsteadi*, *C.schultzei*, *C.nubeculosus komp.*, *C.punctatus*, *C.circumscriptus*, *C.obsoletus komp.*, *C.gejgelensis*, *C.festripennis*, *C.longipennis*, *C.pulicaris*, *C.picturatus*, *C.odiatus*, *C.kurensis*, *C.flavipulicaris* olmak üzere 14 tür varlığı tanımlanmıştır.

Araştırma boyunca 812 adet *Culicoides* örneği tanımlanmıştır. Bu örneklerden 310 örnek ile en çok *C. newsteadi*'ye rastlanmıştır ve onu 214 örnekle *C.odiatus*, 165 örnekle *C. punctatus* takip etmiştir. Diğer türler daha az sayıda tespit edilirken, özellikle *C.festripennis*, *C. gejgelensis* ve *C. schultzei* türlerine ait birer örnek yakalanabilmiştir.

En fazla Malkara ilçesinden *Culicoides* örneği tanımlanırken Marmaraeğlisi ve Çorlu ilçelerinde kurulan tuzaklarda toplanan örneklerden *Culicoides* türlerine rastlanmamıştır. Yakalanan türlerin toplama bölgelerine göre değerlendirildiğinde Malkara (n=443) ve Şarköy (n=173) 11 farklı tür ile tür çeşitliliği en fazla olan bölgeler tanımlanırken, onları 7 tür ile Süleymanpaşa (n=23) ve Hayrabolu (n=133) ilçeleri takip edilmiştir. Diğer taraftan Muratlı (n=3) ilçesinde sadece 1 tür tespit edilmiştir. Toplanan örnekler içerisinde en çok sayıda tespit edilen *C.newsteadi* tüm örnekleme yerlerinden (n=8) tespit edilirken en çok Malkara'da (n=106) tanımlanmıştır. Hayrabolu ve Şarköy ilçelerinde de sırasıyla 104 ve 60 adet *C.newsteadi* tanımlanmıştır. Sayı olarak fazla tespit edilen *C.odiatus* ve *C.punctatus* sırasıyla 3 ve 6 ilçede tespit edilmiştir. *Culicoides* türlerinin aylara göre dağılımları ve sayıları değerlendirildiğinde (Şekil 2); *C.newsteadi*'ye örneklenen rastlanmıştır. *C.punctatus* ise Haziran haricindeki ayların hepsinde tanımlanmıştır. Ağustos ayında *C.schultzei* hariç, diğer 15 türün tamamına rastlanmış ve Ağustos ayı tür çeşitliliğinin en fazla olduğu ay olarak kaydedilmiştir.

Tablo 5: Tekirdağ il ve ilçelerinden toplanan Culicoides türleri

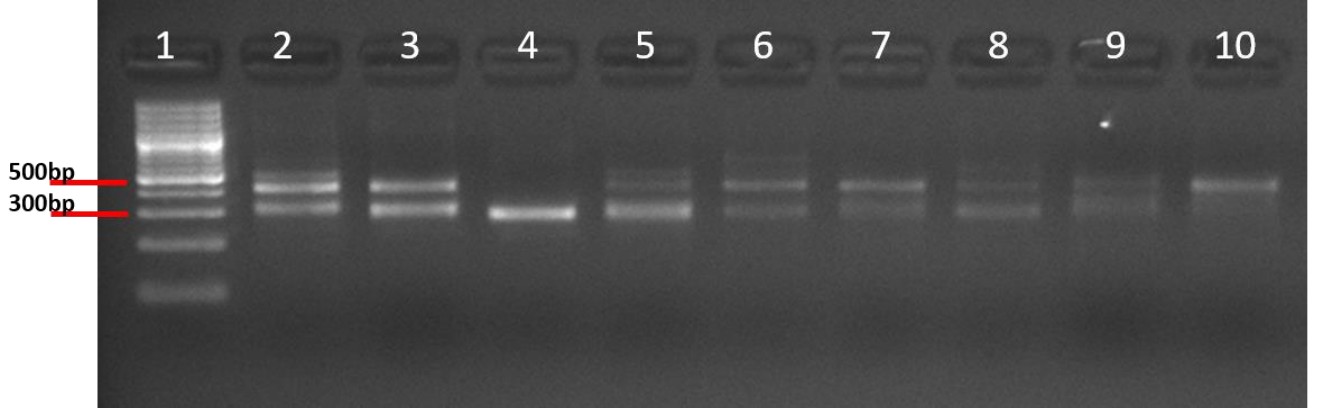
Culicoides Türü	Çerkezköy	Hayrabolu	Kapaklı	Malkara	Muratlı	Saray	Süleyman paşa	Şarköy	Toplam
<i>C. circumscriptus</i>	-	-	1♀	8♀ 2♂	-	-	1♀	4♀	16
<i>C. festivipennis</i>	-	-	-	-	-	-	1♀	-	1
<i>C. flavipulicaris</i>	-	1♀	-	1♀	-	-	-	-	2
<i>C. gejelensis</i>	-	-	-	-	-	-	1♀	-	1
<i>C. kurensis</i>	-	1♀	-	21♀	-	-	-	18♀ 1♂	41
<i>C. longipennis</i>	-	1♀	-	5	-	-	-	1♀	7
<i>C. newsteadi</i>	7♀	103 ♀ 1♂	15♀	106♀	3♀	10♀	5♀	60♀	310
<i>C. nubeculosus komp</i>	-	-	-	1♀	-	-	10♀, 3♂	2♀	16
<i>C. obsoletus komp</i>	1♀	2♀	-	11♀	-	1♀	1♀	2♀	18
<i>C. odiatus</i>	-	4♀	-	208♀	-	-	-	2♀	214
<i>C. picturatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	3♀	3
<i>C. pulicaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	13♀	13
<i>C. punctatus</i>	1♀	20♀	-	76♀ 1♂	-	1♀	1♀	65♀	165
<i>C. schultzei</i>	-	-	-	1♀	-	-	-	-	1
<i>Culicoides sp.</i>	-	-	-	2♀	-	-	-	2♀	4
Toplam	9	133	16	443	3	12	23	173	812



Şekil 2: *Culicoides* türlerinin aylara göre dağılımı

3.2. PCR ve Dizi Analizi

Araştırma boyunca toplanan ve tür tayinleri yapılmış *Culicoides* havuz örneklerine hepsi nükleik asit ekstraksiyonu uygulanmıştır. Elde edilen örneklerden cDNA sentezi amacıyla RT-PCR protokolleri gerçekleştirilmiştir. *Culicoides* ITS-1 gen spesifik PCR uygulamaları tüm örnekler yapılmıştır. Reaksiyonda pozitif kontrol olarak daha önce çalışılmış (Dik ve ark. 2014) ve dizi analizi yapılmış cDNA örneği kullanılırken negatif kontrol olarak nükleaz ari su kullanılmıştır. Yapılan PCR uygulamaları sonucunda tüm örnekler pozitif olarak tespit edilmiştir (Şekil 3).

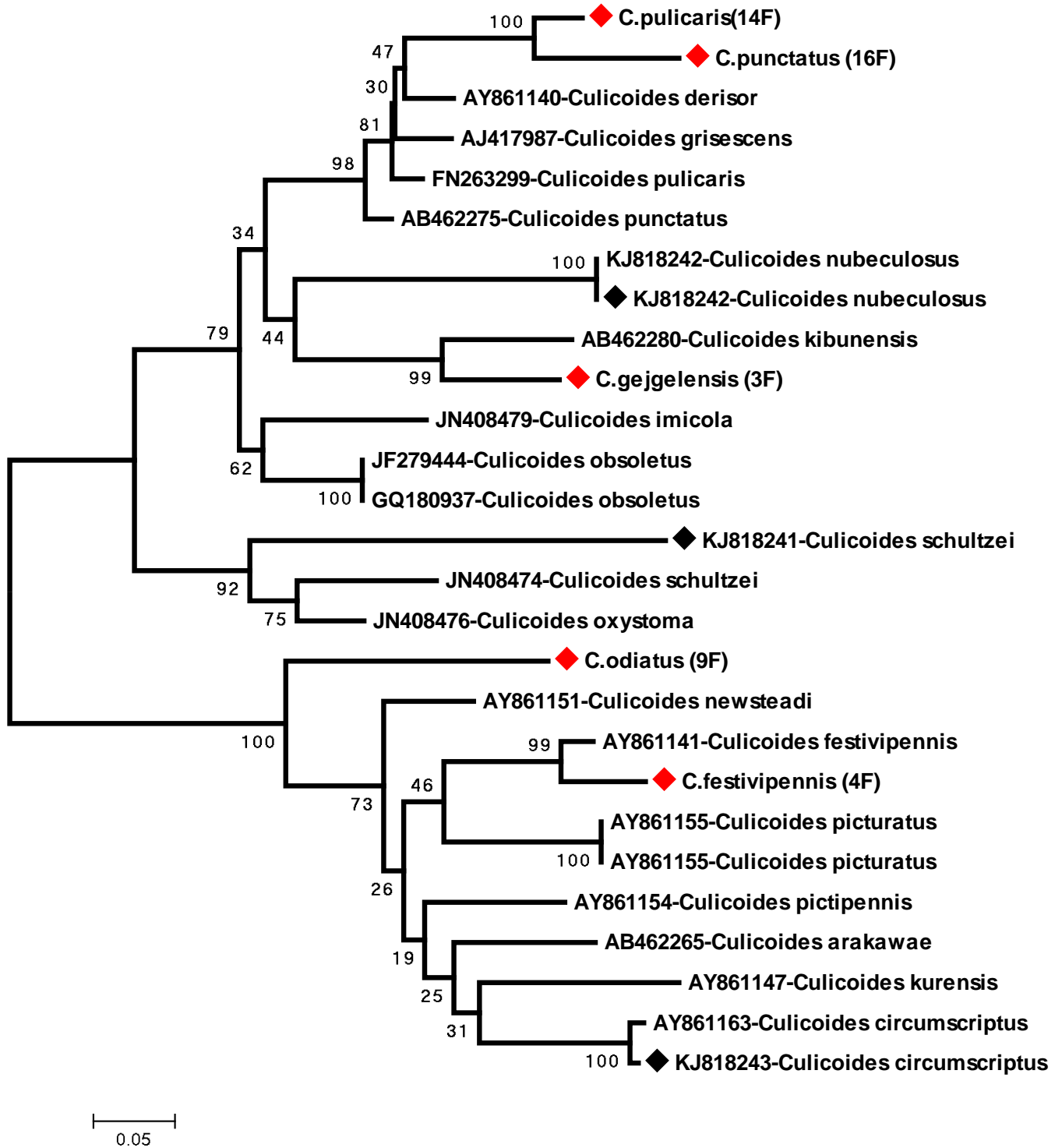


Şekil 3. *Culicoides* örneklerinin *panCul* primerleri ile yapılmış PCR sonuçları: 1: DNA merdiveni; 2, 3, 4, 5, 6,7, 8: pozitif bulunan örnekler; 10:pozitif kontrol

Pozitif PCR ürünlerinin temizlenip saflaştırıldıktan sonra NKÜ NABİLTEM Laboratuvarlarından dizi analizi amacıyla gönderilmiştir. Dizi analizi amacıyla toplam 34 örnek hazırlanmıştır. Elde edilen veriler BLAST'ta tanımlandıktan sonra biyoinformatik programlar (Bioedit, Mega) kullanılarak değerlendirilecek filogenetik analizler yapılmıştır. Analiz yapılan örneklerden 5 adedi *Culicoides* ITS-1 geni olarak tanımlanmıştır. Tanımlanamayan örneklerin tekrar dizi analizi için proje bütçe yetersizliği nedeniyle çalışılmamıştır. Beş adet dizinin Türkiye ve dünyanın çeşitli ülkelerinde tanımlanan diğer *Culicoides* tür dizinleri ile sıralamaları yapılarak aralarındaki benzerlik ve ayrılıkları incelenmiştir. Tekirdağ ITS-1 dizinleri kendi aralarında % 38,87 - 85,91 oranlarında benzerlik gösterirken Türkiye'de bildiri yapılan diğer dizinlerle (Dik ve ark. 2014) karşılaştırıldığında bu oran % 39,43 – 72,67 olarak belirlenmiştir. Dünyanın değişik bölgelerinden bildiri yapılmış ITS-1 dizinleri arasındaki benzerlik oranı ise % 40,56 – 88,45 olarak tespit edilmiştir.

Elde edilen dizinler diğer referans dizinlerle birlikte neighbor- joining metodu kullanılarak, Kimura's 2 parametresine göre, 1000 tekrar yararlanılarak filogenetik analiz yapılmıştır. Uygulanan filogenetik ağaçta dizinlerin iki ana grup olarak dallanmış ve içlerinde alt dallarda yer almaktadır. Bu çalışmada elde edilen dizinlerin Türkiye'de bildiri yapılan diğer dizinlerden farklı tür çeşitliliğine paralel olarak sınıflandığı görülmüştür. Dizinlenen 5 örnek *C.festivipennis*, *C. pulicaris*, *C.punctatus*, *C.gejelensis*, *C.odiatus* olarak gruplandırıldığı görülmüştür (Şekil 4). Filogenetik analizde *C.gejelensis* ve *C.odiatus* ITS-1 gen dizileri Genbankasında erişilemediğinden eşleşmeli olarak aynı türler karşılaştırılamamıştır. Bu çalışma ile bu türlere ait

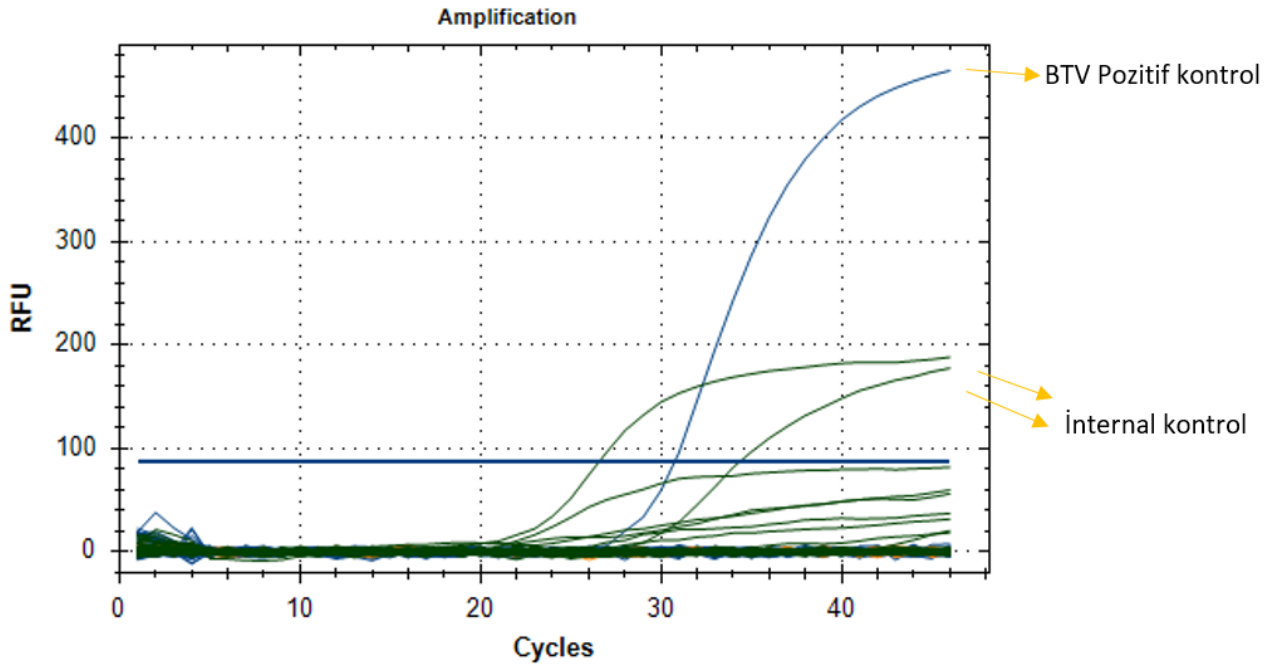
Türkiye’de ilk dizileme verileri elde edilmiştir.



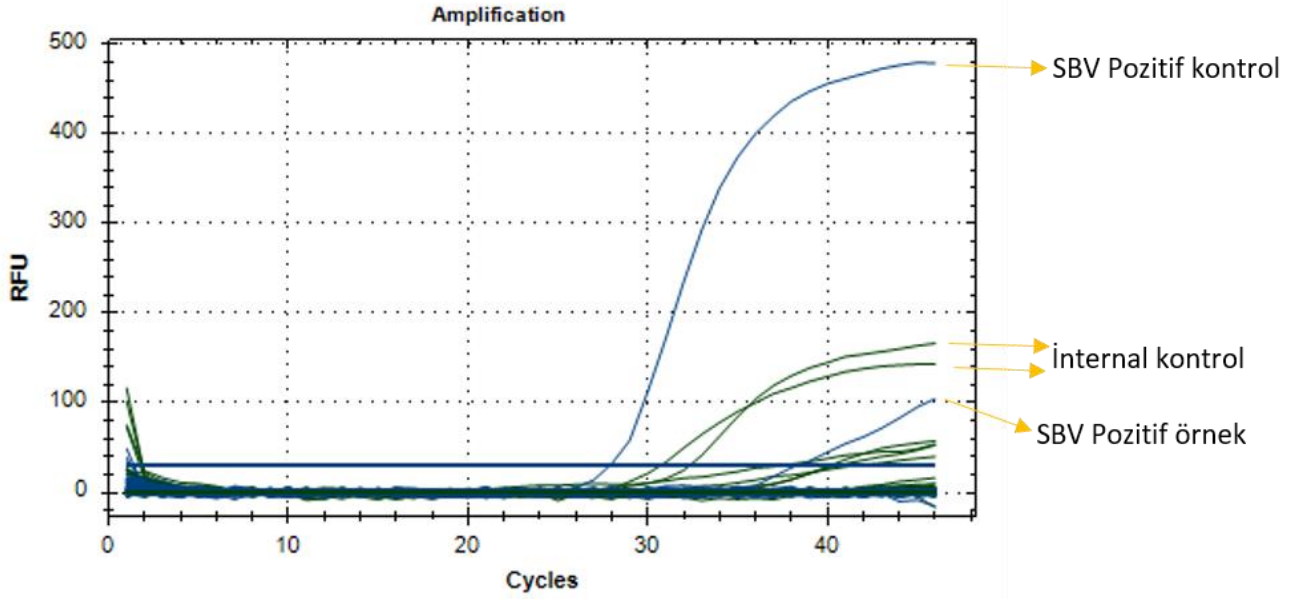
Şekil 3: Dizi analizi yapılan *Culicoides* ITS-1 gen bölgelerinin filogenetik ağacı. Araştırmada analiz edilen diziler kırmızı ile işaretlenmiştir. Türkiye’de daha önce bildirilen diziler ise siyah renk ile gösterilmiştir.

3.3. Real Time PCR

Saha *Culicoides* örneklerinde MD ve SB virus genom varlıklarının araştırılması amacıyla tüm RNA örneklerine real-time PCR protokolleri uygulanmıştır. Standardizasyon çalışmaları kitin içerisindeki pozitif kontrol örnekleri ile yapılmıştır. Ct değeri MDV için 28-30, SBV için ise 30-40 olarak belirlenmiştir. Real time –PCR testleri sonucunda MDV genomu rastlanmazken SBV yükü bir örnekte düşük düzeyde tespit edilmiştir (Şekil 5 ve 6). Bu örneğin mikroskobik ve moleküler analizi yapılmış *C.festivipennis* olarak belirlenmiştir. Pozitif örnek merkez ilçe olan Süleymanpaşa ilçesinde Ağustos ayı içerisinde kurulan tuzaklardan elde edilen 1 adet sinek örneğinden tanımlanmıştır.



Şekil 5: Mavi Dil Virus (BTV) real time-PCR reaksiyonu grafiği



Şekil 5: Schmallenberg Virus (SBV) real time-PCR reaksiyonu grafiği

4. TARTIŞMA

Culicoides cinsi sokucu sinekler hayvan sağlığını tehdit eden ve yetiştiricilikte büyük ekonomik kayıplara sebep olan bazı viral hastalıklar için biyolojik ve mekanik vektör olma potansiyelleri bu konudaki bilimsel araştırmaları arttırmıştır. *Culicoides* türleriyle taşındığı bilinen ve Türkiye’de görülen viral hastalıkların vektörleri üzerine yapılan çalışma sayısı azdır. Güney, Güneydoğu, İç, İçbatı Anadolu Bölgelerine yönelik saha çalışmalarında hem tür çeşitliliği hem de taşıdıkları hastalıklar yönünden araştırılmıştır. Bu güne kadar Türkiye’nin çeşitli bölgelerinden 60 civarında *Culicoides* türü çeşitli bildirilmiştir (Navai, 1977; Burgu ve ark 1992, Dik 1993, Tilki ve Dik 2003, Dik ve ark 2010, Dik ve ark 2012; Dik ve ark 2014; Turgut ve Kılıç 2015; Dik ve ark 2016). Trakya Bölgesi Avrupa ve Anadolu arasında hem iklimsel hem de coğrafik özelliklerin geçişi için köprü rolü üstlenir. Bölgedeki *Culicoides* tür çeşitliliği üzerine sınırlı bilgi bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada (Deniz ve ark 2010) 2004 yılında Çanakkale, Edirne, Tekirdağ, Kırklareli ve İstanbul illerinden toplanan *Culicoides* türlerinden Tekirdağ ili için 2706 adet örnek içinde 9 adet tür bildirilmiştir. Bu türler içerisinde en fazla *C.obsoletus* komp. saptanırken sırasıyla *C.fagineus*, *C.pulicaris*, *C.newsteadi*, *C.punticollis*, *C.circumscriotus*, *C.punctatus*, *C.cataneii* ve *C.odiatus* bildirilmiştir. Bu çalışmanın saha araştırması 2015 yılı Haziran-Eylül döneminde

gerçekleştirilmiş olup toplam 812 adet *Culicoides* örneği toplanmış ve 16 tür tanımlanmıştır. Diğer çalışmaya kıyasla toplanan örnek sayısının az olduğu buna karşın tür sayısının fazla olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada en fazla bulunan tür *C.newsteadi* olurken diğer çalışmadan farklı olarak *C.festivipennis*, *C.flavipulicaris*, *C.gejgelensis*, *C.kurensis*, *C.longipennis*, *C.nubeculosus komp.*, *C.obsoletus komp.*, *C.picturatus* ve *C.schultzei* tespit edilmiştir. Ayrıca daha önce bildirilen *C.fagineus* ve *C.cataneii* türleri bu çalışmada tespit edilememiştir. Daha önce dominant tür olarak bildirilen *C.obsoletus komp.* bu çalışmada 6 odaktan toplam 18 adet örnekte tanımlanmıştır. Yıllara göre bölgedeki farklı yeni türler tespit edilebilirken bazı türlerin yok olması mümkün olabilir. Bu hususta daha detaylı olarak birbirini izleyen yıllarda örnekleme yapılması daha yararlı olacaktır.

Culicoides moleküler barkodlanması ve tür tayininin yapılması özellikle vektörlük çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. *Culicoides* cinsi sokucu sineklerin moleküler tiplendirilmesinde genom ITS-1 bölgesi tercih edilen biyomarkır bölgelerindedir. Türkiye’de Güney ve güneydoğu Anadolu Bölgesinde yapılan başka bir çalışmada *Culicoides* tür çeşitliliği ve BEFV yönünden varlığı araştırılmış ve ilk defa *Culicoides* tür çeşitliliği moleküler düzeyde çalışılmış *Culicoides* türlerine ait ITS-1 gen bölgelerine yönelik filogenetik analizleri bildirilmiştir (Dik ve ark 2014). Bu çalışmada 5 adet ITS-1 gen bölgesi dizin analizi gerçekleştirilmiş ve filogenetik analizi araştırılmıştır. Bu veriler Trakya Bölgesine ait ilk veriler olma özelliğindedir. Bu çalışmada elde edilen dizinler ile daha önce tanımlanan dizinler arasındaki benzerlik oranı % 39,43-88,45 arasında değişken olduğu bulunmuştur. ITS-1 gen bölgesi yapısal olmayan gen bölgesi olarak türler arasında yüksek düzeyde değişkenlik göstermektedir.

Culicoides türü sokucu sineklerin virus vektörlüğü üzerine Türkiye’de sınırlı sayıda araştırma (Yavru ve ark 2009; Dik ve ark 2012; Dik ve ark 2014) bulunmakla birlikte Tekirdağ ili içerisinde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. MDV’ye vektörlük yaptığı belirtilen *C. imicola*, *C. schultzei komp.* ve *C.obsoletus komp.* türleri ülkemizdeki varlığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Dik ve Dinçer 1992, Dik 1993). Yavru ve ark (2009) İç ve İç-Batı Anadolu’da yaptıkları bir çalışmada, 12 *Culicoides* türü saptamışlardır. Ancak MDV’nin vektörü veya muhtemel vektörü olduğu bilinen türlerden *C.imicola*, *C.obsoletus komp.* ve *C.schultzei komp.* örnekleri hiç rastlamazken, *C.pulicaris komp.* örnekleri ise nispeten az sayılarda tesadüf etmişlerdir.

Bununla birlikte *C.circumscriptus*, *C.punctatus* ve *C.kibunensis* örneklerinde MDV viral genom varlığı yönünden pozitif sonuçlar bildirilmiştir. Türkiye'nin güney ve batı bölgelerinde MDV ve EHDV'nin vektörleri üzerine yapılan bir çalışmada; yakalanan *Culicoides* türlerinin hiç birisinden MDV izole edilememiştir (Dik ve ark 2012). Bu çalışmada MDV için vektör potansiyeline sahip *Culicoides* türleri tanımlanmış olması ile birlikte MDV genomu yönünden örnekler negatif olarak bulunmuştur. Ayrıca bölgede örnekleme dönemi boyunca enfeksiyona ilişkin bir salgın bildirimiminin olmaması bu sonucu desteklemektedir.

SBV ruminant yetiştiriciliğinde ölü doğum, malformasyon ve prematüre doğumlarla seyreden ekonomik yönden önemli bir enfeksiyona neden olur. Virus ilk olarak 2011 de tanımlanması ile birlikte geçmiş dair bilgiler sınırlı veya bilinmemektedir. Türkiye'de SBV varlığı virolojik ve serolojik olarak geçmişe dair varlığı bildirilmiştir (Azkur ve ark 2013, Yılmaz ve ark 2014). SBV vektörlüğü üzerine yapılan çalışmalarda; *C.obsoletus* kompleks (*C.chiopterus*, *C.obsoletus*, *C.scoticus*) başta olmak üzere *C.nubeculosus*, *C. pulicaris*, *C. imicola*, *C.dewulfi*, *C.punctatus* ve *C.sonorensis* örneklerinde virus RNA varlığı tespit edilmiştir (Balenghien ve ark 2014; De Regge ve ark 2012; Elbert ve ark 2013; Goffredo ve ark 2013; Larska ve ark 2013; Rasmussen ve ark 2012; Veronesi ve ark 2013). *Culicoides* cinsi sokucu sineklerle bulaşan SBV'nin vektörlüğü ile ilgili Türkiye'de literatür bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada vektör potansiyeline sahip *C.obsoletus komp.*, *C. pulicaris* ve *C.punctatus* türleri tanımlanmış olmasıyla birlikte viral RNA bu türlerde tespit edilememiştir. Türkiye'de bu konuda yapılan ilk veriler bu çalışma ile elde edilmiş olup yapılan analizler sonucunda bir *C.festivipennis* örneğinde virus varlığı tespit edilmiştir. *C.festivipennis* daha önce yapılmış çalışmalarda Türkiye'nin çeşitli illerinden (Dik ve ark 2010, 2012; Uslu ve Dik 2010; Deniz ve ark 2010) ve birçok Avrupa ve özellikle Balkan ülkelerinden (Bobeva ve ark 2014, 2015; Kluiteis ve ark 2015; Sarvasova ve ark 2014; Zimmer ve ark 2014) bildirilmiştir. Trakya bölgesinde yapılmış bir araştırmada Edirne ve Kırklareli illerinde toplanan saha örnekleri içerisinde az sayıda olsa da *C.festivipennis* tanımlanmıştır (Deniz ve ark 2010). Bu türe ait SBV vektörlüğü ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. Fakat Muğla ilinden toplanan *C.festivipennis* örneklerinde EHDV RNA'sı tespit edilmiş, bu enfeksiyon ile ilgili vektörlük potansiyeli bildirilmiştir (Dik ve ark 2012). Bu araştırma sonuçları değerlendirildiğinde, örnekleme bölgesini içine alan bu alan içerisinde bu türün enfeksiyonun taşıyıcılığında önemli

olabileceğini düşündürmektedir. Bu örnekten bir adet toplanmış olması; karşılaştırma olanağını veya virus-vektör ilişkisi konusunda bilgilerin detaylandırılmasını sınırlamaktadır. Örneklemelerin ilerideki çalışmalarda devam edilmesi ve bu tür ile ilgili vektör-virus ilişkisinin tanımlanmasında daha detaylı bilgiye ulaşılmasına katkı sağlayacaktır. Real time-PCR ile pozitif bulunan örneğin moleküler analizinin yapılması ve virus özelliklerinin ortaya konulması vektörlük ilişkisi konusunda daha kesin bilgileri elde etmede yararlı olacağını düşündürmektedir.

5. SONUÇLAR:

Bu proje kapsamında Tekirdağ ili sınırları içerisinde toplanan *Culicoides* örneklerinin moleküler analizi ve MDV ve SBV taşıyıcılığı araştırılmıştır. Yapılan laboratuvar çalışmaları sonrasında *C.newsteadi*, *C.schultzei*, *C.nubeculosus komp.*, *C.punctatus*, *C.circumscriptus*, *C.obselatus komp.*, *C.gejgelensis*, *C.festvipennis*, *C.longipennis*, *C.pulicaris*, *C.picturatus*, *C.odiatus*, *C.kurensis*, *C.flavipulicaris* olmak üzere 14 tür varlığı tanımlanmıştır. Bu türler arasında başta *C.newsteadi* olmak üzere *C.odiatus* ve *C.pulicaris* baskın türler olarak tespit edilmiştir. Bölgede daha önce yapılan çalışmaya göre tür çeşitliliğinin bu çalışmada daha fazla olarak bulunduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen *Culicoides* türlerinden 5 adedinin ITS-1 gen bölgelerine göre moleküler analizleri gerçekleştirilmiştir. Örneklerden MDV ve SBV varlığı Real-time PCR testleriyle araştırılmış MDV genomuna rastlanmaz iken bir örnek SBV RNA'sı yönünden pozitif bulunmuştur. Araştırmanın saha örneklemelerinin yapıldığı dönemde bölgede MD veya SB enfeksiyonlarına ilişkin salgın bildirimleri olmamıştır. MDV varlığına rastlanmaması özellikle bölgede salgınların olmaması ve aşı uygulamalarının yapılması ile ilişkili olabileceğini de düşündürmektedir. SB virusu hakkında sınırlı bilgiye ulaşılması ile birlikte elde edilen sonuçlar ilk veriler olma özelliğindedir ve ileride yapılacak çalışmalar için yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

Türkiye'de arboviral enfeksiyonların vektörlüğü konusunda sınırlı çalışma bulunmaktadır. Çalışma alanında varlığı daha önce bildirilen MDV ve SBV enfeksiyonları çok sayıda hayvanın ölümüne ve anomalili yavru doğumlarına sebep olan ve yetiştiricilikte büyük ekonomik kayıpların oluşmasına neden olan enfeksiyonlardır. Bu enfeksiyonların mücadelesinde virusların epidemiyolojik özelliklerinin iyi bilinmesi gereklidir. Özellikle bulaşmada rol oynayan vektör türlerin,

sonra da bu türlerin biyoekolojik ve epizootiyolojik özelliklerinin belirlenmesi mücadele programlarının hazırlanmasında önemlidir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar bölge ve Türkiye hayvancılığında vektörlerle bulaşan enfeksiyonların kontrol altına alınmasında katkı sağlayacak bilgileri içermektedir.

KAYNAKLAR

1. AZKUR AK, ALBAYRAK H, RISVANLI A, PESTIL Z, OZAN E, YILMAZ O, TONBAK S, CAVUNT A, KADI H, MACUN HC, ACAR D, ÖZENÇ E, ALPARSLAN S, BULUT H. Antibodies to Schmallenberg virus in domestic livestock in Turkey. Trop Anim Health Prod. doi: 10.1007/s11250-013-0415-2.(2013)
2. Balenghiena T, Pagès N, Goffredod M, Carpentere S, Augotf D, Jacquiera E, Talaverac S, Monacod F, Depaquif J, Grilleta C, Pujolsc J, Sattag G, Kasbarif M, Setier-Rioh ML, Izzod F, Alkani C, Delécollek JC, Quagliad M, Charreli R, Polcid A, Bréardl E, Federicid V, Cêtre-Sossaha C, Garros C. 2014. The emergence of Schmallenberg virus across Culicoides communities and ecosystems in Europe Preventive Veterinary Medicine, doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.03.007
3. BOLAT Y., Elazığ, Diyarbakır ve Şanlıurfa illerinde koyunların Mavi Dil hastalığı'nın yayılması üzerine serolojik araştırmalar, Selçuk Üniv Vet Fak Derg, 2, 103–12, (1986).
4. Bobeva, A, Ilieva, M, Dimitrov, D, Zehtindjiev, P. 2014. Degree of associations among vectors of the genus Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) and host bird species with respect to haemosporidian parasites in NE Bulgaria, PARASITOLOGY RESEARCH, 113 (12): 4505-4511
5. Bobeva, A , Zehtindjiev, P , Ilieva, M , Dimitrov, D , Mathis, A , Bensch, S. 2015. Host preferences of ornithophilic biting midges of the genus Culicoides in the Eastern Balkans, MEDICAL AND VETERINARY ENTOMOLOGY, 29(3): 290-296.
6. BURGU I., Urman HK., Akça Y., Yonguç A., Mellor PS., Hamblin C., Serologic survey and vector surveillance for bluetongue in southern Turkey. Walton T.E., Ousburn B.I., eds. Bluetongue, African Horse Sickness and related arboviruses, Boca Raton: CRC Press, Florida, P: 168–74., (1992).

7. CETRE-SOSSAH C., Baldet T., Delecolle JC., Mathieu B., Perin A., Grillet C., Albina E., Molecular detection of *Culicoides spp.* and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Vet Res.* 35: 325–37, (2004).
8. De Regge N, Deblauwe I, De Deken R, Vantieghem P, Madder M., Gey-sen, D., Smeets, F., Losson, B., van den Berg, T., Cay, A.B., 2012. Detection of Schmallenberg virus in different *Culicoides spp.* by real-time RT-PCR. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 471–475.
9. DOCEUL V, LARA E, SAILLEAU C, BELBIS G, RICHARDSON J, BRÉARD E, VIAROUGE C, DOMINGUEZ M, HENDRIKX P, CALAVAS D, DESPRAT A, LANGUILLE J, COMTET L, POURQUIER P, ELÉOUËT JF, DELMAS B, MARIANNEAU P, VITOUR D, ZIENTARA S. Epidemiology, molecular virology and diagnostics of Schmallenberg virus, an emerging orthobunyavirus in Europe. *Vet Res.* doi: 10.1186/1297-9716-44-31.(2013)
10. DIK B., Adana, İçel ve Antalya yörelerinde bulunan *Culicoides* Latreille, 1908 (Diptera: Ceratopogonidae) türlerinin tespiti, *Türk Vet Hek Derg*, 5 (2): 48–55, (1993).
11. DIK B., Ceratopogonidler ve parazitolojik önemleri.” *Parazitoloji’de Artropod Hastalıkları ve Vektörler*” Ed. Özcel M.A., Daldal N., Türkiye Parazitol Dern. Yayın No: 13, 111–43, (1997).
12. DIK B., Türkiye Ceratopogonid’leri ve vektörlükleri. XV. Ulusal Parazitoloji Kongresi Özet Kitabı, Pp. 113–117, Kayseri ve Ürgüp, Türkiye, Kasım (2007).
13. DIK B., Yagcı, Ş., Linton, YM., A review of species diversity and distribution of *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) in Turkey. *J Nat Hist*, 40 (32–34): 1947–67, (2006).
14. Dik B, Muz D, Muz MN, Uslu U. The geographical distribution and first molecular analysis of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) species in the Southern and Southeastern Turkey during the 2012 outbreak of bovine ephemeral fever. *Parasitol Res.* doi: 10.1007/s00436-014-4098-z. Epub 2014 Sep 9. (2014)
15. DIK B, YAVRU S, USLU U, YAPICI O, ESIN E Determination of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) and suspect vectors of Epizootic Haemorrhagic Disease virus and Bluetongue virus in *Culicoides* specimens by

- RT-PCR in southern and western Anatolia. *Rev Vet Med*, 163 (11): 505-510 (2012)
16. Dik B, Kuçlu Ö, Öztürk R. *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) species in the Western Black Sea Region of Turkey, new records for Turkish fauna. *J.Tur.Anim.Sci.* (Yayına Kabul edildi)
 17. Elbers, A.R., Meiswinkel, R., van Weezep, E., van Oldruitenborgh- Oosterbaan, M.M., Kooi, E.A., 2013b. Schmallenberg virus in *Culicoides* spp. biting midges, the Netherlands, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 106–109. European Food Safety Authority, 2013. “Schmallenberg” Virus: Analysis of the Epidemiological Data., pp. 22.
 18. ERTÜRK A., Çeşitli Serumlarda (Sığır, Koyun, Keçi) Mavidil Antikorlarının Agar-Jel Presipitasyon Testi ile Karşılaştırılması. *Etlik Vet Mikrobiol Derg*, 7 (5): 1–9, (1994).
 19. ERTÜRK A., Tatar N., Kabaklı O., Incoglu S., Cizmeci S., Barut F., The Current Situation Of Bluetongue in Turkey. *Vet. Ital.* 40(3): 137–40, (2004).
 20. Goffredo, M., Monaco, F., Capelli, G., Quaglia, M., Federici, V., Catalani, M., Montarsi, F., Polci, A., Pinoni, C., Calistri, P., Savini, G., 2013. Schmallenberg virus in Italy: a retrospective survey in *Culicoides* stored during the bluetongue Italian surveillance program. *Prev. Vet. Med.* 111, 230–236.
 21. GÜRTÜRK S., Burgu İ., Toker A., Türkiye’de sığırlarda Mavi Dil (Blue Tongue) enfeksiyonu üzerine araştırmalar. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 27 (1-2): 322-30, (1980).
 22. HOFFMANN B, SCHEUCH M, HÖPER D, JUNGBLUT R, HOLSTEG M, SCHIRRMEIER H, ESCHBAUMER M, GOLLER KV, WERNIKE K, FISCHER M, BREITHAUPT A, METTENLEITER TC, BEER M. Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, *Emerg Infect Dis.* doi: 10.3201/eid1803.111905 (2012)
 23. HUBÁLEK Z, RUDOLF I, NOWOTNY N. Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals *Adv Virus Res.* doi: 10.1016/B978-0-12-800172-1.00005-7 (2014)
 24. Kluiters, G, Swales, H, Baylis, M. 2015. Local dispersal of palaeartic *Culicoides* biting midges estimated by mark-release-recapture, *PARASITES & VECTORS*, 8(86). DOI: 10.1186/s13071-015-0658-z
 25. Larska, M., Lechowski, L., Grochowska, M., Zmudzinski, J.F., 2013. Detection

- of the Schmallenberg virus in nulliparous *Culicoides obsoletus/scoticus* complex and *C. punctatus*—the possibility of transovarial virus transmission in the midge population and of a new vector. *Vet. Microbiol.* 166, 467–473.
26. MELLOR PS., Wittmann EJ., Bluetongue virus in the mediterranean basin 1998–2001, *Vet J*, 164, 1: 20–37, (2002).
 27. MELLOR PS., Boorman J., Baylis M., *Culicoides* Biting Midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol*, 45: 307–40, (2000).
 28. MELLOR PS., Carpenter S., Harrup L., Baylis M., Mertens PPC., Bluetongue in Europe and the Mediterranean Basin: History of occurrence prior to 2006, *Prev Vet Med*, 87: 4–20, (2008).
 29. ÖZKUL A., Ertürk A., Çalışkan E., Saraç F., Ceylan Ç., Mertens P., Kabaklı Ö., Dinçer E, Çizmeçi Ş., Segment 10 Based Molecular Epidemiology Of Bluetongue Virus (MDV) Isolates From Turkey:1999–2001., *Virus Research*, Doi: 10.1016/J.Virusres.2009.02.007, (2009)
 30. Rasmussen, L.D., Kristensen, B., Kirkeby, C., Rasmussen, T.B., Belsham, G.J., Bodker, R., Botner, A., 2012. Culicoids as vectors of Schmallenberg virus. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1204–1206.
 31. ROY, P.: Bluetongue virus proteins. *J. Gen. Virol.* 73:3051-3064, 1989.
 32. Turgut F, Kılıç AY. The Ceratopogonidae (Insecta: Diptera) fauna of the Central Black Sea Region in Turkey. *Turkish J. Zoology*, 39: 1071-1089, 2015
 33. Veronesi, E., Henstock, M., Gubbins, S., Batten, C., Manley, R., Barber, J., Hoffmann, B., Beer, M., Attoui, H., Mertens, P.P., Carpenter, S., 2013. Implicating *Culicoides* biting midges as vectors of schmallenberg virus using semi-quantitative rt-PCR. *PLoS ONE* 8, e57747.
 34. YAVRU, S., DIK, B., BULUT, O., USLU, U., YAPICI, O., KALE, M., AVCI, O. İç ve İç Batı Anadolu’da Koyunlarda Mavi Dil Virus (MDV) Enfeksiyonu’nun Serolojik ve Virolojik Olarak Araştırılması ve Vektör *Culicoides* Türlerinin Belirlenmesi, (Tübitak Proje No: 106 O 456) (2009)
 35. YILMAZ H, HOFFMANN B, TURAN N, CİZMECİGİL UY, RİCHT JA, VAN DER POEL WH, Detection and partial sequencing of Schmallenberg virus in cattle and sheep in Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis.* doi: 10.1089/vbz.2013.1451. (2014)
 36. YONGUC, A.D., TAYLOR, W.P., CSONTON, L. WORRALL, E.: Bluetongue in western Turkey. *Vet. Rec.* 111:144-146, 1982.