

Van Gölü Havzasında Bazı Kanatlı Türlerinde Avian İnfluenza A Virüslerinin Real-Time PCR ile Tespiti, İzolasyonu ve Alt Tiplerinin Belirlenmesi

Proje No: 106O571

Prof. Dr. Banur BOYNUKARA

Doç. Dr. Ziya İLHAN

Yrd. Doç. Dr. Timur GÜLHAN

Yrd. Doç. Dr. İsmail Hakkı EKİN

Yrd. Doç. Dr. Abdulbaki AKSAKAL

Yrd. Doç. Dr. Özdemir ADİZEL

Dr. Fethiye ÇÖVEN

Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN

Dr. Atilla DURMUŞ

Doç. Dr. Hasan SOLMAZ

OCAK 2009
VAN

ÖNSÖZ

Avian influenza tip A virüs infeksiyonları, Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi tarafından en tehlikeli insan ve hayvan hastalıkları grubunda sınıflandırılmaktadır. Hastalığın, kanatlı hayvan sektöründe doğrudan ya da dolaylı olarak oluşturduğu ekonomik kayıplar ve etkenin infekte hayvanlardan insanlara bulaşarak, yüksek oranda ölümlere neden olması, AI tip A virüs infeksiyonlarına yönelik ilgiyi son yıllarda önemli düzeyde artırmıştır. İnfluenza A virüslerinin yüksek mutasyon yeteneğine sahip olması nedeniyle patojenitesi düşük influenza (LPAI) virüslerinin HPAI patotipine dönüşecekleri endişesi, dünyada son yıllarda konuya ilişkin yapılan çalışmaların artışıdaki en önemli sebeptir.

Avian influenza tip A virüslerinin taşınmasında göçmen kuşlar önemli rol oynamaktadır. Van Gölü Havzası; birçok kanatlı hayvan türü için sürekli olarak kullanılan bir yaşam alanı, bir kısım göçmen kuş türleri için yılın belli mevsimlerinde geçici olarak tercih edilen bir konaklama alanı, bazı göçmen kuşlar için ise transit geçiş noktasıdır. Bu nedenle, Van Gölü Havzası birçok infeksiyöz hastalık bakımından aynı zamanda önemli bir risk alanıdır. Kanatlı hayvanlardaki AI tip A virüs salgınlarından ikisinin bu havzaya oldukça yakın olan Iğdır ve Batman’da, insanlarda AI tip A virüslerinin neden olduğu ölümlerin Ağrı-Doğubeyazıt’ta yaşanmış olması bu görüşü desteklemektedir.

Ülkemizde dört insanın ölümüyle sonuçlanan ilk ve tek kuş gribi vakası Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde yaşandı. O dönemde, bölgemizde hastalığın teşhisine yönelik bir laboratuvar alt yapısının olmaması, acil önlem alınmasını gerektiren bir konuda geç kalınması endişesini de beraberinde getirdi. Bu projenin yapılmasındaki gerekçelerimizden birisi de; ülkemiz göç yolları ve sulak alanlarının önemli bir noktası olan bölgemizde olası salgınlar karşısında erken teşhis yapabilecek bir laboratuvar alt yapısının oluşturulmasıydı ve bu hedef gerçekleştirilmiş oldu.

Bu çalışma, Türkiye’de AI tip A virüsleri ile ilgili bu başlık ve kapsamda yapılan ilk araştırmadır. Bundan dolayı konuyla ilgili yapılacak diğer çalışmalara önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

TÜBİTAK TOVAG-106O571 nolu proje kapsamında gerçekleştirilen **“Van Gölü Havzasında Bazı Kanatlı Türlerinde Avian İnfluenza A Virüslerinin Real-Time PCR ile Tespiti, İzolasyonu ve Alt Tiplerinin Belirlenmesi ”** başlıklı araştırmaya bilimsel, teknik ve maddi katkılarından dolayı TÜBİTAK’a, TÜBİTAK Tarım Orman Veteriner Araştırma Grubu yürütme komitesi ile danışma kurulu üyelerine, raportörlere, panelistlere, grup çalışanlarına ve Sayın Alper İŞERİ’ye proje ekibi adına teşekkür ederim. 15 Ocak 2009

Prof. Dr. Banur BOYNUKARA

Proje Yürütücüsü

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Önsöz	II
İçindekiler	III-V
Tablolar listesi	VI-VII
Şekiller listesi	VIII
Fotoğraflar listesi	IX-XI
Özet	XI
Abstract	XII
1. GİRİŞ	1-40
1.1. Van Gölü Havzasının ornitofaunistik açıdan değerlendirilmesi	29
1.2. Van Gölü Havzasının göç yollarına yakınlığı	31
1.3. Van Gölü Havzasının kuşların taşıdığı hastalıklar bakımından değerlendirilmesi	33
1.4. Van Gölü Havzasının barındırdığı kuş türleri, statüleri ve göç dönemleri	33
1.4.1. Yerli türler	33
1.4.2. Kış ziyaretçisi türler	34
1.4.3. Göçmen türler	34
1.4.4. Transit göçer türler	34
1.4.5. Rastlantısal tür	34
2. GEREÇ VE YÖNTEM	41-68
2.1. Gereç	41
2.1.1. Örnek alınan alanlar ve kuş türleri	41
2.1.2. RT-PCR çalışmaları için örnek alınması	46
2.1.3. Virus izolasyonu için örnek alınması	46
2.1.4. Referans suş	50
2.2. Yöntem	50
2.2.1. RT-PCR ve virus izolasyon çalışmaları için dışkı örneklerinin hazırlanması	50
2.2.2. RT-PCR uygulamaları	50
2.2.3. Dışkı örneklerinden viral RNA izolasyonu	51
2.2.3.1. Çalışma solüsyonlarının hazırlanması	51
2.2.3.2. Viral RNA izolasyon prosedürü	52
2.2.4. cDNA sentezi	53

2.2.4.1. cDNA sentez reagentlerinin hazırlanması	53
2.2.4.2. Template primer mix hazırlanması	54
2.2.4.3. PCR master mix hazırlanması	54
2.2.5. RT-PCR ile avian influenza tip A matrix protein geninin (M2) tespiti	55
2.2.5.1. Karışım, standart ve reagentlerin hazırlanması	55
2.2.5.2. LightMix® 480HT influenza A virus M2 setindeki parametre-spesifik reagentler ile internal pozitif kontrol reagentlerinin hazırlanması	56
2.2.5.3. LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe kitindeki reagentlerin hazırlanması	56
2.2.5.4. Avian influenza tip A virüs M2 geninin tespiti için LightCycler® reaksiyon karışımının hazırlanması	56
2.2.5.5. RT-PCR pleytinin hazırlanması ve RT-PCR	56
2.2.6. RT-PCR ile avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örneklerin RT-PCR’da H5N1 alt tipinin belirlenmesi	57
2.2.6.1. LightMix® 480HT for the detection of avian influenza A virus (<i>Subtype Asia</i>) H5N1 setindeki parametre spesifik reagentlerin hazırlanması	58
2.2.6.2. LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe kitindeki reagentlerin hazırlanması	58
2.2.6.3. Avian influenza tip A virüs H5N1 alt tipinin tespiti için LightCycler® reaksiyon karışımının hazırlanması	58
2.2.6.4. RT-PCR pleytinin hazırlanması ve RT-PCR	59
2.2.7. Agaroz jel elektroforez	59
2.2.8. Embriyolu tavuk yumurtalarına inokulasyon	60
2.2.9. Hemaglütinasyon testi (HA)	61
2.2.9.1. Lam hemaglütinasyon testi	61
2.2.9.2. Mikro hemaglütinasyon testi	61
2.2.10. Avian influenza virüs tip A antijeninin hızlı test kiti ile tespiti	62
2.2.11. Hemaglütinasyon inhibisyon (HI) testi ile tiplendirme	63
2.2.12. Neuraminidaz inhibisyon (NI) testi	65
2.2.12.1. Test için gerekli antiserum, kimyasal madde ve solüsyonlar	65
2.2.12.2. Testin yapılışı	67
2.2.12.3. Değerlendirme	68
2.2.13. Örneklerin imha edilmesi	68

3. BULGULAR	69-110
3.1. Avian influenza tip A M2 RT-PCR sonuçları	69
3. 2. H5N1 RT-PCR sonuçları	86
3.3. Agaroz jel elektroforez sonuçları	91
3.4. Embriyolu tavuk yumurtalarına inokulasyon sonuçları	95
3.5. Hemaglütinasyon (HA) ve hızlı test sonuçları	99
3.6. Hemaglütinasyon inhibisyon (HI) ve neuraminidaz inhibisyon (NI) test sonuçları	102
4. TARTIŞMA / SONUÇ	111-131
4.1. Projeden çıkarılan sonuçlar	128-130
4.2. Hedef ve öneriler	131
REFERANSLAR	132-151
Ek-1: Proje kapsamında dışkı örneklerinin toplandığı kanatlı hayvan türleri	152-164
Ek-2: RT-PCR ile avian influenza tip A M2 geni yönünden pozitiflik saptanan türler ve statüleri	165-178
Proje özet bilgi formu	179

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1: 1959 yılından itibaren görülen yüksek patojen avian influenza virüs salgınları	7
Tablo 2: Van Gölü Havzasında gözlenen kuş türleri	34-39
Tablo 3: Dışkı örneklerinin toplandığı türlerin statüleri ve örnek sayıları	47
Tablo 4: Dışkı örneklerinin toplandığı türler, statüleri ve toplanan örneklerin yıllara göre dağılımı	48-49
Tablo 5: cDNA sentezinde uygulanan amplifikasyon aşamaları	55
Tablo 6: Avian influenza tip A virüs M2 geninin RT-PCR ile tespit protokolü	57
Tablo 7: Avian influenza tip A virüs H5N1 alt tipinin RT-PCR ile tespit protokolü	59
Tablo 8: Veterinary Laboratory Agency, VLA (Weybridge, İngiltere)'den sağlanan antiserumlar (H1-H16)	64
Tablo 9: Avian Influenza OIE/FAO Reference Laboratory, IZSV'den (Padova, İtalya) sağlanan antiserumlar (H1-H15)	64
Tablo 10: Veterinary Laboratory Agency, VLA (Weybridge, İngiltere)'den sağlanan antiserumlar (N1-N9)	66
Tablo 11: Örnek alınan kanatlı türleri, statüleri, alınan örnek sayıları ve RT-PCR'da AI tip A M2 pozitif olan örneklerin dağılımı	69-70
Tablo 12: RT-PCR ile AI tip A M2 geni yönünden pozitiflik saptanan türler, statüleri, toplanan dışkı örneklerinin yıllara ve alındığı dönemlere göre dağılımı	84
Tablo 13: RT-PCR'da AI tip A M2 yönünden pozitif bulunan örneklerin alındıkları tarih, yer ve örnek sayılarına göre dağılımı	85
Tablo 14: RT-PCR ile M2 pozitif bulunan örneklerin RT-PCR'da H5N1 analiz sonuçları	87-88
Tablo 15: Embriyolu tavuk yumurtasına ekim yapılan örneklerin lam hemagglütinasyon ve hızlı test sonuçları	99
Tablo 16: Lam hemagglütinasyon ve hızlı test pozitif izolatların mikro hemagglütinasyon test sonuçları	101
Tablo 17: İzolatların hemagglütinasyon inhibisyon testi ile elde edilen hemagglütinin alt tipleri ve titreleri	106

Tablo 18: İzolatların neuraminidaz inhibisyon testi ile elde edilen neuraminidaz alt tipleri	107
Tablo 19: İzolatların hemaglütinasyon inhibisyon ve neuraminidaz inhibisyon testinde belirlenen alt tipleri	110

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1: Türkiye'nin önemli sulak alanları	30
Şekil 2: İlkbahar (sol) ve sonbahar mevsimlerinde kuş göç yolları	31
Şekil 3: Türkiye tavuk vebası risk haritası	32
Şekil 4: Van Gölü Havzası kuş göç yolları haritası	32
Şekil 5: Örnek toplanan alanlar	48
Şekil 6a: RT-PCR'da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler	71
Şekil 6b: RT-PCR'da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler	72
Şekil 6c: RT-PCR'da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler	73
Şekil 6d: RT-PCR'da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler	74
Şekil 6e: RT-PCR'da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler	75
Şekil 6f: RT-PCR'da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler	76
Şekil 6g: RT-PCR'da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler	77
Şekil 6h: RT-PCR'da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler	78
Şekil 6ı: RT-PCR'da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler	79
Şekil 6i: RT-PCR'da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler	80
Şekil 6j: RT-PCR'da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler	81
Şekil 6k: RT-PCR'da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler	82
Şekil 7: Pozitif bulunan örneklerin dışkı alınan merkezlere göre dağılımı	86
Sekil 8: RT-PCR'da H5 pozitif örneklerin analiz sonuçları (29, 36, 37, 39)	89
Şekil 9: RT-PCR'da N1 pozitif örneklerin analiz sonuçları (29, 36, 37, 39)	90

FOTOĞRAFLAR LİSTESİ

	Sayfa No
Fotoğraf 1: Teleskop ile kuş gruplarının gözlenmesi	42
Fotoğraf 2: Flamingo grubu ve içerisindeki farklı kuş türleri (heterojen bir grup)	42
Fotoğraf 3: Homojen bir ördek grubu	43
Fotoğraf 4a: Materyal toplanması	43
Fotoğraf 4b: Materyal toplanması	44
Fotoğraf 4c: Prof. Dr. Hiroshi KIDA, 8 Ekim 2008 tarihinde projeye ilgili arazi çalışması, Erçek Gölü, Van	44
Fotoğraf 5a: Belirlenen hayvan türüne ait taze dışkı örneği	45
Fotoğraf 5b: Belirlenen hayvan türüne ait taze dışkı örneği	45
Fotoğraf 6: Dışkı örneğinin transport mediuma alınması	46
Fotoğraf 7: Avian influenza virüs A antijen test kiti	63
Fotoğraf 8: Neuraminidaz inhibisyon testinde tüplere sodyum arsenit eklenmesinden sonra kahve renk oluşumu	68
Fotoğraf 9: RT-PCR ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforezdeki görüntüsü	91
Fotoğraf 10: AI tip A M2 pozitif RT-PCR ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforezdeki görüntüsü	92
Fotoğraf 11: H5N1 alt tipine ait RT-PCR ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforezdeki görüntüsü	93
Fotoğraf 12: H5N1 alt tipine ait RT-PCR ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforezdeki görüntüsü	94
Fotoğraf 13: H5N1 alt tipine ait RT-PCR ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforezdeki görüntüsü	94
Fotoğraf 14a: İnkübasyon sonrası embriyolu tavuk yumurtalarının allantoik sıvılarının toplanması	95
Fotoğraf 14b: İnkübasyon sonrası embriyolu tavuk yumurtalarının allantoik sıvılarının toplanması	96
Fotoğraf 15a: Lam hemagglütinasyon testinde fizyolojik tuzlu su ile eritrosit kontrolü (%1'lik yıkanmış tavuk eritrositi)	96
Fotoğraf 15b: Lam hemagglütinasyon testinde pozitif reaksiyon (%1'lik yıkanmış tavuk eritrositi ile 1752 nolu izolata ait allantoik sıvı)	97

Fotoğraf 15c:	Lam hemaglütinasyon testinde pozitif (1752 nolu izolat) ve negatif (fizyolojik tuzlu su) reaksiyon (%1'lik yıkanmış tavuk eritrositi)	97
Fotoğraf 16a:	İnokulasyon sonrası embriyolardaki gelişme geriliği ve hemorajik değişiklikler	98
Fotoğraf 16b:	İnokulasyon sonrası embriyolardaki gelişme geriliği ve hemorajik değişiklikler	98
Fotoğraf 17a:	Avian influenza tip A antijen test kiti ile pozitif (sol) ve negatif sonuçlar	100
Fotoğraf 17b:	Avian influenza tip A antijen test kiti ile pozitif sonuçlar	100
Fotoğraf 18:	Mikro hemaglütinasyon testi ile titre tespiti (39 nolu izolatın titresini 1/256) ve eritrosit kontrolü (E.K 1, 2)	101
Fotoğraf 19a,b:	Toplam 16 adet (H1-H16) hemaglütinin alt tipine ait antiserumlarla yapılan hemaglütinasyon inhibisyon testinde, H11 antiserumu ile pozitif sonuç veren izolat (594 nolu izolat)	103
Fotoğraf 20a,b:	Toplam 16 adet (H1-H16) hemaglütinin alt tipine ait antiserumlarla yapılan hemaglütinasyon inhibisyon testinde, H1 ve H5 antiserumları ile pozitif sonuç veren izolat (39 nolu izolat)	104
Fotoğraf 21:	36 nolu izolatın hemaglütinasyon inhibisyon testinde newcastle ve avian influenza tip A H1 alt tipine ait antiserumlarla verdiği reaksiyonlar	105
Fotoğraf 22:	37 nolu izolatın hemaglütinasyon inhibisyon testinde, newcastle ve avian influenza tip A H1 alt tipine ait antiserumlarla verdiği reaksiyonlar	105
Fotoğraf 23:	Neuraminidaz inhibisyon testinde elde edilen negatif sonuç	108
Fotoğraf 24:	Neuraminidaz inhibisyon testi ile yapılan tiplendirmede N1 alt tipine ait izolat (29 nolu izolat)	108
Fotoğraf 25:	Neuraminidaz inhibisyon testi ile yapılan tiplendirmede N7 alt tipine ait izolat (55 nolu izolat)	109
Fotoğraf 26:	Neuraminidaz inhibisyon testi ile yapılan tiplendirmede N9 alt tipine ait izolat (1752 nolu izolat)	109

ÖZET

Bu çalışmada, Van Gölü Havzasındaki rastlantısal, transit göçer, kış ziyaretçisi, göçmen ve yerli 47 kanatlı türünü kapsayan toplam 1910 hayvandan alınan taze dışkı örnekleri, avian influenza (AI) tip A virüsü M2 geni yönünden real-time PCR ile test edildi ve örneklerin 51'i (%2.7) pozitif bulundu. RT-PCR pozitif örnekler aynı yöntemle H5N1 yönünden incelendi ve 4 örnek (%7.8) pozitif bulundu. RT-PCR pozitif örnekler embriyolu tavuk yumurtasına ekildi ve 11'inden (%21.6) AI tip A virüsü izole edildi. HI ve NI testleriyle izolatların 3'ü H1N7, 2'si H7N9 ve 2'si H11N9 olarak tiplendirildi.

RT-PCR ile pozitiflik 14 kanatlı türüne ait dışkı örneklerinde saptandı. Bunların 9'u (%64.3) *Anseriformes*, 4'ü (%28.6) *Charadriiformes* ve 1'i de (%7.1) *Phoenicopteriformes* takımına ait türlerden toplandı. RT-PCR pozitif 51 örneğin 35'i (%68.6) 5 kış ziyaretçisi, 8'i (%15.6) 4 yerli, 4'ü (%7.8) 3 göçmen, 3'ü (%5.8) hem kış ziyaretçisi hem de göçmen 1 türde ve 1'i de (%1.3) transit göçer bir türde saptandı. En yüksek pozitiflik kış ziyaretçisi olan *Anas acuta* (%37.1) ve *Anas penelope* (%22.5) türü ördeklerde belirlendi. RT-PCR ile pozitif bulunan 51 örnekten 38'i (%74.6) 2006, 2007 ve 2008 yılları kış-bahar döneminde toplanan materyallerde tespit edildi.

Bu çalışmayla Türkiye'de, Van Gölü Havzasındaki çeşitli kanatlı türlerinde AI tip A virüslerinin varlığı ilk kez ortaya konuldu.

Anahtar Kelimeler: Avian influenza, kanatlı hayvan (rastlantısal, göçmen, yerli, transit göçer, kış ziyaretçisi), dışkı, real-time PCR, M2 geni, H5N1, izolasyon, tiplendirme.

ABSTRACT

In this study, fresh feces samples taken from 1910 animals consisting of 47 avian species covering random, transitory, winter visitor, migratory and native birds in the Van Lake Basin were tested by real-time PCR with respect to avian influenza (AI) type A virus M2 gene and 51 samples (2.7%) were found to be positive.

RT-PCR positive samples were examined with the same method with respect to H5N1 and 4 samples (7.8%) were found to be positive. RT-PCR positive samples were inoculated in embryonated chicken egg and AI type A virus were isolated from 11 samples (21.6%). Of the isolates 3 were typed as H1N7, 2 as H7N9 and 2 as H11N9 with HI and NI tests.

With RT-PCR, positiveness was determined in feces samples of 14 avian species. Of them, 9 (64.3%) were collected from the species belonging to *Anseriformes*, 4 (28.6%) from *Charadriiformes* and 1 (7.1%) from *Phoenicopteriformes* families. Of the RT-PCR positive 51 samples, 35 (68.6%) were originated from 5 different winter visitor birds, 8 (15.6%) from four native, 4 (7.8%) from three migratory and 3 (5.8%) from one both winter visitor and migratory, and 1 (1.3%) from one transitory bird species. The highest positivity was determined in *Anas acuta* (37.1%) and *Anas penelope* (22.5%) that were winter visitor ducks. Of the RT-PCR positive 51 samples, 38 (74.6%) were determined in the samples collected during winter and spring of 2006, 2007 and 2008.

With this study, the presence of AI type A viruses in various avian species in the Van Lake Basin were determined for the first time in Turkey.

Key Words: Avian influenza, poultry (random, migratory, native, transitory, winter visitor birds), feces, real-time PCR, M2 gene, H5N1, isolation, typing.

1. GİRİŞ

Son yüzyılda birçok infeksiyöz hastalık eradike veya kontrol edilmiş olmasına rağmen, özellikle H5N1 alt tipi başta olmak üzere avian influenza (AI) tip A virüs infeksiyonlarının 21. yüzyılın en önemli halk sağlığı problemlerinden biri olduğu kabul edilmektedir (HAMPSON, 2006; JUCKETT, 2006; KIDA, 2008). Sadece geçen yüzyılda AI virüsleri 4 farklı pandemi oluşturarak, tüm dünyada çok sayıda insan ve kanatlı hayvanın ölümüne neden olmuştur (WU ve YAN, 2006).

AI tip A virüs infeksiyonları Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi (OIE) tarafından en tehlikeli insan ve hayvan hastalıkları grubunda sınıflandırılmaktadır. Hastalık 19. yüzyılın sonlarından itibaren bilinmekte olup, tavuk vebası ile ilgili ilk raporlar İtalyan Edoardo Perrencito tarafından sunulmuştur. Bunu takip eden 100 yıllık süreçte, zaman zaman patojenitesi yüksek avian influenza (HPAI) patotipindeki tip A virüslerinin neden olduğu çeşitli salgınlar yaşanmıştır. Bu salgınların bir kısmı etkili bir şekilde kontrol altına alınmış olmakla birlikte, birçoğu önemli ekonomik kayıplara neden olmuştur. 1959-1998 yılları arasında hastalığın öneminin 19. yüzyıla göre 100 kat arttığı ve bu süreçte 23 milyon kanatlının hastalıktan etkilendiği bildirilmektedir. 2000’li yıllara gelindiğinde ise salgınlar dikkat çekici bir düzeyde artış göstermiştir (CAPUA ve ALEXANDER, 2004; HAMPSON, 2006; KNOSSOW ve SKEHEL, 2006).

Orthomyxoviridae familyasında yer alan influenza virüsleri pleomorfik, zarflı, negatif polariteli ve tek iplikli RNA karakterinde genetik madde taşıyan etkenlerdir. İnfluenza virüsleri iki önemli internal yapı olan nükleoprotein (NP) ve matriks (M) proteinlerindeki farklılıklara göre A, B ve C olmak üzere 3 tipe ayrılmaktadır. Doğal infeksiyonlarda insanlarda daha çok B ve C, ayı balığından B, domuzlardan ise C tipi izole edilmiştir (PALESE ve YOUNG, 1982; ELLIS ve ZAMBON, 2001; HAMPSON, 2006; ŞANLIDAĞ ve ark., 2006). Kanatlılarda sadece influenza A virüsleri doğal infeksiyonlara neden olmaktadır. Bu virüsler; göçmen kuşlar, yabani kanatlılar, kafes kuşları, tavuk, ördek ve hindi gibi birçok kanatlı türü ile insan, domuz, kedi, köpek, at, mink ve balina gibi çeşitli memelilerden izole edilmiş olmakla birlikte, göçmen su kuşlarının etkenin doğal konakçıları olduğu bildirilmektedir (SHARP ve ark., 1993; JUCKETT, 2006; CAPUA ve ALEXANDER, 2007; HAPPOLD ve ark., 2008; IVANOW ve ark., 2008).

H5N1 alt tipi başta olmak üzere, AI tip A virüs infeksiyonlarına karşı alınan önlemlerin etkisiz kalmasında, virüsün sahip olduğu yüksek mutasyon yeteneğinin katkısı büyüktür. İnfluenza A virüslerinin genomik RNA’sı oldukça küçük olup, 8 segmentten

oluşmaktadır. Bunların da 11 farklı yüzeysel ve internal proteini [hemaglütinin (H), neuraminidaz (N), nükleoprotein (NP), polimeraz kompleks proteinler (PB1, PB2 ve PA), matriks 1 ve 2 protein (M1 ve M2) ve non-strüktürel protein (NS1)] kodladığı bildirilmektedir (WEBSTER ve ark., 1992; TOLLIS ve DI TIRANI, 2002; KNOSSOW ve SKEHEL, 2006; RAMEIX-WELTI ve ark., 2009). Bunlardan H, N ve M2 proteinlerinin yüzeysel; NP, PB1, PB2, PA ve M1'in ise internal proteinler oldukları ifade edilmiştir (TOLLIS ve DI TIRANI, 2002). Tek bir hücre içinde 2 farklı AI tip A virüs alt tipi üreyebilmekte ve üreme esnasında RNA parçaları da iki hücre arasında yer değiştirebilmektedir. Ortaya çıkan bu yeni partikül, kendine has özellikleri olan yeni bir influenza A virüsü alt tipi olarak fonksiyon yapabilmektedir. Bir çok alt tipin (H5N1, H5N2 ve H3N2 gibi) bu şekildeki rekombinasyonlarla oluştuğu ifade edilmiştir (WEBSTER ve ark., 1992; TOLLIS ve DI TIRANI, 2002). Evcil kanatlılardan sıklıkla izole edilen H9N2 alt tipinin genetik olarak H5N1 ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (TOLLIS ve DI TIRANI, 2002). Farklı konakçılardan izole edilen AI tip A virüsleri kullanılarak internal proteinleri kodlayan gen grubunun, filogenetik analizlerinde, tüm alt tiplerde fazla miktarda mutasyonların olduğu saptanmıştır. Bu mutasyonların daha çok hemaglütinin daha az olarak da neuraminidaz gen bölgesinde olduğu bildirilmektedir (CHEN ve ark., 2004; MUZAFFAR ve ark., 2006; WU ve YAN, 2006; SERPEN, 2007; CAPUA ve ALEXANDER, 2007).

Yüzey glikoproteinlerinin antijenik yapıları dikkate alındığında influenza A virüsleri, hemaglütinin (H) ve neuraminidaz (N) alt tiplerine ayrılmaktadır. Günümüzde 16 H (H1-16) ve 9 N (N1-N9) alt tipi tanımlanmıştır. Her bir influenza A virüsü 1 adet H ve 1 adet N alt tipinin kombinasyonundan oluşmaktadır. H glikoproteini konak hücre yüzeyindeki sialik asit yapılarına bağlanarak, virüsün konak hücrelere girişini sağlamaktadır. İnsan influenza virüsleri, α 2,6 zinciri ile galaktoza bağlı sialik asit rezidülerine bağlanırken, kanatlı ve equide orijinli izolatlar galaktoza α 2,3 zinciri ile bağlı sialik asit yapısına bağlanmaktadır. Kısaca; insan solunum yolu hücreleri temel olarak α 2,6 sialik asit-galaktoz zincir yapısı içerirken, kanatlı ve equidelerdeki konak hücreler α 2,3 zinciri içermektedir. Domuzlardaki epitel hücreleri ise α 2,6 ve α 2,3 zincirlerini birlikte barındırmaktadır. Bu nedenle domuzlar, hem insan hem de kanatlı orijinli suşlara duyarlıdır. Bu hayvanların birlikte aynı anda hem kanatlı hem de insan influenza virüsleriyle infekte olması durumunda, pandemiler için yeni bir konak olabileceği düşünülmektedir (KIDA ve ark., 1994; ITO ve ark., 1998; ŞANLIDAĞ ve ark., 2006). Çeşitli kanatlı türlerinden izole edilen AI tip A virüslerinin aralarında antijenik farklılıklar olduğu bildirilmektedir. Yapılan bir çalışmada; ördek ve su tavuklarından izole

edilen influenza A virüslerinin hem saha orijinli başka suşlar hem de referans suşlarla aralarında önemli antijenik farklılıkların olduğu rapor edilmektedir (DE MARCO ve ark., 2004).

İnfluenza A virüslerinin virulens özelliklerinin belirlenmesinde en önemli protein olan H yüzey molekülü, başlangıçta tek bir polipeptit ön molekülü olarak (HA0) sentezlenmektedir. Sentezlenen HA0 molekülü proteaz enzimleri tarafından HA₁ ve HA₂ alt ünitelerine ayrılmaktadır (WEBSTER ve ark., 1992; TOLLIS ve DI TIRANI, 2002). Hemagglütinin molekül yoğunluğunun neuraminidaz molekülüne oranı 8:1 olup, bu moleküller koruyucu bağışıklığın oluşmasında, viral partikülün en önemli antijenik determinantları olarak kabul edilmektedir (WILEY ve SKEHEL, 1987). Diğer bir yüzey molekülü olan M2 proteini, iyon kanalı gibi görev yaparak, viral replikasyonun erken dönemlerindeki soyulma sırasında virüsün iç pH'sını düzenlemektedir. Bu fonksiyon amantadin ve rimantadin gibi antiviral ilaçlar tarafından bloke edilebilmektedir (ŞANLIDAĞ ve ark., 2006).

İnfluenza A virüsleri fiziksel ve kimyasal ajanlara orta düzeyde duyarlıdır. Etkenler, 56°C'de 3 saatte, 60°C'de ise 30 dk'da inaktive olmaktadır. Formalin, aldehit, gluteraldehit, hidrojen peroksit, sodyum hidroksit, iyot, fenol ve fenollü bileşikler başta olmak üzere, bir çok kimyasal madde ve dezenfektana duyarlıdır (ŞANLIDAĞ ve ark., 2006; DE BENEDICTIS ve ark., 2007; LOMBARDI ve ark., 2008).

İnfluenza virüslerinin izolasyonu embriyolu tavuk yumurtaları başta olmak üzere çeşitli kanatlılara ait embriyolu yumurtalar ile MDCK ve LLC-MK2 gibi hücre kültürlerinde yapılmaktadır (HUANG ve TURCHEK, 2000; ARDA ve ark., 2002; PLAYFORD ve DWYER, 2002; ŞANLIDAĞ ve ark., 2006).

Günümüze kadar, çoğunluğu göçmen kuşlardan olmak üzere çeşitli kanatlı türlerinden virüsün toplam 144 farklı alt tipi izole edilmiştir (TUMPEY ve ark., 2005; OLSEN ve ark., 2006; CAPUA ve ALEXANDER 2007; SWAYNE, 2007; ALEXANDER, 2008; CAPUA ve ALEXANDER 2008). Tarihsel olarak 1902 yılında ilk izole edilen AI virüs alt tipinin H7N7 olduğu bildirilmektedir (TOLLIS ve DI TIRANI, 2002).

İnfluenza A virüsleri çeşitli kanatlı türleri ve özellikle tavuklar için letalitesine göre iki patotipe ayrılmaktadır. Bunlar patojenitesi yüksek avian influenza (HPAI) ve patojenitesi düşük avian influenza (LPAI) virüsleridir (SWAYNE, 2007). HPAI virüsleri, birçok organı etkileyerek sistemik infeksiyonla sonuçlanan, yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden bir hastalık tablosu oluşturmaktadır. LPAI virüslerinin ise daha çok evcil kanatlılardan izole edildiği, hafif solunum sistemi infeksiyonu ve yumurta veriminde düşme ile ilişkili olduğu

bildirilmektedir (TUMPEY ve ark., 2005). H5 ve H7 alt tipleri, duyarlı kanatlılar için HPAI virüsleri olarak kabul edilmekte ve kanatlılarda %100 ölüm oluşturmaktadır. Ancak H5 ve H7 izolatların tamamının, tüm kanatlı hayvanlar için yüksek patojenik özellikte olmadığı bildirilmektedir (CAPUA ve ALEXANDER, 2004). Bazı Avrupa Birliği Ülkelerinde intravenöz patojenite indeksi (IVPI) veya H gen bölgesinin sekans analizi ile saha orijinli bir AI tip A virüsünün, HPAI veya LPAI patotipi belirlenebilmektedir (TOLLIS ve DI TIRANI, 2002; ALEXANDER, 2008).

HPAI patotipindeki H5 ve H7 alt tiplerine ilave olarak H10 alt tipine ait bazı nefropatojenik izolatların, IVPI değerinin 1.2'den yüksek olduğu durumlarda, fazla miktarda ölüm oluşturduğu bildirilmektedir (SWAYNE ve ALEXANDER, 1994). Örneğin, iki farklı salgından izole edilen H10 alt tipinin HPAI patotipinde olduğu belirlenmiştir (WOOD ve ark., 1996).

Son yıllarda AI tip A virüslerinin neden olduğu infeksiyonların artması, hastalığın tanımlanması ve bildirimiyle ilgili kuralların yeniden düzenlenmesini gerekli kılmıştır. Daha önceki yıllarda sadece HPAI patotipindeki virüs infeksiyonları bildirimi zorunlu iken, 2005 yılında OIE tarafından yapılan düzenleme ile o zaman kadar LPAI patotipinde olan H5 ve H7 alt tiplerinin neden olduğu infeksiyonlar bildirimi zorunlu hastalıklar kapsamına alınmıştır (ALEXANDER, 2008).

Günümüzde, farklı metotlardan yararlanılarak H gen bölgesinin sekans analizi yapıldığında bir izolatın geçirdiği mutasyon düzeyi ve etkenin HPAI patotipine ait H5 ve H7 alt tiplerinden olup olmadığı belirlenebilmektedir (WOOD ve ark., 1997; WU ve YAN, 2006; DUGAN ve ark., 2008; SAITO ve ark., 2009). Uygulanan bu metotlardan özellikle H gen bölgesini amplifiye eden primerler ve ticari kitler kullanılarak yapılan real-time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) en çok kullanılan yöntemlerden birisidir (WOOD ve ark., 1993; KNOSSOW ve SKEHEL, 2006; ALEXANDER, 2008). Li ve ark. (2006), 2001-2002 yılları arasında Vietnam'da farklı hayvanlardan izole edilen 30 adet A/H3N2 ve 35 adet A/H1N1 alt tiplerinin H, N ve M gen bölgelerini analiz ettikleri çalışmalarında; H ve N bölgelerinde genetik değişikliklerin olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, AI tip A virüslerinin ülke içinde yıl boyunca taşıyıcı hayvanlar aracılığıyla dolaştığını, yeni alt tiplerin ortaya çıkışının sıcak bölgelerde daha erken olduğunu ve bunların belirlenmesinde epidemiyolojik taramaların oldukça önemli olduğunu ifade etmektedirler.

Bir çok araştırmacı AI tip A virüslerinin mutasyon yeteneklerinin fazla olduğunu bildirmektedir (BERG ve ark., 1990; WEBSTER ve ark., 1992; CHEN ve ark., 2004;

MUZAFFAR ve ark., 2006). Buna karşın, her alt tipin gelecekte göstereceği mutasyonun farklı düzeylerde olacağını da ileri süren araştırmacılar bulunmaktadır. Örneğin, mutasyon eğiliminin H2'den H4'e ve H5'den H7'ye doğru fazla olmayacağı, buna karşın H11'den H14'e doğru ise daha fazla olacağı ifade edilmektedir. Hemagglütinin alt tipleri (H1-H6) dikkate alındığında, mutasyona en yatkın alt tipin H5 olduğu bildirilmektedir (WU ve YAN, 2006; DUGAN ve ark., 2008).

HPAI virüslerin, LPAI virüslerin bir mutasyonu (özellikle HA0 gen bölgesindeki mutasyon) veya genetik rekombinasyonu sonucu oluştuğu bilinmektedir (ROTT, 1992; GARCIA ve ark., 1996). AI tip A virüslerinin doğal konakçıları olan göçmen kuşlarda fazla mutasyon geçirmediği; esas mutasyonun, etkenin diğer yabani ve evcil kuşlara bulaşmasıyla, bu hayvanların bünyelerinde gerçekleştiği bildirilmektedir (ŞANLIDAĞ ve ark., 2006). Hong Kong'da 1997 yılında HPAI patotipindeki H5N1 virüsünün 6 insanda ve çok sayıdaki kanatlı hayvanda ölüm oluşturduktan sonra tekrar mutasyon geçirerek, 2002 yılında 1 insan ile çok sayıdaki evcil, yabani ve egzotik kanatlı hayvanda ölümlere neden olduğu ifade edilmiştir (STURM-RAMIREZ ve ark., 2004; WEBSTER ve ark., 2006). Yapılan deneysel bir çalışma bu durumu destekler niteliktedir (ITO ve ark., 2001). Chen ve ark. (2004), 1999-2002 yılları arasında klinik olarak sağlıklı görünen ördeklerden izole ettikleri toplam 21 adet H5N1 izolatu ile farelerde yaptıkları deneysel bir çalışmada, izolatların mutasyon geçirdiğini ve memeliler için patojenitelerinde önemli oranda artış görüldüğünü belirlemişlerdir.

AI tip A virüsleri sahip oldukları yüksek mutasyon özellikleri nedeniyle tür bariyerini aşarak, çeşitli su kuşlarından farklı hayvan türlerine bulaşabilmektedir. Şiddetli solunum yolu semptomları gösteren ayı balıklarından izole edilen H7N7, H4N5, H4N6 ve H3N3 alt tiplerinin antijenik ve genetik olarak su kuşu orijinli izolatlarla benzer olduğu bildirilmiştir (CALLAN ve ark., 1995). Chambers ve ark., (1989), balinalardan izole edilen H1N3 izolatlarının, martılardan izole edilen H13N2 ve H13N9 alt tipleriyle antijenik olarak benzer olduğunu ifade etmişlerdir. Berg ve ark., (1990), 1984 yılında İsveç'teki mink çiftliklerinde salgınlara neden olan H10N4 alt tipinin kanatlı orijinli olduğuna dikkat çekmişlerdir. Çin'de 1989-1990 yıllarında solunum sistemi semptomları gösteren atlardan izole edilen H3N8 izolatlarının yapılan sekans analizinde, diğer equide orijinli izolatlardan farklı olduğu bildirilmiştir (GUO ve ark., 1995).

AI tip A virüsleri arasındaki mutasyon ve rekombinasyonu tetikleyen faktörlerin neler olduğu tam olarak açıklanamamakla birlikte (CAPUA ve ALEXANDER, 2007), kanatlı hayvanların geçirdiği seleksiyon ya da mutasyonun bu konuda etkili olduğu sanılmaktadır.

LPAI ve HPAI virüsler kullanılarak yapılan deneysel çalışmalarda, LPAI virüsü ile infekte edilen bir konakçıda, etkenin bu konağa adapte olabilmesi ve HPAI patotipindeki bir virüse dönüşebilmesi için tek bir gen bölgesinde oluşan mutasyonun yeterli olduğu bildirilmektedir. Ortaya çıkan bu mutantın yeni infeksiyon ya da salgınlara neden olabileceğine dikkat çekilmektedir. Bu nedenle, AI tip A virüs infeksiyonlarıyla mücadelede, farklı canlılardan izole edilen suşların mutasyon düzeylerinin izlenebilmesi için veteriner ve beşeri hekimlikten elde edilen bilgilerin birlikte analiz edilmesinin, oldukça önemli olduğu bildirilmektedir (GARCIA ve ark., 1996; TOLLIS ve DI TRANI, 2002; THOMAS ve ark., 2005; CAPUA ve ALEXANDER, 2008).

Son zamanlarda HPAI tip A virüs infeksiyonlarının evcil kanatlı hayvanlarda daha sık görülmesi ve etkenin bu hayvanlardan insanlara direkt bulaşması, bu infeksiyonlara olan ilginin artmasına ve böylece de konuyla ilgili bilimsel çalışmaların daha fazla yapılmasına neden olmuştur. Bu konuda bilim çevrelerini endişelendiren en önemli konu, Asya orijinli HPAI patotipindeki H5N1 alt tipinden köken alan ve insanlarda pandemilere neden olabilecek yeni bir izolatin ortaya çıkma tehlikesidir. Beklenen pandemi için üç koşuldan ikisinin gerçekleştiğine dikkat çekilmektedir. Bunlarda biri AI tip A virüsleriyle infekte olan insanlarda koruyucu düzeyde doğal aktif bağışıklığın gelişmemesi, diğeri de özellikle Güney Doğu Asya Ülkeleri başta olmak üzere dünyanın bazı bölgelerinde etkenin artık endemik bir seviyeye ulaşmış olmasıdır (ŞANLIDAĞ ve ark., 2006). Diğer yandan, çeşitli hayvanlarda görülebilecek influenza pandemilerine bağlı olarak, özellikle gelişmekte olan ülkelerde hayvansal protein kaynaklarında azalmaların yaşanacak olması, hastalığın önemini daha da artırmaktadır (CHEN ve ark., 2005; CAPUA ve ALEXANDER, 2008).

İlk HPAI tip A virüs salgını H5 alt tipi tarafından 1959 yılında İskoçya’da yaşanmıştır. Bu tarihten sonra HPAI patotipindeki H5 veya H7 alt tipleri tarafından Güney Afrika (1961), İngiltere (1963, 1979, 1991), Kanada (1966), Avustralya (1976, 1985, 1992, 1995, 1997), Almanya (1979), İrlanda (1983-1984), Pensilvanya (1983-1984), Meksika (1993-1995), Pakistan (1994-1995), Hong Kong (1997) ve İtalya’da (1997-1998, 1999-2000) çeşitli salgınlar görülmüştür (CAPUA ve ark., 2000a; ALEXANDER, 2000). 1959-2006 yılları arası dikkate alındığında, HPAI tip A virüslerinin 25 farklı salgına neden olduğu görülmektedir. Bu 47 yıllık zaman diliminin ilk 34 yılında (1959-1992) yaklaşık 3 yılda bir salgın görülürken (toplam 11 salgın), 1992-2006 yılları arasında ise her yıl bir salgın yaşanır olmuştur (CAPUA ve ALEXANDER, 2007; ALEXANDER, 2008) (Tablo 1).

Tablo 1: 1959 yılından itibaren görülen patojenitesi yüksek avian influenza virüs salgınları (CAPUA ve ALEXANDER, 2007; ALEXANDER, 2008).

	HPAI Virüs İzolatları*	Alt Tip
1	A/chicken/Scotland/59	H5N1
2	A/turkey/England/63	H7N3
3	A/turkey/Ontario/7732/66	H5N9
4	A/chicken/Victoria/76	H7N7
5	A/chicken/Germay/79	H7N7
6	A/turkey/England/199/79	H7N7
7	A/chicken/Pennsylvania/1370/83	H5N2
8	A/turkey/Ireland/1378/83	H5N8
9	A/chicken/Victoria/85	H7N7
10	A/turkey/England/50-92/91	H5N1
11	A/chicken/Victoria/1/92	H7N3
12	A/chicken/Queesland/667-6/94	H7N3
13	A/chicken/Mexico/8623-607/94	H5N2
14	A/chicken/Pakistan/447/94	H7N3
15	A/chicken/NSW/97	H7N4
16	A/chicken/Hong Kong/97	H5N1
17	A/chicken/Italy/330/97	H5N2
18	A/turkey/Italy/99	H7N1
19	A/chicken/Chile/2002	H7N3
20	A/chicken/Netherland/2003	H7N7
21	A/chicken/Eurasia&Africa/2003-7	H5N1
22	A/chicken/Texas/2004	H5N2
23	A/chicken/Canada-BC/2004	H7N3
24	A/ostrich/S. Africa/2004	H5N2
25	A/chicken/N. Korea/2005	H7N7

*İnfluenza virüsleri isimlendirilirken; virüsün tipi, konakçısı (insan hariç), izolasyon yeri, suş numarası, izolasyon yılı ve parantez içinde alt tipi sıra ile yazılır (ARDA ve ark., 2002, ŞANLIDAĞ ve ark., 2006).

Bu salgınların her biri önemli ekonomik kayıplara neden olmuştur. Örneğin, 1999 yılında İtalya’da HPAI H7N1 alt tipinin neden olduğu salgında, 3 aylık bir periyotta yaklaşık

13 milyon kanatlı hastalıktan ölmüş ya da imha edilmiştir (CAPUA ve MARANGON, 2000). Yine HPAI H7N7 alt tipinin 2003 yılında Hollanda’da neden olduğu epidemide toplam 30 milyon kanatlının imha edildiği ve ekonomik kaybın 270 milyon Euro olduğu bildirilmiştir (THOMAS ve ark., 2005).

İnfluenza A virüslerinin neden olduğu epidemiler incelendiğinde, daha çok varyant suşlar tarafından oluşturulduğu, salgınların ağırlıklı olarak Güney Yarım Küredeki ülkelere başlayarak, dünyanın diğer bölgelerine yayıldığı ve hastalığın nem oranının yüksek olduğu, kış aylarında daha fazla görüldüğü dikkati çekmektedir. Aynı yıl içinde yaşanan epidemilerin alt tiplerin antijenik değişimlerinden, yaklaşık 10-50 yıllık periyotlarda görülen pandemilerin ise yeni alt tiplerin ortaya çıkmasından ileri geldiği bildirilmiştir (POTTER, 2001; HAMPSON, 2006).

AI tip A virüslerinin kompleks biyolojilerinin anlaşılması için konakçı adaptasyonu, bulaşma, infektivite, doku tercihi, lezyonlar ve hastalık oluşturma gibi bir çok kriter dikkate alınmaktadır (SWAYNE, 2007).

Özellikle göçmen su kuşları (kaz ve kuğu gibi) başta olmak üzere diğer bazı yabani kanatlılar, gerek HPAI gerekse LPAI virüslerinin endemik taşıyıcısıdır (TOLLIS ve DI TRANI, 2002; TUMPEY ve ark., 2005). İnfluenza A virüslerinin yabani kanatlılardan ilk izolasyonu *Sterna hirundo*’dan 1961 yılında yapılmıştır (ALEXANDER, 2000). AI tip A virüsleri taşıyıcı hayvanlara bulaştıktan sonra özellikle sindirim sistemi başta olmak üzere, solunum sistemine de lokalize olmaktadır. Etken; taşıyıcı, rezervuar ya da hasta hayvanların dışkı ve diğer sekresyonlarıyla fazla miktarda çıkarılarak; su, kafes, alet ve ekipmanlar, toz, toprak ve çevreyi yoğun olarak kontamine etmektedir (TUMPEY ve ark., 2005; JUCKETT, 2006; OLSEN ve ark., 2006; ŞANLIDAĞ ve ark., 2006; SONG ve ark., 2009). Evcil kanatlılar başta olmak üzere diğer tüm kanatlı hayvanlara bulaşma direkt ve indirekt yollarla olmaktadır. Rezervuar veya taşıyıcı hayvanların bir bölgeden başka bir bölgeye ya da ülkeye ulaşmasıyla etken, geniş bir coğrafyaya yayılmaktadır (CAPUA ve ALEXANDER, 2007).

Dışkı, AI tip A virüslerinin duyarlı hayvanlara bulaşmasında en önemli araçlardan biridir. Etkenin; 10^7 adet virüs partikülü içeren 1 gram dışkıda 44 günden fazla, düşük ısılardaki dışkı örneklerinde ise en az 3 ay canlı kaldığı bildirilmektedir (TUMPEY ve ark., 2005; ŞANLIDAĞ ve ark., 2006; CAPUA ve ALEXANDER, 2007). Dışkı ile kontamine olmuş içme suları, yumurta, kafes ve diğer ekipmanlarla indirekt bulaşma olmaktadır (HALVORSON ve ark., 1980; GLASS ve ark., 1981). Suyun pH’sı, tuz oranı ve sıcaklığı influenza A virüslerinin aktivitelerini fazlaca etkilemektedir. İnfluenza virüsleri göl sularında

22°C’de 4 gün, 0°C’de ise 30 günden fazla canlı kalabilmektedir. Sudaki virüsün titreleri dikkate alındığında; 17°C’de 21-34 günde, 28°C’de ise 5-17 günde azalmaların olduğu saptanmıştır (ŞANLIDAĞ ve ark., 2006). Hayvan yoğunluğunun fazla olduğu sulak alanlarda, özellikle de aynı suyu içen hayvanlar arasında etken, fekal-oral yolla kolaylıkla bulaşabilmektedir. Yapılan çalışmalarda sulak alanlarda yaşayan kuşlarda prevalansın çok yüksek olduğu tespit edilmiştir (STALLKNECHT ve ark., 1990; DELOGU ve ark., 2003; OLSEN ve ark., 2006). Sadece ördeklerde olmak üzere, bazı yıllarda LPAI virüslerinin kış aylarında prevalansı artabilmektedir. Bu da, bulaşmanın sadece su ile olduğu durumlarda, kış süresince suların donması ve dolayısıyla virüsün canlılığını uzun süre devam ettirebilmesi ile açıklanmıştır (WEBSTER ve ark., 1992). AI tip A virüslerinin kanatlı hayvanlara bulaşmasında insan ve fomitler de önemli roller üstlenmektedir (TOLLIS ve DI TRANI, 2002).

Çok sayıda araştırmacı, *Anseriformes* takımında bulunan *Anatidae* familyası ile *Charadriiformes* takımında bulunan yabani kuşların, influenza A virüslerinin doğal konakçıları olduğunu belirtmektedir. Göçmen su kuşlarından H5 ve H7 alt tipleri de dahil olmak üzere 16 farklı H alt tipinin izole edildiği ve bu hayvanların AI tip A virüsleri için en önemli rezervuarlar oldukları bildirilmesine karşın (DOUGLAS ve ark., 2006; WEBSTER ve ark., 2006), su kuşlarının AI tip A virüs alt tiplerinin tamamı için aynı derecede rezervuar olmadıklarına dikkat çekilmektedir (SHARP ve ark., 1993). Kuşlar dünyanın kurak bölgeleri hariç her tarafa yayılmış olup, kıtalararası uçabilmektedir. AI tip A virüslerinin ülkeler ve kıtalararası yayılması kuşlar aracılığıyla olmaktadır (ALEXANDER, 2000; WEBSTER ve ark., 2002; DELOGU ve ark., 2003; OLSEN ve ark., 2006). Bu konuyla ilgili olarak, AI virüslerinin prevalansının belirlenmesi amacıyla 12 cinse ait 88 farklı yabani kuş türünde yapılan epidemiyolojik bir çalışmada, 21318 hayvan, izolasyon yöntemiyle analiz edilmiştir. İzolasyon sonuçları toplam olarak değerlendirildiğinde, 2317 (%10.9) hayvanda pozitiflik saptanmıştır. Aynı çalışmada, *Anseriformes* takımına ait hayvanların %15.2’sinden etken izole edilmiştir. *Passeriformes* takımı %2,9’undan, yağmurkuşlarının ise %2.2’sinden AI virüsünün izole edildiği bildirilmiştir (STALLKNECHT ve SHANE, 1988).

Yabani ördeklerdeki AI tip A virüslerinin prevalansı; Kanada’da kümes hayvanları yetiştiriciliği yapılan bölgelere yakın bataklık alanlarda yaşayanlarda %60, ABD’nin güneyindeki bekleme bölgelerinde barınanlarda %0.4-2, ilkbaharda geri dönüş sonrası ise %0.25 olarak saptanmıştır (OKAZAKI ve ark., 2000). Kanada’da 26 yıl süren epidemiyolojik bir çalışmada (MUNSTER ve ark., 2005), ördeklerden en fazla H3, H4 ve H6, bunlardan daha

az olarak da H1, H2, H7, H10 ve H11 alt tipleri izole edilmiştir. Aynı çalışmada H5, H8, H9 ve H12'nin ise en az izole edilen alt tipler olduğu bildirilmiştir. Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'daki yabani ördeklerden H13, H14, H15 ve H16 hariç diğer tüm alt tipler izole edilmesine rağmen, en fazla H3, H4 ve H6'nın izole edildiği, diğer alt tiplerin izolasyon oranlarının ise önemli derecede farklılık gösterdiği ifade edilmiştir (HANSON ve ark., 2003).

Ördekler içinde en fazla çalışma *Anas* cinsine ait *Anas platyrhynchos*'ta yapılmıştır. Bu genusta en yüksek prevalans ise %18.1 ile *Anas rubripes*'te saptanmıştır. Bunu %12.9 ile *Anas platyrhynchos*, %11.5 ile *Anas discors*, %11.2 ile *Anas acuta*, %6.5 ile *Tadorna tadorna*, %4 ile *Anas crecca*, %3.7 ile *Anas poecilorhyncha*, %2.2 ile *Aix sponsa*, %1.5 ile *Anas strepera* ve %0.8 ile *Anas penelope* izlemektedir. Kazlarda yapılan çalışmada prevalans; *Anser albifrons*'ta %2.2, *Anser anser*'de %1.1 ve *Branta canadensis*'de %0.8 olarak belirlenmiştir. Günümüzde tavuklarla birlikte yetiştirilen evcil kaz ve ördeklerin atası olan yabani kaz ve ördekler, influenza A virüsü bakımından yabani ve evcil kanatlılar arasında bir köprü görevi görmektedir (OLSEN ve ark., 2006).

Martılarla yapılan bir çalışmada, AI tip A virüslerinin prevalansı *Larus ridibundus*'da %2.2, *Larus delawarensis*'de %2, *Larus argentatus*'da %1.4, *Larus crassirostris*'te ise %1 olarak saptanmıştır. Bu hayvanlar arasında en fazla izolasyon *Larus ridibundus* türünden yapılmış olup, en çok izole edilen alt tipin LPAI patotipindeki H13 olduğu bildirilmiştir. İzolasyon oranının yaz mevsiminin sonlarına doğru daha yüksek olduğu, genç ve ergin hayvanların birlikte yaşamaları durumunda, etkenin hayvanlar arasında daha kolay yayıldığı ifade edilmiştir (OLSEN ve ark., 2006). İsviçre'de, karabaş martıdan H13 ile ilişkili olduğu düşünülen H16 alt tipinin izole edildiği rapor edilmiştir (FOUCHIER ve ark., 2005).

Kuğularda yapılan çalışmalarda prevalansın; *Cygnus columbianus*'ta %2.8, *Cygnus cygnus*'ta %1.5 ve *Cygnus olor*'da ise %1.3 olduğu bildirilmiştir (OLSEN ve ark., 2006). Çek Cumhuriyeti'nde yapılan bir çalışmada, bazı kanatlı hayvan türlerinden HPAI patotipindeki H5N1 alt tipinin izole edildiği ve kuğuların influenza A virüslerinin önemli taşıyıcılarından birisi olduğu vurgulanmıştır (NAGY ve ark., 2007).

Olsen ve ark. (2006), toplam 9 farklı deniz kırlangıcı türünü birlikte değerlendirdikleri çalışmada prevalansın; *Sterna hirundo*'da %1.7, *Fulica atra*'da %1.2, *Phalacrocorax carba*'da %0.4 ve *Puffinus pacificus*'da ise %0.5 olduğunu belirlemişlerdir.

Çamurcunlar, deniz ya da tatlı su kenarlarındaki sulak alanlara adapte olmuşlardır ve diğer ördeklerle içiçe bir yaşam sürdürürler. Çamurcunlardan en fazla H1, H2, H5, H7 ve H9-

H12 alt tiplerinin izole edildiği ve prevalansın en yüksek yaz aylarında saptandığı ifade edilmiştir (KRAUSS ve ark., 2004).

LPAI patotipindeki virüslerinin 26 farklı familya ait en az 105 değişik yabani kuş türünden izole edildiği, bu virüslerin Kuzey Amerika'daki ördeklerde prevalansının %0.4-2 arasında değiştiği, Kuzey Avrupa'daki göçmen ördeklerde %6.5'ten, Sibiry'a'daki yabani göçmen kuşlarda ise %8'den yüksek olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda yabani su kuşlarından HPAI virüslerinin, LPAI'dan daha düşük oranda izole edildiği belirtilmektedir (CAPUA ve ALEXANDER, 2007).

AI tip A virüslerinin taşınmasında ördeklerin rollerini belirlemek amacıyla bazı deneysel çalışmalar da yapılmıştır. Bu çalışmalardan birinde, evcil yeşilbaş ördekler 2'şer hayvandan oluşan gruplara ayrılmış ve referans H5N1 virüsü 10 günlük embriyolu tavuk yumurtasında üretilip, hayvanlara verilmiştir. Virüs, çalışma gruplarının bir kısmına 0.5 ml kloakaya sürülerek, bir gruba 0.2 ml trakheaya damlatarak ve diğer gruba da 0.1 ml miktarında göze damlatılarak uygulanmıştır. Bu uygulamadan 6 saat sonra, virüs bulaştırılmamış 2 adet ördek, virüs verilen ördeklerin barınaklarına bırakılarak, aynı yem ve suyu tüketmeleri sağlanmıştır. Tüm hayvanlar 21 gün süresince, AI tip A virüs enfeksiyonu yönünden klinik olarak muayene edilirken aynı zamanda, kloakal ve trakheal svaplar alınarak etken izolasyonu da amaçlanmıştır. Sonuç olarak, evcil ördeklerin 17 gün süresince H5N1 virüsünü çevreye aktif bir şekilde yaydıkları tespit edilmiştir (HULSE-POST ve ark., 2005).

AI tip A virüslerinin yabani su kuşlarından, evcil hindi ve yeşilbaş ördeklere, mevsimsel bulaşma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan başka bir çalışmada, hayvanlardan öncelikle klokal svap örnekleri alınarak ekimleri yapılmış ve hayvanların AI tip A virüs taşıyıcılığı ya da enfeksiyonu yönünden negatif oldukları saptanmıştır. Hayvanlar 4 yıl süresince mayıs-temmuz ayları arasında açık alanlarda barındırılarak, direkt (embriyolu tavuk yumurtasına ekim) ve indirekt (immunodiffüzyon testi) yöntemlerle AI tip A virüsleri yönünden analiz edilmişlerdir. Ördeklerde enfeksiyonun mevsimsel bir dağılım gösterdiği ve çalışmanın devam ettiği 4 yıl süresince, hastalığın temmuz sonu ile ağustos başlarında daha yoğun olarak görüldüğü belirtilmiştir. Araştırma sonucunda, ördeklerin AI tip A virüslerinin doğal rezervuarları oldukları ve bu hayvanlardaki enfeksiyonun mevsimsel bir dağılım gösterdiği bildirilmiştir (HALVORSON ve ark., 1985).

Özellikle tavuk ve hindiler başta olmak üzere, evcil kanatlı hayvanlar HPAI ve LPAI virüsleri tarafından infekte edilebilmektedir. Evcil kanatlılara etkenin bulaştırılmasında,

primer taşıyıcı olan ördeklerin önemli rolü bulunmaktadır. Memeli hayvanların ise kanatlılar için potansiyel hastalık kaynakları oldukları bildirilmektedir (WOOD ve ark., 1996).

LPAI H9N2 ile HPAI H5N1 alt tiplerinin çeşitli kanatlı hayvanlarda, özellikle 2003 yılından itibaren oluşturdıkları enfeksiyonlar ve izolasyon oranları dikkate alındığında, her iki etkenin yayılma özellikleri ve epidemiyolojilerinin diğerk alt tiplerden farklı bir seyir gösterdiğine dikkat çekilmektedir (CAPUA ve ALEXANDER, 2007). Evcil kanatlılardan sıklıkla izole edilen H9N2 alt tipinin, genetik olarak H5N1 ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (TOLLIS ve DI TIRANI, 2002). Her iki alt tip potansiyel zoonoz ajan olarak kabul edilmekte ve bunların dünyanın birçok bölgesinde endemik olarak bulundukları rapor edilmektedir (CAPUA ve ALEXANDER, 2008). Hong Kong’da 1999 yılında iki insandan ilk kez H9N2 alt tipinin izole edilmesi ve son zamanlarda bu virüsün özellikle Pakistan, İran, Çin, Hindistan ve bazı Asya Ülkeleri’nde geniş çaplı ve önemli kayıplara neden olan enfeksiyonlardan sorumlu tutulması, bu durumu destekler niteliktedir (SAITO ve ark., 2002; ALEXANDER, 2008; GHARAIBEH, 2008; NAGARAJAN ve ark., 2009; PERELMAN, 2009).

H5N1’in göçmen su kuşları tarafından taşınmasıyla ilgili olarak, bu hayvanların bazı türlerinin (*Anas platyrhynchos*, *Anas falcata*, *Anas poecilorhyncha*, *Aythya ferina*, *Passer montanus* ve *Podiceps cristatus* gibi) asemptomatik taşıyıcılık yaptıkları saptanmıştır (FEARE ve YASUE, 2006). Ancak bazen de virüs, önemli klinik bulgularla birlikte ölümlere de neden olabilmektedir. Çin’in batı bölgesinde bulunan ve hayvanların %90’ının öldüğü bir kaz sürüsünde (*Anser indicus*) teşhis amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Ölmeyen hayvanların klinik muayenelerinde, kanatlı AI tip A virüs enfeksiyonu semptomlarına benzer felç, yürümede güçlük, sendeleyerek yürüme ve boynun sağa sola gidip gelmesi gibi bulgular dikkati çekmiştir. Ölen hayvanların 92’sinden kloakal, trakheal ve fekal svap örnekleri alınarak, 28 (%30.4) hayvandan HPAI H5N1 virüsü izole edilmiştir. Çin’de yaşanan bu epizootik salgında, tüm dünyadaki çizgibaşlı kaz popülasyonunun yaklaşık %10 azaldığı saptanmıştır (CHEN ve ark., 2005). Daha sonra yapılan bir çalışmada, bu H5N1 suşunun Çin’den Rusya, Avrupa ve Afrika’ya taşınarak 2005 ve 2006 yıllarında çeşitli salgınlara neden olduğu ve etkenin taşınmasında göçmen su kuşlarının birinci derecede sorumlu olduğu bildirilmiştir (NORMILE, 2006). Genetik olarak bu izolata benzer oldukları saptanan çeşitli H5N1 suşları; Güney Kore, Vietnam, Japonya, Tayland, Kamboçya, Laos, Endonezya, Malezya, Kazakistan, Moğolistan, Romanya, Hırvatistan, Yunanistan, Bulgaristan, Almanya ve Fransa’daki değişik klinik vakalardan izole edilmiştir. Ülkemizde 2006 yılı Ocak ayında, Ağrı-Doğubeyazıt’ta kuş gribinden ölen insanlara ait H5N1 izolatlarının yapılan filogenetik

analizlerinde, bunların da söz konusu suşa oldukça benzer oldukları bildirilmiştir (AKPINAR ve SAATCI, 2006). Günümüzde; HPAI patotipindeki bu H5N1 alt tipinin, Asya'nın güney doğusunda endemik bir seyir gösterdiği ve bu bölgeden orijin alan bir pandemiye neden olabileceğine dikkat çekilmektedir (CHEN ve ark., 2005). Çünkü virüs, yüksek mutasyon yeteneği sayesinde bazı memeli hayvanlar ve insanlara adaptasyon yeteneğini gün geçtikçe artırmaktadır (ŞANLIDAĞ ve ark., 2006).

1997 yılına kadar H5 virüsünün insanlarda infeksiyona neden olarak ölüm oluşturduğuna dair bir kanıt bulunmamaktadır (WEBSTER ve ark., 2006). Bu tarihten itibaren, virüsün konakçılarda infeksiyon oluşturma bakımından tür spesifitesini aşacak şekilde özellikler kazandığı, böylece birçok yeni memeli ve kanatlı türünde infeksiyon oluşturabileceği düşünülmektedir (ALEXANDER, 2007). Virüs, insanlara genellikle infekte kuşlarla direkt temas veya kuşlar tarafından kontamine edilen yüzeylerle indirekt olarak bulaşmaktadır (ROTT, 1992). Hong Kong'da 1997 yılında 3 tavuk çiftliğinde başlayan ve hayvanların %75'inin (yaklaşık 6500 tavuk) ölümüne neden olan H5N1 izolatının insanlara da bulaşarak, 18 insandan 6'sının ölümüne neden olduğu rapor edilmiştir (SHORTRIDGE ve ark., 1998; CHEN ve ark., 2004). Bu durum, AI tip A virüslerinin kanatlı hayvanlardan insanlara bulaşmasının ilk kez laboratuvar bulgularıyla doğrulanmış olması nedeniyle tüm kamuoyu dikkatinin influenza virüs infeksiyonları üzerine çekilmesine neden olmuştur (KOU ve ark., 2005; WU ve YAN, 2006). Vietnam, Tayland ve Kamboçya'da 2003 yılında 130'dan fazla insanda H5N1 alt tipine bağlı infeksiyon teşhisi konulmuş ve bunların yarıdan fazlasının öldüğü rapor edilmiştir (WEBSTER ve ark., 2006). 1959 yılından 2008 yılına kadar Türkiye'deki 4 vaka da dahil olmak üzere dünyada influenza virüs infeksiyonu teşhisi konulan toplam 417 kişiden 179'u (%42.9) hastalıktan ölmüştür. İnsanlardan H5N1 başta olmak üzere H7N2, H7N3, H7N7 ve H9N2 alt tipleri izole edilmektedir (CAPUA ve ALEXANDER, 2008; MORGAN ve ark., 2009).

Son yıllarda AI tip A virüslerinin evcil kanatlı hayvanlardan insanlara direkt olarak bulaştığı tespit edilmiştir (KAYE ve PRINGLE, 2005). Matrosovich ve ark. (1999), influenza A virüslerinin insanlara bulaşması bakımından, piliçlerin ara konakçı olabileceklerine dikkat çekmişlerdir. Promkuntod ve ark. (2006) ise, yumurta ile virüsün taşınma ihtimalinin mutlaka dikkate alınması gerektiğini, yumurtlamadan önce ve sonra yumurtaların AI virüsleri ile kontamine olabileceğini ifade etmişlerdir.

Domuzların kanatlı orijinli AI tip A virüslerinin insanlara bulaşması bakımından ara konakçı olarak rol oynadığı bildirilmektedir (KIDA ve ark., 1994; GUAN ve ark., 1996; LI ve

ark, 2003; JUCKETT, 2006; WEBSTER ve ark., 2006). Yapılan deneysel çalışmalarda domuzların çeşitli alt tiplerle infekte olduğu (SCHOLTISSEK ve ark., 1983; KIDA ve ark., 1994) ve bu hayvanlardan H4N6, H9N2, H1N1 ve H3N2 gibi alt tiplerin izole edildiği ifade edilmiştir. Domuzlardan çok farklı alt tipler izole edildiğinden bu hayvanlara influenza virüsleri bakımından “mixing vessel-karışma kabı” yakıştırması yapılmıştır. Gelecekte insanlarda oluşacak muhtemel salgınlarının, domuzlardan bulaşan AI tip A virüsleriyle olabileceğine dikkat çekilmektedir (TOLLIS ve DI TRANI, 2002).

İnfluenza A virüslerinin henüz insandan insana bulaşmadığı, ancak gelecekte virüsün insanlara adapte olacak şekilde mutasyon geçirerek, insandan insana bulaşabileceğinden endişe edilmektedir (DE LA BARRERA ve REYAS-TERAN, 2005; WEBSTER ve ark., 2006). Oluşan her yeni insan vakasında etken, insandan insana geçiş yeteneğini geliştirme fırsatı bulmaktadır. HPAI H5N1 virüsü, insandan insana bulaşma konusunda diğer alt tiplerden farklı bir durum arz etmektedir. Bu alt tip, diğerlerine göre mutasyona daha meyillidir ve kanatlı orijinli suşlara ait gen parçalarını daha sorunsuz bir şekilde kabul edebilmektedir (ŞANLIDAĞ ve ark., 2006). HPAI patotipindeki Asian H5N1 alt tipinin; epidemiyolojik, ekolojik, kültürel, sosyal ve ekonomik olarak farklı olan 3 kıtadaki insan ve çeşitli hayvanlarda görülmesi, bu görüşü desteklemektedir (CAPUA ve ALEXANDER, 2007).

Deneysel çalışmalarda inkübasyon süresi değişmekle birlikte, duyarlı hayvanlardaki doğal infeksiyonlarda bu süre yaklaşık 2-4 gündür. AI tip A virüsleri tarafından oluşturulan infeksiyonların şiddeti ve semptomlar; etkenin alt tipine, konakçının yaşına, türüne, *Pasteurella* spp, *Mycoplasma* spp, *Escherichia coli* gibi bakteriyel; newcastle, infeksiyöz bronşitis ve avian pneumovirüs gibi viral etkenler tarafından infekte olup olmadığına, bunlara karşı bağışıklık durumuna, immün yetmezlik haline ve çok çeşitli çevresel faktörlere (amonyak fazlalığı, toz, sıcak veya soğuk hava gibi) göre değişmektedir (CAPUA ve MARANGON, 2000; ARDA ve ark., 2002; ALEXANDER, 2008; KIDA, 2008; SONG ve ark., 2009).

HPAI virüsleri duyarlı kanatlılarda birkaç gün içinde %100 ölüm oluşturabilmektedir. Önemli klinik bulgular arasında aşırı gözyaşı ve burun akıntısı, sinüzitis, baş bölgesi ve yüzde ödem, yumurtanın iç ve dış kalitesinin bozulması ve yumurtlamanın tamamen durması sayılabilir. Bunlara ilaveten özellikle baş bölgesi ve vücudun diğer bölgelerinde siyanöz ile birlikte deride ödem, sinuslar ve periorbital dokularda şişlik, burun ve gözyaşı akıntısı, gözlerin tamamen kapanması, şiddetli solunum sistemi semptomları, ishal ve nadiren sinirsel

belirtiler görülmektedir. İnfeksiyonun başlangıcından birkaç gün sonra ortaya çıkan glottis ödemi, asfeksiye bağlı ölüm oluşturmaktadır. Akut dönemi atlatan hayvanlarda dönme, ataksi, yürümede güçlük ve ayakta duramama gibi sinirsel bulgular dikkati çekmektedir (ARDA ve ark., 2002; TOLLIS ve DI TIRANI, 2002; ALEXANDER, 2008).

Özellikle tavuk ve hindiler başta olmak üzere evcil kanatlılardan izole edilen AI tip A virüslerinin çoğunluğu LPAI virüs karakterindedir. Bu virüsler orta düzeyde solunum sistemi enfeksiyonu, depresyon ve yumurta veriminde kayıplara neden olmaktadır. LPAI virüslerinin neden olduğu enfeksiyonlarda; hayvanların bir araya toplanması, öksürük, tıksırık, burun akıntısı, ateş, iştahsızlık ve infraorbital sinüslerde şişkinlik önemli klinik bulgular arasındadır (WOOD ve ark., 1996; CAPUA ve ALEXANDER, 2007; ALEXANDER, 2008; KIDA, 2008). LPAI virüs enfeksiyonlarına ait klinik bulgular deneysel enfeksiyonlarda ve 1999-2000 yıllarında İtalya'da LPAI H7N1 alt tipinin neden olduğu epidemilerde ayrıntılı bir şekilde gözlemlenmiştir. İtalya'daki salgında ilk olarak etçi hindiler hastalanmıştır. Klinik bulgular solunum sistemine lokalize olup, özellikle genç hayvanlar başta olmak üzere hindi sürülerinde %5-97 ölüm görülmüştür. Anaç hindilerde hastalık orta şiddette bir seyir göstermiş ve ölüm %5-20 düzeyinde gerçekleşmiştir. İnfeksiyon broilerler ve broiler damızlıklarda subklinik ve asemptomatik seyretmiş ve ölüm oranı %2-3'ü geçmemiştir (LAUDERT ve ark., 1993; CAPUA ve ark., 2000a). LPAI H9N2 alt tipi ile broiler tavuklarda yapılan deneysel bir çalışmada, ölüm oranının doğal enfeksiyonlardan çok daha az olduğuna dikkat çekilmiştir (NILI ve ASASI, 2002).

İnfluenza A virüslerinin yabani su kuşlarında önemli bir klinik bulgu oluşturmada adapte oldukları ve bundan dolayı bu hayvanların virüslerin doğal konakçıları oldukları bildirilmektedir (SHARP ve ark., 1993). Etkenler; doğal konakçıları olan kanatlı hayvanların sindirim sistemine affinite göstermektedir. Herhangi bir enfeksiyon durumunda ise sindirim sisteminden ayrılarak özellikle solunum sistemi başta olmak üzere, diğer sistemlere de yerleşerek hastalık oluşturmaktadır. İnfeksiyon başladıktan kısa bir süre sonra etken dışkı ile yoğun olarak atılmaya başlamaktadır. Virüs, iki kanatlı hayvan arasında daha çok direkt temas veya dışkı ile kontamine olmuş su aracılığı ile indirekt olarak bulaşmaktadır (WEBSTER ve ark., 1992).

Genellikle göçmen su kuşları AI tip A virüslerini belirgin bir semptom oluşturmada taşımakla birlikte, özellikle ördek ailesinde nadiren de olsa belirgin klinik semptomlarla birlikte enfeksiyonlar da görülmektedir (STURM-RAMIREZ ve ark., 2005; KIDA, 2008). Çin'de 2005 yılında toplam 3000 adet hayvandan oluşan yabani çizgili başlı kaz

populasyonunda, HPAI patotipindeki H5N1 alt tipinin neden olduğu salgında, hayvanların %90'ının öldüğü ve klinik bulgu olarak başın sağa-sola sallanması, titreme, sallantılı yürüyüş ve felçler görüldüğü bildirilmiştir (CHEN ve ark., 2005).

Kanatlı hayvanlardaki AI tip A virüs infeksiyonlarında dikkati çeken en önemli nekropsi bulguları arasında, ölüm sertliğinin çabuk şekillenmesi ve deri altında açık sarı renkte berrak bir sıvının bulunması sayılabilir (ARDA ve ark., 2002). Karkas şiddetli sepsisemiye bağlı olarak kırmızı renktedir. Deri, derialtı, kalp, karaciğer, akciğer, böbrek ve dalak gibi çeşitli iç organlarda hemorajik bölgeler dikkati çekmektedir. HPAI patotipindeki H5N1 alt tipi ile doğal infekte kaz, ördek, kuğu, flamingo, balıkçıl ve karabaş martı gibi yabani su kuşlarına ait materyallerin makroskopik incelenmesinde; hayvanların bir kısmının akciğerlerinde ödem, hava keselerinin duvarında kalınlaşma, dalak, karaciğer ve böbreklerde büyüme, iç organlarda ve akciğerde kanama ve asites belirlenmiştir. Ancak, perakut seyreden ve HPAI patotipindeki alt tiplerin neden olduğu infeksiyonlarda bu bulgular görülmeyebilir (SWAYNE ve ark., 1994; ARDA ve ark., 2002; KISHIDA ve ark., 2005; KWON ve ark., 2005; NAGY ve ark., 2007).

HPAI ve LPAI virüsleri, infekte ettikleri hayvanlarda farklı dokulara tropizm göstermeleri nedeniyle değişik lezyonlar oluşturmaktadır. HPAI grubundaki etkenler deri, beyin, adrenal bezler, pankreas, kalp ve diğer iç organlarda yangı, hemoraji ve nekroz ile karakterize lezyonlara neden olmaktadır. LPAI virüsleri ise hafif veya orta derecede solunum, ürogenital ve enterik infeksiyonlar oluşturmakla birlikte, sekonder infeksiyonlar bu tablonun ağırlaşmasına neden olabilmektedir (MO ve ark., 1997).

HPAI virüsleri, infekte bir hayvandan duyarlı bir hayvana, LPAI virüslerine göre daha az bulaşmaktadır. Bu durum, HPAI tip A virüsleriyle infekte olan hayvanların çok kısa sürede ölmeleri ve etkeni uzun süre etrafa bulaştıramamalarıyla açıklanmıştır (MO ve ark., 1997).

Hong Kong'da 1997 yılında 3 kümeste ortaya çıkan ve bu kümeslerdeki hayvanların %75'i ile insanlara da bulaşarak 6 kişinin ölümüne neden olan HPAI H5N1 virüsü ile farelerde yapılan deneysel çalışmada, etkenin nörotropik bir seyir gösterdiği bildirilmiştir (TANAKA ve ark., 2003). Kuzey Kore'deki ticari ördek işletmelerinde ölümle sonuçlanan infeksiyonlara neden olan ve HPAI H5N1 olarak identifiye edilen izolatla, etkenin patojenitesini belirlemek amacıyla deneysel bir çalışma yapılmıştır. Etken, SPF özellikteki 6 haftalık tavuklara damar içi verilmiş ve tüm hayvanların 24 saatte ölümüne neden olmuştur (KWON ve ark., 2005). Doğal infekte hayvanlara ait doku ve organların immunoperoksidaz

yöntemiyle incelenmesinde etkenin daha çok akciğer, beyin, kalp, pankreas, periferik sinir ve böbrek kesitlerinde görüldüğü bildirilmiştir (ELLIS ve ark., 2004; KWON ve ark., 2005).

Yapılan deneysel çalışmalar, influenza A virüslerinin canlılıklarının sıcaklık, pH ve ortamın tuz oranıyla direkt ilişkili olduğunu göstermiştir (STALLKNECHT ve ark., 1990; DE BENEDICTIS ve ark., 2007). Bu nedenle gerek AI virüs enfeksiyonlarının laboratuvar teşhisi, gerekse değişik klinik materyallerdeki virüslerin ortaya konulması bakımından transport mediumların bileşimi, pH'sı, tuz oranı ve ortamın ısısı oldukça önem arz etmektedir. Konuyla ilgili çalışmalar incelendiğinde farklı transport mediumların kullanıldığı görülmektedir. Transport mediumlarda çözücü solüsyon olarak; Hank balanslı tuzlu su solüsyonu, hücre kültürü besiyeri, fosfat tamponlu tuzlu su, triptoz fosfat besiyeri ve beyin kalp infüzyon sıvı besiyeri gibi oldukça farklı vasatlar kullanılmaktadır. Transport mediumlara geniş spektrumlu antibiyotik ve antimikotik ajanların katılması tavsiye edilmektedir. Materyal alımında ahşap veya polyester eküvyonlar tercih edilmektedir (MUNSTER ve ark., 2005; ŞANLIDAĞ ve ark., 2006). Bunların bir kısmı ticari (MUNSTER ve ark., 2005; RUNSTADLER ve ark., 2007), çoğunluğu ise manual olarak hazırlanmaktadır (DE MARCO ve ark., 2004; WIDJAJE ve ark., 2004; GAIDET ve ark., 2007).

Yazılı kaynaklar incelendiğinde, AI tip A virüsleriyle ilgili gerek epidemiyolojik, gerekse teşhise yönelik çalışmaların çoğunda materyal olarak dışkı ya da kloakal svap örneklerinin kullanıldığı görülmektedir (CHEN ve ark., 2005; MUNSTER ve ark., 2005; GAIDET ve ark., 2007; RUNSTADLER ve ark., 2007). Dışkıda bulunan influenza A virüslerinin canlı kalabilme süreleri virüsün tipine, dışkının fiziksel durumuna ve ortamın ısısına göre değişmektedir. Canlı hayvanlardan materyal olarak üst solunum yollarına ait nazal ve trakheal örnekler kullanılmaktadır. Ölü hayvanlardan ise bu materyallerle birlikte akciğer, karaciğer, kalp, dalak, böbrek ve beyin incelenebilmektedir. Diğer yandan, çevresel örnekler de izolasyon amacıyla kullanılmaktadır. Kısa süre içinde analiz edilmeyecek materyallerin -70°C veya daha düşük ısı derecelerinde saklanmaları tavsiye edilmektedir (ŞANLIDAĞ ve ark., 2006). Pensilvanya'da 1983-1985 yılları arasında görülen ve H5N2 alt tipinin neden olduğu salgında, hindilere ait dışkı örnekleri 4°C'de bekletildiğinde 35 gün, 25°C'de bekletildiğinde 2 gün etkenin infektivitesini koruduğu, nemli ortamlar ve düşük ısı derecesindeki dışkıda 105 gün canlı kaldığı bildirilmiştir. Bir gram dışkı örneğinde 10⁷ adet infektif virüs partikülünün olması halinde etkenin 45 günden daha uzun bir süre canlılığını koruduğu belirtilmiştir. Virüsün direkt güneş ışığına maruz bırakılan dışkı örneklerinde 32-35°C'de 30 dk, 25-32°C'de ise 4 günde inaktive olduğu ifade edilmiştir. Ortam ısısının 4 ile

37°C arasındayken bazı AI tip A virüslerinin suda 200 günden daha fazla canlı kaldıkları rapor edilmiştir (STALLKNECHT ve ark. 1990; DE BENEDICTIS ve ark., 2007).

AI tip A virüsleriyle ilgili yapılan izolasyon çalışmalarının çoğu, etkenin yayılmasında göçmen kuşların rollerini belirlemek amacıyla yapılmıştır (DOUGLAS ve ark., 2006; WEBSTER ve ark., 2006). Kuzey Denizindeki Helgoland Adasında serçe ailesine ait 4 tür göçmen kuştan sağlanan materyaller, H5 ve H7 alt tipleriyle avian paramyxovirus serotip 1 yönünden izolasyon yöntemiyle araştırılmıştır. Toplam 543 kuştan alınan (131 adet *Fringilla coelebs*, 169 adet *Turdus philmelos*, 142 adet *Sylvia borin* ve 101 adet *Phoenicurus phoenicurus*) konjunktival ve kloakal svap örnekleri materyal olarak kullanılmıştır. İzolasyon amacıyla materyaller, SPF özellikteki embriyolu tavuk yumurtasına ekilmiştir. Çalışma sonucunda materyallerin hiç birinden AI tip A virüsü izole edilmediği bildirilmiştir (SCHNEBEL ve ark., 2005). Başka bir çalışmada ise 168 farklı göçmen kuş türünden sağlanan kloakal svaplar izolasyon materyali olarak kullanılmıştır. Materyaller 9-11 günlük embriyolu tavuk yumurtalarına ekilerek, toplanan allantoik sıvılar öncelikle hemagglütinasyon (HA) testiyle incelenmiş, pozitif bulunanlar ise RT-PCR ile viral RNA yönünden analiz edilmiştir. Çalışmada 2 hayvan AI tip A ve 1 hayvan da newcastle virüsü yönünden pozitif bulunmuştur. İncelen toplam 168 göçmen kanatlı hayvan türünden sadece *Anatidae* familyasından bir ördek türünde AI tip A virüsü saptanmıştır. Sonuç olarak, AI tip A virüslerinin taşınmasında ördeklerin diğer göçmen kuşlardan daha önemli rol oynadığı bildirilmiştir (DOUGLAS ve ark., 2006).

AI tip A virüs enfeksiyonu olan hayvanlardan sekonder etken olarak farklı bakteri ve virüsler izole edilmektedir. Bakteriyel etkenler arasında daha çok *Escherichia coli*, *Riemerella antipestifer*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Pasteurella multocida*, *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, viral etkenler arasında ise newcastle virüsü, infeksiyöz bronşitis virüsü ve avian pneumovirüs sayılabilir (LAUDERT ve ark., 1993; CAPUA ve ark., 2000b; NILI ve ASASI, 2002; HANSON ve ark., 2005; GRONESOVA ve ark., 2008).

Gerek Avrupa Birliği Yönetmeliği gerekse OIE, AI tip A virüs enfeksiyonlarının teşhisinde öncelikli olarak konvansiyonel virolojik yöntemleri önermekte ve bunları “gold-standart” olarak kabul etmektedir. Konvansiyonel yöntemlerin dezavantajları arasında pahalı olmaları, laboratuvar çalışmaları sırasında daha çok önlem almayı gerektirmeleri, özellikle bir salgın esnasında kısa sürede teşhise imkan vermemeleri sayılabilir (PLAYFORD ve DWYER, 2002; ALEXANDER, 2008).

İtalya'nın batısındaki sahillerde serbest yaşayan su kuşlarına ait materyallerde AI tip A virüslerinin varlığını ve yaygınlığını belirlemeye yönelik yapılan bir çalışmada, 469'u ördeklerden ve 333'ü su tavuklarından olmak üzere toplam 802 adet kloakal svab, klasik virüs izolasyon yöntemiyle incelenmiştir. Ördeklerin 18'inden (%3.8), su tavuklarının ise 4'ünden (%1.2) spesifik virüs izole edilmiştir. Materyaller toplam olarak değerlendirildiğinde, 802 kloakal svab örneğinin 22'sinden (%2.7) AI tip A virüsü izole edilmiştir. İzolatlardan 1'i sunadan (H1N1), 4'ü sakarmekeden (1 izolat H1N1, 1 izolat H3N8, 2 izolat H10N8), 17'si ise yeşilbaş ördeklerden (1'i H5N2, 16'sı H1N1) elde edilmiştir (DE MARCO ve ark., 2003).

Son zamanlarda çeşitli klinik materyallerde direkt virüs RNA'sını belirlemeye yönelik birçok metot geliştirilmiştir. AI tip A virüslerinin kısa sürede ve doğru bir şekilde teşhis edilmesi, gerekli önlemlerin bir an önce alınarak insanlar için tedaviye başlanması, sanitasyon aşamasına geçilmesi ve belki de en önemlisi enfeksiyonun yayılmasına fırsat vermeden kontrol altına alınması bakımından, bu metotların geliştirilmiş olması son derece önemlidir (PLAYFORD ve DWYER, 2002; HINDIYEH ve ark., 2005; MORGAN ve ark., 2009).

Farklı PCR (one-step, two step, nested ve multiplex-PCR gibi), ekstraksiyon (fenol kloroform ve farklı ticari kitlerle yapılan ekstraksiyon yöntemleri gibi) ve görüntüleme (agaroz jel elektroforezis ve prob hibridizasyon gibi) yöntemleri uygulanarak yapılan çalışmalarda, AI tip A virüslerinin M, H, NP ve NS bölgelerine spesifik farklı primerler kullanılmaktadır (WRIGHT ve ark., 1995; ELLIS ve ark., 1997; PLAYFORD ve DWYER, 2002; WIDJAJE ve ark., 2004). Tercih edilen primerlere göre etkenler, tip ya da alt tip düzeyinde tanımlanabilmektedir (PLAYFORD ve DWYER, 2002). Son yıllarda birçok laboratuvar reverse transcriptase-polymerase chain reaction (PCR) ve real-time PCR (RT-PCR) ve real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RRT-PCR) metotlarını daha çok tercih etmektedir. Doğru primerler kullanıldığında, real-time esasına dayanan metotlarla çeşitli klinik materyallerde direkt olarak genomik RNA kısa sürede ortaya konulabilmekte, alt tiplerin ayrımları yapılabilmekte ve elde edilen c-DNA örnekleri sekans analizinde kullanılabilmektedir (STARICK ve ark., 2000; MUNCH ve ark., 2001; ALEXANDER, 2008). Teşhis amacıyla kullanılan RT-PCR yönteminin ise AI tip A virüslerinin genomik materyalinin saptaması bakımından duyarlı ve spesifik bir metot olduğu bildirilmektedir (STARICK ve ark., 2000; SPACKMAN ve ark., 2002; SPACKMAN ve ark., 2006; RUNSTADLER ve ark., 2007). Ayrıca, virüs izolasyonunun bölgesel referans laboratuvarlarda yapılma zorunluluğu bulunmaktadır. Klinik materyallerin durumuna da bağlı olarak RT-PCR yönteminin sensitivitesinin "gold-standart" olarak kabul edilen klasik virüs

izolasyon yöntemlerinden daha yüksek olduğu ifade edilmektedir (WRIGHT ve ark., 1995; PLAYFORD ve DWYER, 2002; ELLIS ve ark., 2004). Diğer yandan materyallerin kalitesi, transport mediumun niteliği ve taşıma şartları gibi durumlar RT-PCR için kültür yöntemine göre daha az önem arz etmektedir. Değişik klinik materyallerde bulunan influenza A virüsleri, RT-PCR ile kültür yöntemine göre daha uzun süre bekletilmiş materyallerde pozitif sonuç vermektedir. Bu durum, viral RNA'nın kültüre edilebilen virüs partiküllerinden daha dayanıklı olması ile açıklanmıştır (CHERIAN ve ark., 1994). RRT-PCR yönteminin sensitivitesinin, H5N1 alt tipine ait virüs RNA'sını belirlemeye yönelik diğer ticari hızlı teşhis yöntemlerinden daha yüksek olduğu ve yaklaşık 4 saatte sonuç alındığı bildirilmektedir (JUCKETT, 2006).

Spackman ve ark. (2002), real-time single step RT-PCR yönteminde primer/fluorogenic hydrolysis propları kullanarak, H5 ve H7 dahil diğer AI tip A virüs alt tiplerinin identifikasyonlarını yapmışlardır. Araştırmacılar, geliştirdikleri yöntemin klasik izolasyon yöntemlerinden daha ucuz ve daha kısa sürede sonuç veren alternatif bir metot olduğunu bildirmişlerdir. Viral RNA'nın saptanmasına yönelik olarak doğru uygulanan RT-PCR yöntemi, materyallerdeki inhibitör maddelerin nitelik ve miktarlarına göre farklı şekillerde modifiye edilebilmektedir.

Alaska'da yaşayan ördeklerde AI tip A virüslerinin prevalansını kültür ve RT-PCR yöntemleriyle karşılaştırmalı olarak belirlemeyi amaçlayan bir çalışma yapılmıştır. Materyal olarak 500 ördekten alınan kloakal svaplar kullanılmıştır. RT-PCR ile analizde matriks gen bölgesi amplifiye edilmiştir. İzolasyonda kullanılacak svaplar antibiyotikli viral transport mediumla taşınmıştır. Embriyolu tavuk yumurtasında yapılan izolasyonda 8'i yeşilbaş ördeklerden ve 34'ü ise kıkıyruktan olmak üzere toplam 42 (%8.4) hayvandan AI tip A virüsü izole edilmiştir. RT-PCR ile 74 hayvanda (%14.8) pozitiflik saptanmıştır. Bu hayvanlardan 1'inin (%1) Amerikan çamurcunu, 19'unun (%26.4) yeşilbaş ördek ve 54'ünün (%12.9) kıkıyruk olduğu ifade edilmiştir. İzole edilen suşların tiplendirmeleri hemagglütinasyon inhibisyon (HI) ve neuraminidaz inhibisyon (NI) testleriyle yapılmıştır. Toplam 42 izolattan 38'i (%90.5) tiplendirilirken, 4'ü (%9.5) tiplendirilememiştir. Tiplendirilen izolatların 3'ü H3N6, 7'si H8N4, 9'u H12N5, 11'i H4N6 ve 12'si H3N8 olarak identifiye edilmiştir (RUNSTADLER ve ark., 2007).

Nagy ve ark. (2007), Çek Cumhuriyeti'nde AI tip A virüslerinin prevalansını belirlemek amacıyla; kuğu, karabatak, yeşilbaş ördek, suna, çamurcun ve güvercin gibi hayvanların da içinde bulunduğu 61 farklı kanatlı türüne ait toplam 2101 hayvandan aldıkları

materyallerle (beyin, karaciğer, akciğer, böbrek ve kloakal örnek) epidemiyolojik bir çalışma yapmışlardır. Araştırmacılar, sadece 282 kuğunun 12'sinde (%4.3) RT-PCR ile pozitiflik saptadıklarını bildirmişlerdir. RT-PCR, HI ve NI testleriyle yaptıkları tiplendirmede izolatların tamamının HPAI H5N1 virüsü olduğunu ifade etmişlerdir. Afrika Kıtası'nda bulunan 14 farklı ülkedeki (Nijerya, Çad, Mali, Malawi, Moritanya, Senegal, Kenya, Mozambik, Tunus, Fas, Sudan ve Mısır) kıkıyruk, karabatak ve döğüşken kuşun da içinde bulunduğu 87 farklı su kuşu türünden toplanan 4553 adet kloakal svap örneği RT-PCR ile analiz edilmiştir. Materyaller öncelikle AI tip A virüsleri yönünden RT-PCR ile incelenmiş ve pozitif bulunan örnekler, aynı metotla H5 alt tipi yönünden tekrar test edilmiştir. RT-PCR ile pozitif bulunan materyaller; 9-10 günlük embriyolu tavuk yumurtasında üretilip, allantoik sıvıları toplanarak, alt tiplerin belirlenmesi amacıyla HI ve NI testleriyle incelenmişlerdir. Hayvanlar toplam olarak değerlendirildiğinde, 20 farklı türün, 159'unda (%3.5) pozitiflik saptanmıştır. En yüksek pozitiflik %12.5 ile çamurcunda belirlenmiştir. Kıkıyrukta %8.3, döğüşken kuşta %1.7 pozitiflik saptanırken, karabatakta ise pozitiflik tespit edilememiştir. İzolatların tamamının LPAI patotipinden H1N1, H5N3, H8N4, H11N9 ve H12N5 alt tipler oldukları ortaya konulmuştur (GAIDET ve ark., 2007).

İsveç'te 2006 yılı içinde farklı kanatlı türlerinden toplanan materyallerde AI tip A virüslerinin prevalansının saptanması ve izole edilen suşlarla, influenza A virüs koleksiyonunda bulunan suşların genetik bakımından karşılaştırmalarının amaçlandığı bir çalışma yapılmıştır. Çalışma; 23'ü yeni izole edilen, toplam 75 izolatla gerçekleştirilmiştir. Bu 23 izolat, aralarında yeşilbaş ördek ve gümüş martının da olduğu 503 adet kanatlı hayvanın oro-farengeal svaplarından izole edilmiştir. Svaplar öncelikle M2 proteini yönünden RT-PCR ile analiz edilmiştir. Pozitif bulunan materyaller ise H5 spesifik primerler kullanılarak, tekrar RT-PCR ile incelenmiştir. H5 alt tipinden oldukları belirlenen izolatlar, non-structural (NS) gen bölgesi kullanılarak sekans analizine alınmıştır. Bu metotla, 75 izolattan 64'ünün (%85.3) HPAI patotipinde H5N1 alt tipinden oldukları bildirilmiştir (ZOHARI ve ark., 2008).

AI virüs infeksiyonlarıyla ilgili olarak hızlı test kitleri, daha çok insanlara yönelik olarak geliştirilmiştir. Bu ticari kitler tüm influenza virüs antijenlerini saptayabilmekle birlikte, rutin teşhiste daha çok H5 ve H7 alt tipi için kullanılmaktadır (YUEN ve ark., 1998; XU ve ark., 2004). Bu kitler son yıllarda giderek artan bir oranda çeşitli kanatlı türlerinde de kullanılmaya başlamıştır (BOOTH ve ark., 2006). Günümüzde özellikle ABD'de kanatlı hayvanlardaki AI tip A virüslerinin saptanmasına yönelik olarak en çok ticari Directigen Flu

A kiti kullanılmaktadır (SLEMONS ve BRUGH, 1998). Kit, nükleoproteine spesifik monoklonal antikorlar içerdiğinden, influenza A virüslerini saptayabilmektedir. Bu kit, memelilerdeki infeksiyonları belirlemeye yönelik olarak geliştirilmesine ve bazı türlerde sensitivitesinin farklılık göstermesine rağmen, kümes hayvanları dahil bir çok farklı kanatlı hayvan türünde tercih edilmektedir. Bu ve diğer antijen saptamaya yönelik kitlerin en önemli avantajları, AI tip A virüslerini yaklaşık 10-15 dakika içinde ortaya koyabilmeleridir. En önemli dezavantajları ise, virüsleri alt tip düzeyinde tanımlayamamaları, pahalı olmaları ve sensitiviteilerinin bireysel değerlendirmelerde düşük olmasıdır (HORNSLETH ve JANKOWSKI, 1990; ALEXANDER, 2008). Nagy ve ark. (2007), doğal infekte kanatlı hayvanlardan izole ettikleri ve HPAI patotipinde H5N1 olarak tanımladıkları 12 izolata ait allantoik sıvıların hiçbirinin, hızlı test kiti (Anigen rapid avian influenza virus antigen test, Anigen, South Korea) ile pozitif sonuç vermediğini bildirmişlerdir.

Çeşitli klinik materyallerde, viral antijenlerin hızlı tanısı amacıyla immunofloresans esasına dayanan testler de kullanılmaktadır. Bu yöntemler sensitiviteilerinin düşük olmasının yanı sıra, influenza tip A ve tip B virüslerini de ayıramamaktadır (YUEN ve ark., 1998; PLAYFORD ve DWYER, 2002; ŞANLIDAĞ ve ark., 2006; ALEXANDER, 2008; HE ve ark., 2009).

AI tip A virüslerinin indirekt teşhisi ve tanımlanmasında çeşitli serolojik testlerden yararlanılmaktadır. Bu amaçla daha çok hemagglütinasyon (HA), hemagglütinasyon inhibisyon (HI), neuraminidaz inhibisyon (NI), agar jel presipitasyon (AGP), virüs nötralizasyon (VN), çeşitli ELISA yöntemleri ve floresans antikor (FA) testi kullanılmaktadır. Tüm influenza virüsleri, benzer matriks ve nükleokapsid antijenlerine sahip olduklarından, AGP ve FA testlerinin de aralarında bulunduğu çeşitli testlerle bu antijenlere karşı sentezlenen antikorlar saptanabilmektedir (DAISY ve ark., 1979; CHERIAN ve ark. 1994; CHEN ve ark., 2008). İzolatların tiplendirilmesinde en çok HI testi kullanılmaktadır. Tavuk, koyun ve ferret (dağ gelinciği) gibi hayvanlarda hazırlanan spesifik anti-serumlar kullanılarak yapılan HI testinin referans tiplendirme metodu olduğu kabul edilmektedir (PLAYFORD ve DWYER, 2002).

Klinik materyallerden izole edilen AI tip A virüslerinin alt tiplerinin belirlenmesi, hastalıkla mücadele ve epidemiyolojik açıdan oldukça önem arz etmektedir. Suşların tiplendirmeleri daha çok serolojik yöntemlerle yapılmasına rağmen, son yıllarda formüle edilen alt tip spesifik primerler kullanılarak uygulanan PCR yöntemleriyle de alt tipler ortaya konulabilmektedir (MUNCH ve ark., 2001; ALEXANDER, 2008). Örneğin; kuğu orijinli 12 adet AI tip A virüsünün, bu izolata özgü primerler kullanılarak RT-PCR ve alt tiplere spesifik

serumlar kullanılarak yapılan HI testiyle analizlerinde, izolatların tamamının H5N1 alt tipinden oldukları belirlenmiştir. Aynı izolatların HA0 gen bölgelerinin sekans analizlerinde ise tamamının HPAI oldukları saptanmıştır (NAGY ve ark., 2007). Gaidet ve ark. (2007), 20 adet AI tip A virüs izolatını HI ve NI testleriyle inceleyerek H1N1, H5N3, H8N4, H11N9 ve H12N5 alt tipinde olduklarını saptamışlardır.

Diğer yandan amplifiye edilen H ve N gen bölgelerinin sekans analizleriyle izolatların akrabalık dereceleri ve geçirdikleri mutasyonlar hakkında bilgiler elde edilebilmektedir (DUGAN ve ark., 2008). Doğal konakçılardan izole edilen AI tip A virüslerinin moleküler tekniklerle yapılan çalışmalarda, Avrasya (Eurasian lineage) ve Amerika (American lineage) olarak 2 gen grubuna ayrıldıkları saptanmıştır (OLSEN ve ark., 2006; ZOHARI ve ark., 2008). Halbuki influenza virüsleri, doğal konakçılarındaki fazla mutasyon geçirmemektedir. Bu durum; konakçıların göçlerle başka bölgelere gitmek zorunda olmalarıyla açıklanmıştır (OLSEN ve ark., 2006).

Kanatlı hayvanlardaki AI tip A virüs enfeksiyonlarının kemoterapötik maddelerle tedavileri önerilmemektedir (ARDA ve ark., 2002). Tedavi insanlarda uygulanmaktadır. Bu amaçla daha çok neuraminidaz inhibitörü olarak fonksiyon yapan oseltamivir (Tamiflu) ve zanamivir (Relenza) kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçların, hastalığın ilk 48 saati içinde kullanılması tavsiye edilmektedir. Oseltamivir günde 2 kez, 75 mg dozunda tedavi amacıyla veya aynı dozda 7-10 gün profilaksi amacıyla kullanılmaktadır (PLAYFORD ve DWYER, 2002; JUCKETT, 2006; MORGAN ve ark., 2009).

AI tip A virüs enfeksiyonlardan korunmada, virüsle direkt veya indirekt temasın önlenmesi, bir salgını takiben eğer mümkünse sürünün ortadan kaldırılmasıyla eradikasyona gidilmesi önem arz etmektedir (ARDA ve ark., 2002). Bununla birlikte, hastalık çıkan bölgelerde etkeni almamış hayvanlar da dahil olmak üzere tüm kanatlıların toplu olarak imha edilmesi, son zamanlarda etik olarak sorgulanmaya başlamış ve halihazırda uygulanan kontrol programlarının düzenlenmesini gerekli kılmıştır. Bu duruma örnek olarak, 1997 yılında Hong Kong'da yaşanan ve 6 kişinin ölümüne de neden olan HPAI patotipindeki H5N1 salgınından sonra, Hong Kong'daki tüm evcil kanatlıların imha edilmesi gösterilebilir (WEBSTER ve ark., 2006). Bu noktadan hareketle, AI tip A virüslerinin evcil kanatlı hayvanların yaşam alanlarına gerekli biyogüvenlik önlemleri alınarak hiç bulaştırılmamasının, en önemli koruma yöntemi olduğu bildirilmektedir (THOMAS ve ark., 2005; DE BENEDICTIS ve ark., 2007). Hastalık çıkan bir bölgede genel idari ve lokal hijyenik önlemlerin birlikte uygulanması gerekmektedir. Etken giyeceklere, yumurta viyollerine, araç-gereçlere ve nakil araçlarına

bulaşabilmektedir. Bu nedenle, hastalık çıkan küçük bir aile işletmesinde veya büyük bir entegrede ortamın ve her türlü eşyanın kontamine olduğu düşünülmelidir. Bu durumda işletmedeki tüm yüzeyler ve önemli eşyalar iyice temizlenip, sonra etkili kimyasallarla dezenfekte edilmelidir. Bazı malzemeler ise temizlenip, dezenfektanlarla muamele edildikten sonra işletmeden uzaklaştırılarak imha edilmelidir. Ölü, infekte ve taşıyıcı hayvanlar ile o bölgede bulunan tüm kanatlılar CO ve CO₂ gazı ile ötanize edilmelidir (ARDA ve ark., 2002; VAN DEN BERG ve HOUDART, 2008). CO ve CO₂ gazları Belçika’da 2003 yılında, HPAI patotipindeki H7N7 alt tipinin neden olduğu epidemide kullanılmıştır (VAN DEN BERG ve HOUDART, 2008). Dezenfeksiyon amacıyla formalin ve iyot bileşikler başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (ŞANLIDAĞ ve ark., 2006).

AI virüs infeksiyonlarına karşı korunmada, en ekonomik yolun aşılama olduğu bildirilmektedir (FASINA ve ark., 2007). Korunma, hem humoral hem de hücrel bağışıklık mekanizmalarının birlikte çalışmasıyla sağlanmaktadır. Etkenin H, N, M2, M1 ve NP proteinlerine karşı nötralizan antikorlar oluşmakla birlikte, korunmada esas rolü H ve N moleküllerine spesifik antikorlar üstlenmektedir. Korunmada en etkili yolun inaktif aşılarla aşılama olduğunu ve özellikle HPAI patotipindeki virüs infeksiyonlarına karşı etkili bir aşı geliştirmenin öncelik arz ettiği bildirilmektedir (HAMPSON, 2006; SZÉCSI ve ark., 2006). Diğer yandan hastalığı geçiren hayvanlar uzun bir süre bağışık kalmakta ve aynı virüs alt tipi ile re-infeksiyona karşı dirençli olmaktadır (ARDA ve ark., 2002).

AI tip A virüslerine karşı gelişen humoral immün yanıtın gücü hayvanın türüne bağlı olarak değişmekle birlikte, tavukların diğer evcil kanatlı türlerinden daha güçlü bir immün yanıt oluşturdıkları bildirilmektedir (BRUGH ve ark., 1979; TOLLIS ve DI TRANI, 2002). Yapılan deneysel çalışmalarda, alt tipler arasındaki çapraz korumadan daha çok, her alt tipin homoloğu olan izolata karşı epruvasyonda koruyucu düzeyde bir bağışıklığın geliştiği (STONE, 1987; BARUN ve ark., 1988; TOLLIS ve DI TRANI, 2002), diğer alt tiplere karşı ise koruyuculuğu olmayan humoral bir yanıtın oluştuğu bildirilmiştir (KIDA ve ark., 1980). Bu durum, aşı geliştirme çalışmalarında dikkate alınması gereken ciddi bir ayrıntı olarak günümüzde de önemini korumaktadır (TOLLIS ve DI TRANI, 2002).

İnfluenza A virüslerine karşı gelişen hücrel bağışıklıkla ilgili yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Farelerde yapılan deneysel çalışmalarda hem H hem de N moleküllerinin hücrel immün yanıtı uyardıkları bildirilmiştir. Efektör hücre olarak sitotoksik T lenfositlerinin görev aldığı hücrel korunmada, LPAI virüslerinin yayılmalarının başarılı bir şekilde engellendiği bildirilmekle birlikte, aynı durumun HPAI virüsleri için geçerli

olmadığına dikkat çekilmiştir (TOLLIS ve DI TRANI, 2002). Soe ve Webster (2001), humoral bağışıklıktan farklı olarak, alt tipler arasında hücresel bağışıklık mekanizmasıyla gerçekleşen bir çapraz korumanın olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, H9N2 alt tipiyle tavuklarda yaptıkları deneysel çalışmada, eprüvasyondan sonra hayvanlarda H5N1 alt tipinin oluşturduğu klinik semptomlara benzer semptomların oluşmadığı, ancak hayvanların dışkılarıyla virüs saçmaya devam ettiklerini bildirmişlerdir.

AI tip A virüs infeksiyonlarından korunmada en etkili yolun aşılama olduğu bildirilmekle birlikte (SZÉCSI ve ark., 2006), aşı ile korumanın en önemli dezavantajları arasında, alt tipler arasında yeterli düzeyde çapraz korumanın olmaması ve hastalığın indirekt tanısı bakımından doğal infekte ve aşıllı hayvanların ayırımlarının yapılamaması sayılabilir (TOLLIS ve DI TRANI, 2002; CAPUA ve ALEXANDER 2004; CAPUA ve ALEXANDER, 2007; PERELMAN, 2009). Aşılamanın gerekli olmadığını düşünen bazı araştırmacılar farklı gerekçeler ileri sürmektedir. Örneğin; HPAI patotipindeki bir alt tipe karşı aşılanan tavuklara canlı bir influenxa virüsü bulaştığında, hayvanın vücudunda suşlar arasında gerçekleşecek genetik madde transferiyle varyant suşlar oluşacak ve bunlar da dışkı ile etrafa yayılabilecektir. Bu durum, geniş bölgelerde aşı uygulamayı sınırlandıran olumsuzlukların başında gelmektedir. Buna rağmen günümüzde daha çok tavuk ve hindiler başta olmak üzere, kanatlı hayvanlar AI tip A virüs infeksiyonlarına karşı hem LPAI hem de HPAI patotipinde H5 ve H7 infeksiyonlarına karşı aşılanmaktadır. ABD’de 1970’li yıllardan itibaren H5 ve H7 alt tipleri hariç, LPAI virüs infeksiyonlarına karşı inaktif aşı uygulaması yapılmaktadır (TOLLIS ve DI TRANI, 2002). İnaktif aşılar daha çok etkenlerin embriyolu yumurtalarda üretilip, formol veya propiolakton ile inaktive edildikten sonra uygun bir adjuvantla kombine edilmesiyle hazırlanmaktadır (BRUGH ve ark., 1979; TOLLIS ve DI TRANI, 2002). Ichinohe ve ark. (2006) AI tip A virüs infeksiyonlarına karşı yeni bir adjuvant (surf clam microplates) ile kombine edilen H1N1 ile H3N1 suşlarını kullanarak farelerde deneysel bir çalışma yapmışlardır. Aşının farelere intranasal olarak uygulandığı bu çalışmada araştırmacılar; söz konusu adjuvantla kombine ederek uyguladıkları bu aşının sonuç olarak koruyucu düzeyde immun yanıt oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Özellikle hindilere uygulanan inaktif H9N2 ve H6N2 aşılardan başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Günümüzde inaktif tüm hücre H6N2 ve H9N2 aşıları İtalya’da lisans almış aşılar olup, sahada uygulanmaktadır. Yine İtalya’da HPAI patotipindeki H7N3 alt tipinden hazırlanan inaktif başka bir aşı LPAI patotipindeki H7N1 alt tipine karşı başarıyla kullanılmaktadır. Bu ülkede uygulanan diğer bir aşılama programında ise ilk kez marker aşı

kullanılarak, doğal infekte ve aşılı hayvanların ayırımlarının yapılabilmesi amaçlanmıştır (TOLLIS ve DI TRANI, 2002). Meksika’da 1998 yılından itibaren H5 hemaglüteni içeren rekombinant çiçek aşısı LPAI patotipindeki H5N2’ye karşı kullanılmaktadır (CAPUA ve ark., 2000b). HPAI patotipindeki H5N2 alt tipinden hazırlanan inaktif tüm hücre aşısı yine Meksika’da (GARCIA ve ark., 1998), aynı özellikteki H7N3 aşısı ise Pakistan’da (TOLLIS ve DI TRANI, 2002) yoğun olarak kullanılmaktadır.

Avrupa Birliği Ülkelerinde aşı programı, 1999- 2000 yıllarında İtalya’da önce LPAI, sonra HPAI ve sonra tekrar LPAI virüs infeksiyonlarının yaşanmasından sonra uygulanmaya başlamıştır. Uygulanan aşı programında, infeksiyonun görüldüğü bölgelerdeki hasta ve hastalıktan şüphelenilen hayvanlar elden çıkarıldıktan sonra, özellikle hayvan yoğunluğu fazla olan çiftliklerdeki 6 milyon adet kanatlı aşılanmıştır (TOLLIS ve DI TRANI, 2002).

Çin’de H5N1 suşundan hazırlanan ve tavuklara tek doz olarak uygulanan inaktif bir aşının 10 aydan fazla koruma sağladığı, aynı aşının ördek ve kazlar için de immunojenik olduğu ifade edilmiştir. Diğer yandan, rekombinant başka bir aşının ise tavukları, H5N1 ile yapılan epruvasyona karşı 40 haftadan fazla koruduğu rapor edilmiştir (QIAO ve ark., 2006).

AI tip A virüs infeksiyonlarından korunmada deneysel olarak uygulanan ilk nükleik asit aşılardan biri, Fyan ve ark. (1993) tarafından geliştirilen ve H7 geninin klonlanmasıyla elde edilen aşıdır. Aşının H7 alt tipi ile yapılan epruvasyon denemelerinde başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir. H5 ve H7 ile yapılan başka bir DNA aşısı geliştirme çalışmasında, aşının HPAI patotipindeki H5 ve H7 suşlarına karşı güçlü bir koruma sağladığı ifade edilmiştir (KODIHALLI ve ark., 2000). Farelerde yapılan başka bir aşı geliştirme çalışmasında ise virüsün kimyasal yapısı taklit edilerek hazırlanan rekombinant aşının H, N ve M2 proteinlerini nötralize eden antikör sentezini uyarak, farelerde yeteri düzeyde koruma sağladığı bildirilmiştir (SZÉCSI ve ark., 2006).

Ülkemizin sulak alanlarının önemli göç rotaları üzerinde bulunması ve bu alanların bir kuş cenneti haline gelmeleri bio-çeşitlilik açısından önemli bir avantajdır. Ancak avian influenza gibi infeksiyonlar açısından bakıldığında, bir o kadar da dezavantajdır. Yabani kuşlar, evcil kanatlılara göre birçok hastalığa karşı daha dayanıklıdır. Özellikle göçmen yabani kuşlar, taşıdıkları hastalık etkenlerini gittikleri yerlerdeki tüm kanatlılara bulaştırabilmektedirler. Risk, göç güzergahı üzerinde bulunan sulak alanlarda ve yakın çevrelerinde daha fazladır. Bu nedenle, Türkiye’nin toplam sulak alanlarının 1/5 gibi büyük bir kısmına sahip olan Van Gölü Havzası, risk oranı en yüksek noktalardan birisidir. 2005 yılında ortaya çıkan AI tip A virüs infeksiyonunda, göçmen kuşların risk haritası ile

kuzeydoğu-güney göç rotası çakişmaktadır. Bu durum, sadece günümüz için değil, gelecekte de benzer vakaların tekrar ortaya çıkabileceği anlamına gelmektedir (BOYNUKARA ve ark., 2007; BOYNUKARA ve ark., 2008). Van Gölü Havzası; birçok kanatlı hayvan türü için ya sürekli olarak kullanılan bir yaşam alanı, ya da göçmen kuş türlerinin bazılarında olduğu gibi yılın belli mevsimlerinde geçici olarak tercih edilen bir bölge veya yine bazı göçmen kuşlar için transit geçiş noktası olarak dikkati çekmektedir. Göçmen su kuşlarının Van Gölü Havzasında yılın belli mevsimlerinde barınıyor olmaları, yöredeki yerli kanatlı türlerine etkenin bulaşma riskini ciddi ölçüde artırmaktadır (ADIZEL ve ark., 2008). Çünkü göçmen kuşlar, seyirleri süresince beslenmek için durakladıkları alanlarda, uçuş süresine göre çok daha fazla zaman geçirmektedirler (ADIZEL, 1998; OLSEN ve ark., 2006).

Türkiye’de ilk AI tip A virüs salgını 2005 yılında Balıkesir’de yaşanmıştır (ONCUL ve ark., 2006). İnfeksiyon, toplam 1800 hayvandan oluşan bir hindi sürüsünde başlamış ve hayvanlardan 1700’ü (%94.4) ölmüştür. Yapılan çalışmalarda etkenin H5N1 olduğu saptanmıştır. Ülkemizdeki ikinci salgın Aralık 2005-Ocak 2006 tarihleri arasında Iğdır ilinde görölmüştür. Bu salına da H5N1 izolatının neden olduğu belirlenmiştir. İkinci salgından sonra toplam 2246954 adet AI virüs enfeksiyonuna duyarlı olan hayvan imha edilmiştir. Ülkemizde AI tip A virüsleriyle ilgili olarak özellikle göçmen kuşlar başta olmak üzere; yerli, transit göçer ve kış ziyaretçisi olan kanatlı türlerinde yeterli sayıda çalışma yapılmamıştır. Türkiye’de 1989-2004 yılları arasında yapılan 8 farklı bağımsız çalışmada, 7330 adet çeşitli kanatlı türlerine ait (tavuk, güvercin, hindi, ördek ve kafes kuşları) materyaller (iç organ ve kloakal svap) kullanılarak virolojik, 26945 serum incelenmiş ve serolojik olarak AI tip A virüslerinin varlığı ortaya konulmaya çalışılmıştır. İncelen materyallerin hiç birinde, AI tip A virüsleri yönünden pozitiflik saptanmadığı bildirilmiştir (COVEN, 2006).

AI tip A virüslerinin evcil kanatlı hayvanlardan insanlara bulaşarak, gelecekte yaşanacak muhtemel pandemiler hakkında bir fikir vermesi bakımından, ülkemizde 2005 yılı sonu ile 2006 yılı başlarında yaşanan ikinci salgın tipik bir örnek olarak değerlendirilmelidir. Salgının devam ettiği yaklaşık 1 aylık süreçte 625 kişi Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesine kuş gribi şüphesiyle başvurmuştur. Bu insanlardan 131’i influenza A virüsleri tarafından infekte olduğu düşünölen kanatlı hayvanlarla temas ettiklerini bildirmişlerdir. Toplam 159 kişi ise potansiyel infekte kanatlı hayvanlarla temas etmiş ve kendilerinde de klinik bulgular saptanan hastalardır. Bu hastalardan 290’ı AI virüs enfeksiyonu yönünden laboratuvar analizine alınmıştır. Teşhise yönelik olarak hastalardan alınan örnekler ELISA, RT-PCR ve influenza hızlı test kiti ile analiz edilmiştir. Hastaların tamamı ELISA ve hızlı test

kiti ile negatif bulunurken, 10'u RT-PCR ile pozitif bulunmuştur. Bunlardan 8'inde ise H5N1 alt tipi saptanmış ve bu izolat WHO tarafından doğrulanmıştır. H5N1 alt tipi izole edilen insanların ölen ya da hasta olan kanatlı hayvanlarla direkt temas ettikleri ve bu hastalardan 4'ünün AI tip A virüs infeksiyonu nedeniyle öldükleri bildirilmiştir (ONER ve ark., 2006).

Türkiye, son yıllarda dünya kanatlı endüstrisinin önemli bir aktörü haline gelmiştir. Avrupa Birliğine giriş müzakerelerinin yürütüldüğü bu dönemde, tarım ve hayvancılık kapsamında birliğe entegrasyon konusunda en hazırlıklı olan bölümün kanatlı sektörü olduğu bilinen bir gerçektir. Kanatlı hayvan ürünlerimiz Avrupa Birliği Ülkeleri dahil, bir çok ülkeye ihraç edilmektedir ve ülkemizde yaşanacak AI virüs salgınından ülke ekonomisinin ciddi derecede olumsuz etkileneceği kesindir. Göçmen kuşların AI tip A virüslerinin en önemli taşıyıcısı olması ve Türkiye'nin de önemli göç yolları üzerinde bulunuyor olması birlikte değerlendirildiğinde, ülkemizin bu virüslerin neden olduğu infeksiyonlar bakımından büyük bir risk altında olduğu görülmektedir. Türkiye; azalan su kaynakları ve küresel ısınma gibi giderek değişen ekolojik faktörlere bağlı olarak, Asya orijinli göçmen kuşların da tercih ettikleri göç rotası üzerinde bulunmaktadır. Bu konuda, özellikle *Anseriformes* (ördek, kaz ve kuğu gibi) ve *Charadriiformes* (martı ve denizkırlangıcı gibi) takımlarındaki kuşların kıtalararası uçabilme yeteneklerinin de göz önünde bulundurulması yararlı olacaktır. Her yıl 500000'den fazla göçmen kuş bu göç yollarını kullanmaktadır. Günümüzde H5 ve N9 gibi alt tiplerin Asya Kıtasındaki bazı ülkelerde endemik olduğu dikkate alındığında, ülkemiz için infeksiyon riskinin ne kadar yüksek olduğu daha iyi anlaşılmaktadır. AI tip A virüs infeksiyonları bakımından bu derece risk altında olan ülkemizde, virüsün prevalansı ile ilgili hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Kimi Asya Ülkeleri ve Japonya'da prevalansla ilgili önemli veriler mevcut olup (WEBSTER ve ark., 1992; NGUYEN ve ark., 2005; OLSEN ve ark., 2006), herhangi bir salgın anında kısa sürede teşhis, alt tipin saptanması ve en önemlisi de korumaya yönelik tedbirlerin alınması çok daha etkili bir şekilde yapılabilecektir.

AI tip A virüs infeksiyonlarıyla ilgili olarak gerek hasta gerekse taşıyıcı hayvanlardan izole edilen suşların özelliklerinin bilinmesi (izolatın alt tipi ve insidensi gibi), hastalıkla mücadele bakımından bölgesel, ulusal ve uluslararası düzeyde önem arz etmektedir. Etkenin taşınmasında hangi kanatlı türlerinin daha önemli roller üstlendiklerinin belirlenmesi, gelecekte hazırlanacak aşı suşlarının seçimine yardımcı olacaktır.

İnfluenza virüs infeksiyonlarıyla mücadele bakımından tüm dünyada, WHO'ya bağlı 4 merkez referans laboratuvar (Londra, Atlanta, Melbourne ve Tokyo), 110 ulusal referans laboratuvar ve bazı lokal referans laboratuvarlar görev yapmaktadır. Bu laboratuvarların

çalışma alanları sirkulasyon halindeki influenza virüslerinin tespiti, hastalığın epidemiyolojisi, suşların ilaç dirençliliğinin saptanması ve teşhise yardımcı olacak laboratuvar tekniklerinin geliştirilmesi şeklinde özetlenebilir (PLAYFORD ve DWYER, 2002).

1.1. Van Gölü Havzasının ornitofaunistik açıdan değerlendirilmesi: İnsan ve diğer primatlar son 2 milyon yıldan beri dünya sahnesinde yer almasına rağmen, kuşlar günümüzden yaklaşık 180 milyon yıl önce Jura Dönemi'nde ortaya çıkmışlardır. Memeli (*Mamalia*) ve kuş (*Aves*) sınıflarında yer alan canlılar, sıcakkanlı, bunların dışındaki sınıfların tamamı soğukkanlı canlılardır. Bu nedenle kuşlar, yılın her mevsiminde çevremizde görülmektedir (DEMİRİSOY, 1991; KURU, 1994; KIZIROĞLU, 2001). Kuşlar, insanoğluna çeşitli şekillerde zarar veren, böcek, kemirgen ve sürüngen gibi hayvanların popülasyonlarını kontrol altında tutarak yardımcı olmaktadır. Ayrıca; insanoğlu için besin, eğlence, neşe, huzur ve gücün sembolüdürler.

Yapılan araştırmalar, ornitolojik verilerin hızla değiştiğini göstermektedir. The International Union for Conservation of Nature'nin (IUCN) 2007 yılında hazırlamış olduğu raporda, 42000 omurgalı hayvan türünden 9817'sinin kuş türü olduğu bildirilmektedir (ANONİM, 2006a; ANONİM, 2007b; ANONİM 2007c). Türkiye'nin sahip olduğu kuş türü sayısı ise 437 dir. Bu rakam, rastlantısal ve tartışmalı (yeterince kaydı olmayan) türler ile birlikte 502'yi bulmaktadır (KIZIROĞLU, 2008). Son yıllarda Van Gölü Havzasının barındırdığı kuş türü sayısı 213'e yükselmiştir. Havzadaki ornitolojik araştırmalar yaygınlaştıkça bu sayının 300'lere kadar artabileceği öngörülmektedir (ADİZEL, 1993; AKYIDIZ, 2004; DURMUŞ ve ADİZEL, 2007).

Avrupa kıtasının tamamında 500 kadar kuş türünün yaşadığı düşünülürse; gerek ülkemizin ve gerekse Van Gölü Havzasının kuş varlığı bakımından zenginliği belirgin bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Üstelik bu bio-çeşitlilik zenginliği sadece kuşlarla sınırlı olmayıp, birçok canlı gurubunda da kendisini göstermektedir. Türkiye'deki bu biyolojik çeşitliliğin nedeni tesadüfi değildir. Türkiye'nin paleocoğrafyası, geçirdiği buzul dönemleri, yüzey şekilleri, iklim çeşitliliği, sulak alanları, konumu ve daha birçok neden bu toprakları yaban canlıları için cazibe merkezi haline getirmiştir. Örneğin, tüm dünyada bilinen 37 flora bölgesinin üç tanesinin ülkemiz sınırlarında yer alması sık rastlanan bir durum değildir (KILIÇ ve EKEN, 2004).

Türkiye'de müthiş bir biyom çeşitliliği mevcuttur. Yüksek dağların tepesindeki buzulların yer aldığı tundra biyomundan başlayarak zayıf çalılıkların olduğu taiga, iğne yapraklıların yer aldığı hylea ve aşağı gidildikçe stepler, bozkırlar hatta çöl biyomları ülkemiz

topraklarında mevcuttur. Birçok alanda oluşmuş olan mikroklimatik faktörler endemik canlı türlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur (DURMUŞ, 2008).

İnsanlık tarihi incelendiğinde ilk yerleşimlerin sulak alanların etrafında yoğunlaştığı ve devam ettiği bilgisi ortaya çıkar. İnsanoğlu çeşitli şekillerde sulak alanlardan faydalanmaktadır. Günümüzde yeryüzünün %4-6 kadarı su kuşlarının yaşadığı sulak alanlardır. Bu habitatalar 7-9 milyon km² kadardır. Antartika hariç her yere dağılmışlardır. Yoğunluk tropiklerden kutuplara doğru azalır (ANONİM, 2007a).

Su kuşları ile yaşadıkları sulak alanlar arasında sıkı bir ilişki vardır. En son araştırma sonuçlarına göre; Türkiye 300 farklı noktadaki, yaklaşık 2000000 hektar (ha) sulak alanı ile dünyanın bu konudaki sayılı ülkelerinden birisidir. Bu alanlardan 135'i uluslararası önemde olup, 12'si Ramsar Sözleşmesi kapsamındadır. Türkiye'nin sahip olduğu sulak alanlar, bütün Avrupa ve Ortadoğu'dan daha fazladır. Türkiye'de bulunan toplam sulak alanların yaklaşık 1/5'ni kapsayan Van Gölü Havzası, 418560 ha'dan daha fazla sulak alana sahiptir (ADİZEL ve DURMUŞ, 2007; ANONİM, 2007a; ANONİM, 2007d;) (Şekil 1).

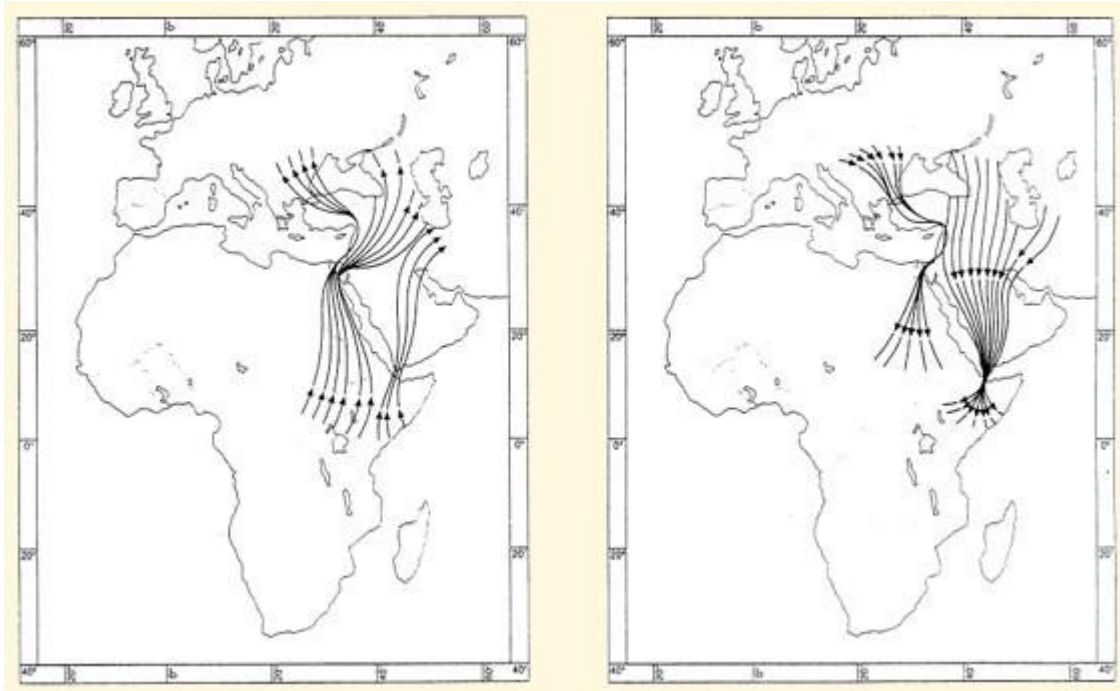


Şekil 1: Türkiye'nin önemli sulak alanları (www.cevreorman.gov.tr, Erişim Tarihi: 25 Ekim 2008).

Sulak alanlar, göçmen kuşların göç yollarının oluşmasında en önemli faktörler arasındadır. Bu havzada bulunan sulak alanlar: Van Gölü 390000 ha, Erçek Gölü 9520 ha,

Sodalı Gölü 1500 ha ve Nemrut Gölü 4500 ha olarak sıralanmaktadır (ADİZEL ve DURMUŞ, 2007; ANONİM, 2007a; ANONİM, 2007d).

1.2. Van Gölü Havzasının göç yollarına yakınlığı: Başta iklim ve beslenme sorunları olmak üzere birçok nedenden dolayı, kuşların bazı türleri her yıl düzenli olarak göç ederler. Çoğunlukla göç yönü ilkbaharda kuzeye, sonbaharda ise güneye doğrudur (Şekil 2).



Şekil 2: İlkbahar (sol) ve sonbahar mevsimlerinde kuş göç yolları ([http://bornova.vet.gov.tr/surveykanscalisma\[1\].pdf](http://bornova.vet.gov.tr/surveykanscalisma[1].pdf); Erişim tarihi: 27 Ocak 2009)

Türkiye, coğrafik olarak Batı Palearktik Bölge'de yer almaktadır. Bu bölgede bulunan dört önemli kuş göç yolunun ikisi Anadolu toprakları üzerinden geçmektedir. Biri kuzeydoğu-güney göç rotası (Çoruh Vadisi) ve diğeri ise kuzeybatı-güney göç rotası (Boğaziçi) olarak adlandırılmıştır. Ana göç yolları yanında daha küçük ve tali birçok güzergah da mevcuttur. Bölgedeki göçmen kuş türleri genel olarak Asya, Avrupa ve Afrika kıtaları arasında hareket etmektedirler (Şekil 3).

Birçok kuş türü bu göç rotasını takip ederek Doğu Karadeniz Bölgesi'nden Türkiye'ye girmekte, Çoruh Nehri üzerinden geçerek Doğu Anadolu'ya yayılmaktadır. Bazıları Van Gölü

ve Yüksekova istikametinde, bazı gruplar ise Kahramanmaraş ve Antakya yönünde güneybatıya yönelmektedir (ANONİM, 1995; ANONİM, 1997).



Şekil 3: Türkiye tavuk vebası risk haritası(www.ankara.edu.tr, Erişim Tarihi: 25 Ekim 2008).

Van Gölü Havzası da aynı göç sistemi içerisinde kuzeydoğu-güney göç rotası üzerinde bulunmaktadır (Şekil 4).



Şekil 4: Van Gölü Havzası kuş göç yolları haritası (NASA-GSFC'den alınmıştır. Göç yolları ise bu çalışma kapsamında tarafımızdan çizilmiştir).

1.3. Van Gölü Havzasının kuşların taşıdığı hastalıklar bakımından değerlendirilmesi:

Kuşlar göç ederken birçok bitki tohumunu yaydıkları gibi, çok sayıda hastalık etkenini de gittikleri yeni yerlere taşırlar. Yazılı kaynaklar incelendiğinde, kuşlarla taşınan hastalıkların ortaya çıktığı kesimler ile sulak alanların ve göç yollarının önemli oranda örtüştüğü görülecektir.

Bu durumda, yeryüzündeki herhangi bir sulak alanda kuşların yoğunlaşması, aynı zamanda orada kuşlarla taşınan hastalık riskinin artması olarak algılanmalıdır. Sulak alan ve kuş zengini olan Türkiye, bu açıdan değerlendirilince, önemli risk noktalarına sahiptir. Van Gölü Havzası da Türkiye'deki risk noktalarını en fazla barındıran havzalarından birisi olarak öne çıkmaktadır.

Anadolu hem zengin habitat çeşitliliğine sahiptir, hem de göç yolları üzerinde bulunmaktadır. Bu durum Türkiye'yi kuşlar açısından cazip hale getirdiği gibi, kuşlarla taşınan hastalıklar açısından da önemli kılmaktadır. Bu nedenle; gerek Türkiye'de, gerekse Van Gölü Havzasında risk noktalarının ve derecelerinin belirlenmesi alınacak tedbirleri ortaya koymak açısından son derece önemlidir.

Bu tip hastalıklar genelde belli sezonlarda yoğun olarak görülmektedir. Hastalık ile göç dönemi arasındaki ilişki düşünülünce, risk noktasının belirlenmesi yanında risk döneminin de önemi ortaya çıkmaktadır. Van Gölü Havzasındaki kuş türlerinin, %43.2'si göçmen, %37.8'i yerli, %12.1'i kış ziyaretçisi ve %6.1'i transit göçerdir. Göç zamanlarının bilinmesi önceden hazırlıklı olma bakımından son derece önemlidir.

Türkiye'ye gelen kuşların hangi rotayı izledikleri, geçtikleri noktalarda hastalıkların olup olmaması da önem arz etmektedir. Dolayısı ile riskin yönü de bilinmelidir. Erken önlem almak ve hazırlıklı olmak için diğer önemli bir faktör de infekte türlerin önceden bilinmesidir. Kısaca; neyin, nereden ve ne zaman geleceğini önceden bilmek hazırlıklı olmaya önemli katkılar sağlayacaktır. Bu soruların cevaplanabilmesi için süreklilik gerektiren bilimsel çalışmalara ivedilikle ihtiyaç duyulmaktadır (ÖĞÜN ve BOYNUKARA, 1999; ADIZEL ve ark., 2008; ÖĞÜN ve ark., 2008).

1.4. Van Gölü Havzasının barındırdığı kuş türleri, statüleri ve göç dönemleri: Belli bir alanda gözlenen kuşlar beş statüde değerlendirilmektedirler. Bunlar;

1.4.1. Yerli türler: Bu kuş türleri yılın her mevsiminde aynı bölgededirler. Çevre koşullarında önemli bir sorun olmadıkça genellikle başka bir yere gitmezler.

1.4.2. Kış ziyaretçisi türler: Bu kuşlar sonbahar ile birlikte daha kuzeyden gelip, ilkbaharla birlikte tekrar kuzeye giderler.

1.4.3. Göçmen türler: İlkbahar göçleri ile gelip, kuluçkaya yatan ve sonbaharda yavruları ile birlikte güneye göç eden türlerdir.

1.4.4. Transit göçer türler: İki uzak nokta arasında yapılan göçlerde, daha çok dinlenme ve beslenme amaçlı kısa süreli konaklayan türlerdir.

1.4.5 Rastlantısal tür: Alanda çok ender görülebilen türlerdir (KİZİROĞLU, 1989; KİZİROĞLU, 2008), (Tablo 2).

Havzada ilkbahar göçleri genellikle şubat sonu–mart başı gibi başlamakta, nisan ortasına kadar sürmektedir. Sonbahar göçleri ise daha çok ekim başlarında başlayıp, ay sonuna doğru bitmektedir. Transit göçer türler de aynı dönemlerde havzadan geçmektedirler.

Tablo 2: Van Gölü Havzasında gözlenen kuş türleri (KİZİROĞLU, 1989; KİZİROĞLU, 2008).

SAYI	KUŞ FAMILYASI/TÜRÜ	TÜRKÇE ADI	STATÜSÜ
1. GAVIIDAE			
1.	<i>Gavia stellata</i>	Kızılgerdan dalgıç	KZ
2.	<i>Gavia arctica</i>	Karagerdan dalgıç	Y
2. PODICIPEDIDAE			
3.	<i>Podiceps cristatus</i>	Tepeli batağan	Y
4.	<i>Podiceps grisegena</i>	Kırmızı boyun batağan	G
5.	<i>Podiceps auritus</i>	Kulaklı batağan	KZ
6.	<i>Podiceps nigricollis</i>	Karaboyun batağan	Y
7.	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Bahri (Küçük batağan)	Y
3. PHALACROCORACIDAE			
8.	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Karabatak	RT
4. ARDEIDAE			
9.	<i>Ardea cinerea</i>	Gri balıkçıl	Y
10.	<i>Ardea purpurea</i>	Erguvani balıkçıl	G
11.	<i>Egretta alba</i>	Büyük akbalıkçıl	G
12.	<i>Egretta garzetta</i>	Küçük akbalıkçıl	G
13.	<i>Ardeola ralloides</i>	Alaca balıkçıl	G
14.	<i>Bubulcus ibis</i>	Öküz balıkçılı	G
15.	<i>Nycticorax nycticorax</i>	Gece balıkçılı	G
16.	<i>Ixobrychus minutus</i>	Cüce balaban	G
17.	<i>Botaurus stellaris</i>	Balaban	G
5. CICONIIDAE			
18.	<i>Ciconia ciconia</i>	Akleylek	G

6. PHOENICOPTERIDAE			
19.	<i>Phoenicopterus ruber</i>	Flamingo	T
7. ANATIDAE			
20.	<i>Cygnus cygnus</i> *	Ötücü kuğu*	KZ
21.	<i>Anser anser</i>	Boz kaz	KZ
22.	<i>Anser albifrons</i>	Akalınlı büyük sakarca kazı	KZ
23.	<i>Tadorna tadorna</i>	Suna	Y
24.	<i>Tadorna ferruginea</i>	Angıt	Y
25.	<i>Anas platyrhynchos</i>	Yeşilbaş ördek	Y
26.	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	KZ
27.	<i>Anas strepera</i>	Boz ördek	T
28.	<i>Anas acuta</i>	Kılkuyruk	Y
29.	<i>Anas querquedula</i>	Çıkrıkçın	G
30.	<i>Anas penelope</i>	Fiyu	KZ
31.	<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkgağa	KZ
32.	<i>Marmaronetta anguirostris</i> *	Dargaga	G
33.	<i>Netta rufina</i>	Macar ördeği	G
34.	<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş pakta	KZ+G
35.	<i>Aythya fuligula</i>	Tepeli patka	KZ
36.	<i>Aythya nyroca</i> *	Akgöz*	G
37.	<i>Oxyura leucocephala</i> *	Dikkuyruk*	G
8. ACCIPITERIDAE			
38.	<i>Milvus migrans</i>	Karaçaylak	T
39.	<i>Heliaetus leucorhynchus</i>	Akband kuyruklu kartal	Y
40.	<i>Heliaetus albicilla</i>	Akkuyruk	Y
41.	<i>Accipiter nisus</i>	Atmaca	Y
42.	<i>Accipiter gentilis</i>	Çakır kuşu	Y
43.	<i>Circus aeruginosus</i>	Saz delicesi	Y
44.	<i>Circus pygarcus</i>	Çayır doğanı	T
45.	<i>Circus cyaneus</i>	Mavi doğan, Gök doğan	KZ
46.	<i>Buteo rufinus</i>	Kızıl şahin	Y
47.	<i>Buteo buteo</i>	Şahin	Y
48.	<i>Neophron percnopterus</i>	Beyaz akbaba	G
49.	<i>Gyps fulvus</i>	Kızıl akbaba	Y
50.	<i>Circaetus gallicus</i> *	Yılan kartalı *	G
51.	<i>Aquila clanga</i> *	Büyük bağırgan kartal*	T
52.	<i>Aquila chrysaetos</i>	Kaya kartalı	Y
53.	<i>Aquila heliaca</i> *	Şah kartal*	Y
54.	<i>Aquila rapax</i> *	Bozkır kartalı*	KZ
55.	<i>Hieraetus pennatus</i>	Küçük kartal	T
9. PANDIONIDAE			
56.	<i>Pandion heliaetus</i> *	Balıkkartalı*	G
10. FALCONIDAE			
57.	<i>Falco tinnunculus</i>	Kerkenez	Y
58.	<i>Falco subbuteo</i>	Delice doğan	G
59.	<i>Falco biarmicus</i>	Bıyıklı doğan	T
60.	<i>Falco naumanni</i> *	Kızıl kerkenez*	G
61.	<i>Falco cherrug</i> *	Uludoğan*	KZ
62.	<i>Accipiter nisus</i>	Doğu atmacası	Y

63.	<i>Accipiter gentilis</i>	Çakır kuşu	Y
11. PHASIANIDAE			
64.	<i>Alectoris chukar</i>	Kımalı keklik	Y
65.	<i>Perdix perdix</i>	Çil keklik	Y
66.	<i>Coturnix coturnix</i>	Bıldırcın	G
12. RALLIDAE			
67.	<i>Rallus aquaticus</i>	Su yelvesi	Y
68.	<i>Gallinula chloropus</i>	Yeşil ayak su tavuğu	Y
69.	<i>Fulica atra</i>	Sakarmeke	Y
13. GRUIDAE			
70.	<i>Grus grus*</i>	Turna*	G
14. OTIDIDAE			
71.	<i>Otis tarda*</i>	Büyük toy kuşu*	G
15. HAEMATOPODIDAE			
72.	<i>Haematopus ostralegus</i>	Deniz saksacağı	G
16. RECURVIROSTRIDAE			
73.	<i>Himantopus himantopus</i>	Uzunbacak	G
74.	<i>Recurvirostra avosetta</i>	Kılıçgaga	G
17. BURHINIDAE			
75.	<i>Burhinus oedicephalus</i>	Kocagöz	G
18. CHARADRIIDAE			
76.	<i>Vanellus vanellus</i>	Kızkuşu	G
77.	<i>Charadrius leschnaultii</i>	Çöl yağmurcunu	G
78.	<i>Charadrius dubius</i>	Kolyeli küçük yağmurcun	G
19. SCOLOPACIDAE			
79.	<i>Arenaria interpres</i>	Taş çeviren	T
80.	<i>Calidris minuta</i>	Küçük kumkuşu	G
81.	<i>Calidris temminckii</i>	Sarıbacak kumkuşu	G
82.	<i>Calidris alpina</i>	Karakarın kumkuşu	T
83.	<i>Tringa totanus</i>	Kızılacak	G
84.	<i>Tringa erythropus</i>	Pas renkli kızılacak	T
85.	<i>Actitis (T.) hypoleucos</i>	Akkarın yeşilacak	G
86.	<i>Tringa stagnatilis</i>	Bataklık kızılacağı (düdükçünü)	T
87.	<i>Tringa ochropus</i>	Akkuyruk (Yeşil) düdükçün	T
88.	<i>Tringa glareola</i>	Orman kızılacağı	T
89.	<i>Tringa nebularia</i>	Yeşilacak	T
90.	<i>Philomachus pugnax</i>	Döğüşken kuş	T
91.	<i>Limosa limosa</i>	Karakuyruk suçulluğu	T
92.	<i>Limosa lapponica</i>	Çizgili kuyruklu çulluk	T
93.	<i>Scolopax rusticola</i>	Çulluk	KZ
94.	<i>Gallinago media</i>	Büyük bataklık çulluğu	KZ
95.	<i>Gallinago gallinago</i>	Suçulluğu	T
20. BURHINIDAE			
96.	<i>Burhinus oedicephalus</i>	Kocagöz	G
21. GLAREOLIDAE			
97.	<i>Glareola pratincola</i>	Kızılacak bataklık kırlangıcı	G
22. STERCORARIIDAE			
98.	<i>Stercorarius skua</i>	Büyük korsanmartı	G
99.	<i>Stercorarius parasiticus</i>	Yırtıcı martı	KZ

23. LARIDAE			
100.	<i>Larus minutus</i>	Cüce martı	T
101.	<i>Larus ridibundus</i>	Karabaş (Gülen) martı	Y
102.	<i>Larus genei</i>	İncegaga martı	T
103.	<i>Larus fuscus</i>	Karasırtlı martı	T
104.	<i>Larus canus</i>	Küçük gümüşü martı	KZ
105.	<i>Larus michahellis</i>	Van martısı	Y
24. STERNIDAE			
106.	<i>Chlidonias leucopterus</i>	Akkanat sumru	G
107.	<i>Chlidonias niger</i>	Kara sumru	T
108.	<i>Hydroprogne caspia</i>	Hazar sumrusu	G
109.	<i>Gelochelidon nilotica</i>	Gülen sumru	G
110.	<i>Sterna sandvicensis</i>	Karagaga denizkırlangıcı	G
111.	<i>Sterna albifrons</i>	Akalın denizkırlangıcı	T
112.	<i>Sterna hirundo</i>	İrmak sumrusu	G
25. PTEROCLIDAE			
113.	<i>Pterocles orientalis*</i>	Karakarın steptavuğu*	Y
26. COLUMBIDAE			
114.	<i>Columba livia</i>	Kaya güvercini	Y
115.	<i>Columba oenas</i>	Gökçe güvercin	G
116.	<i>Columba palumbus</i>	Tahtalı güvercin	Y
117.	<i>Streptopelia turtur</i>	Üveyik	G
118.	<i>Streptopelia decaocta</i>	Kumru	Y
27. CUCULIDAE			
119.	<i>Cuculus canorus</i>	Guguk kuşu	G
28. STRIGIDAE			
120.	<i>Bubo bubo*</i>	Puhu*	Y
121.	<i>Otus scops</i>	İshak kuşu	Y
122.	<i>Athena noctua</i>	Kukumav	Y
29. CAPRIMULGIDAE			
123.	<i>Caprimulgus europaeus</i>	Çobanaldatan	G
30. APODIDAE			
124.	<i>Apus apus</i>	Ebabil	G
125.	<i>Apus melba</i>	Akkarın ebabil	G
31. ALCEDINIDAE			
126.	<i>Alcedo atthis*</i>	Yalıçapkını*	G
127.	<i>Ceryle rudis*</i>	Gri yalıçapkını*	G
32. MEROPIDAE			
128.	<i>Merops apiaster</i>	Arıkuşu	G
33. CORRACIIDAE			
129.	<i>Corracias garrulus</i>	Kuzgun	G
34. UPUPIDAE			
130.	<i>Upupa epops</i>	İbibik	G
35. ALAUDIDAE			
131.	<i>Melanocorypa calandra</i>	Boğmaklı tarlakuşu	Y
132.	<i>Melanocorypa bimaculata</i>	Küçük boğmaklı tarlakuşu	G
133.	<i>Calandrella brachydactyla</i>	Bozkır toygarı	G
134.	<i>Calandrella rufescens</i>	Küçük bozkır toygarı	G
135.	<i>Lullula arborea</i>	Orman toygarı	Y

136.	<i>Galerida cristata</i>	Tepeli toygar	Y
137.	<i>Alauda arvensis</i>	Tarlakuşu	Y
138.	<i>Eremophila alpestris</i>	Kulaklı tarlakuşu	Y
36. HIRUNDINIDAE			
139.	<i>Hirundo rustica</i>	İs (Kır) kırlangıcı	G
140.	<i>Hirundo daurica</i>	Kızıl kırlangıç	G
141.	<i>Riparia riparia</i>	Kıyı (Kum) kırlangıcı	G
142.	<i>Delichon urbicum</i>	Pencere(Ev) kırlangıcı	G
37. MOTACILLIDAE			
143.	<i>Anthus campestris</i>	Kır incirkuşu	G
144.	<i>Motacilla flava</i>	Sarı kuyrukkakan	G
145.	<i>Motacilla flava feldegg</i>	Maskeli kuyruksallayan	G
146.	<i>Motacilla cinerea</i>	Dağ kuyrukkakanı	Y
147.	<i>Motacilla alba</i>	Ak kuyruksallayan	Y
38. TROGLODYTIDAE			
148.	<i>Troglodytes troglodytes</i>	Çitkuşu	Y
39. TURDIDAE			
149.	<i>Erithacus rubecula</i>	Narbülbülü (Kızılgerdan)	Y
150.	<i>Luscinia megarhynchos</i>	Bülbül	G
151.	<i>Luscinia svecica</i>	Mavigerdan (Buğdaycıl)	G
152.	<i>Irania gutturalis</i>	Ak gerdan	Y
153.	<i>Phoenicurus ochruros</i>	Kara (Ev) kızılkuşu	G
154.	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	Kızılkuşuk (Bahçe kızılkuşu)	Y
155.	<i>Saxicola rubetra</i>	Çayır taşkuşu	Y
156.	<i>Saxicola torquata</i>	Taşkuşu	Y
157.	<i>Oenanthe oenanthe</i>	Kuyrukkakan	G
158.	<i>Oenanthe hispanica</i>	Karakulak kuyrukkakan	G
159.	<i>Oenanthe deserti</i>	Çöl kuyrukkakanı	T
160.	<i>Oenanthe finschii</i>	Kaya kuyrukkakanı	G
161.	<i>Oenanthe pleschanka</i>	Alaca kuyrukkakan	G
162.	<i>Oenanthe isabellina</i>	Toprakrenkli (Boz) kuyrukkakan	G
163.	<i>Monticola saxatilis</i>	Kaya ardıcı (Taşkızıl)	G
164.	<i>Turdus merula</i>	Karatavuk	Y
40. SYLVIDAE			
165.	<i>Cettia cetti</i>	Kamış bülbülü	Y
166.	<i>Locustella luscinioides</i>	Bataklık kamışcını	G
167.	<i>Acrocephalus melanopogon</i>	Bıyıklı kamışcın	G
168.	<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>	Kındıra kamışcını	Y
169.	<i>Acrocephalus palustris</i>	Bataklık saz kamışcını	G
170.	<i>Acrocephalus arundinaceus</i>	Büyük saz bülbülü (ardıcı)	G
171.	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	Saz bülbülü	G
172.	<i>Hippolais (A.) pallida</i>	Gri mukallit	KZ
173.	<i>Sylvia communis</i>	Çalı ötleğeni	G
174.	<i>Sylvia borin</i>	Boz (Bahçe) ötleğeni	G
175.	<i>Sylvia atricapilla</i>	Karabaş ötleğeni	G
176.	<i>Phylloscopus sibilatrix</i>	Orman söğütbülbülü	T
177.	<i>Phylloscopus collybita</i>	Cif caf, Çıvgın	G
178.	<i>Phylloscopus trochilus</i>	Söğütbülbülü	T
179.	<i>Phylloscopus nitidus</i>	Ardıç bülbülü	G

180.	<i>Regulus ignicapilla</i>	Sürmeli altıntavukçuk	Y
181.	<i>Regulus regulus</i>	Altıntavukçuk	Y
41. MUSCICAPIDAE			
182.	<i>Ficedula parva</i>	Cüce sinekkapan	T
183.	<i>Muscicapa striata</i>	Gri (Benekli) sinekkapan	G
42. SITTIDAE			
184.	<i>Sitta naumayer</i>	Kaya sıvacısı	Y
43. PARIDAE			
185.	<i>Parus major</i>	Büyük baştankara	Y
44. REMIZIDAE			
186.	<i>Remiz pendulinus</i>	Çulhakuşu	Y
45. LANIIDAE			
187.	<i>Lanius collurio</i>	Kızılsırtlı ümüksikan	G
188.	<i>Lanius minor</i>	Karaalın ümüksikan	Y
46. CORVIDAE			
189.	<i>Garrulus glandarius</i>	Kestane kargası	Y
190.	<i>Pica pica</i>	Saksağan	Y
191.	<i>Corvus monedula</i>	Cüce karga	Y
192.	<i>Corvus frugilegus</i>	Ekin kargası	Y
193.	<i>Corvus corax</i>	Karakarga	Y
194.	<i>Pyrrhocorax pyrrhocorax</i>	Kızılgaga dağkargası	Y
195.	<i>Corvus corone</i>	Leş kargası	Y
47. STURNIDAE			
196.	<i>Sturnus vulgaris</i>	Sığırcık	Y
197.	<i>Sturnus roseus</i>	Pembe sığırcık	G
48. PASSERIDAE			
198.	<i>Passer domesticus</i>	Ev serçesi	Y
199.	<i>Passer montanus</i>	Dağ serçesi	Y
200.	<i>Passer hispaniolensis</i>	Bataklık serçesi	Y
201.	<i>Petronia petronia</i>	Kayalık serçesi	Y
49. FRINGILLIDAE			
202.	<i>Serinus serinus</i>	Kanarya	Y
203.	<i>Carduelis carduelis</i>	Saka	Y
204.	<i>Carduelis cannabina</i>	Keten kuşu	Y
205.	<i>Carpodacus erythrinus</i>	Çütre (Karmen şakrağı)	G
206.	<i>Carpodacus rubicilla</i>	Kaya şakrağı	G
207.	<i>Rhodopechys sanguinea</i>	Kızılşakrak	Y
50. EMBERIZIDAE			
208.	<i>Emberiza hortulana</i>	Kirazkuşu	G
209.	<i>Emberiza melanocephala</i>	Karabaş kirazkuşu	G
210.	<i>Miliaria (E.) calandra</i>	Tarla kirazkuşu	Y
211.	<i>Emberiza schoeniclus</i>	Bataklık kirazkuşu	G
212.	<i>Emberiza buechani</i>	Taş (Gri ense) kirazkuşu	G
213.	<i>Emberiza cineracea</i>	Gri Türk kirazkuşu	Y

* : Tüm dünyada nesli yok olma tehlikesi altında olan kuş türü

RT: Rastlantısal tür, TG: Transit göçer, KZ: Kış ziyaretçisi, G: Göçmen, Y: Yerli

Bu alışmada; Türkiye’deki sulak alanlar içerisinde önemli bir yere sahip, kuzeydoğu-güney g rotası üzerinde yer alan, yaklaşık 213 kuş türünün barındığı Van Gölü Havzasının kanatlı hayvan faunasını oluşturan bazı kanatlı türlerine ait dışkı örneklerinde, AI tip A virüslerinin RT-PCR ve konvasyonel yöntemlerle tespiti ile izole edilen virüslerin spesifik antiserumlarla alt tiplerinin belirlenmesi amaçlandı.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Araştırmanın materyalini, AI tip A virüslerinin tespiti amacıyla Van Gölü Havzasında proje önerisinde belirtilen örnek toplama noktalarındaki farklı alanlarda, daha önce gözlem yapılarak bulundukları yerler tespit edilen rastlantısal tür, transit göçer, kış ziyaretçisi, göçmen ve yerli statüye sahip 47 kanatlı hayvan türünden 24 Şubat 2006–12 Mart 2008 tarihleri arasında 28 ay süreyle toplanan 1910 adet taze dışkı örneği oluşturdu (Tablo 3 ve 4). Proje kapsamında incelenen materyallerin toplandığı alanlar şekil 5’te, kanatlı türleri ise ek-1’de sunuldu.

2.1.1. Örnek alınan alanlar ve kuş türleri: Konuya ilişkin literatürler dikkate alınarak dışkı örnekleri, su kuşları ağırlıklı olmak üzere AI tip A virüslerini taşıma ihtimalinin yüksek olduğu düşünülen kanatlı türlerinden toplandı. Çalışmanın esas materyalini yabani kuşlardan alınan taze dışkı örnekleri oluşturmakla birlikte, özellikle su kuşlarından horizontal olarak etkeni alabilecekleri düşünülen yerlerde çeşitli evcil kanatlı türlerinden de taze dışkı örnekleri toplandı. Hangi türe ait dışkının hangi noktadan alınacağı, o sezonda yapılan arazi gözlemleri ve göçmen kuşların havzadaki dönemsel hareketleri dikkate alınarak belirlendi. Bir hayvan türünden alınacak materyal sayısının belirlenmesinde, o türde bulunan toplam kanatlı sayısı ile aynı populasyonun havzadaki konaklama yerlerinin sayısı dikkate alındı (IVANOV ve ark., 2008).

Dışkısı alınacak kanatlı türlerinin yerleri, gelişmiş teleskop ve dürbün gibi optik gözlem araçlarıyla belirlendi (Fotoğraf 1). Bu grupların hangi türden veya türlerden oluştuğu tespit edildi. Sürü ve bireylerin ayrıntılı fotoğrafları çekildi ve sürünün izole bir topluluk olup olmadığı belirlendi. Çok büyük gruplarda (1000-2000 birey), sürü içerisinde eğer varsa diğer türler tespit edildi. Çok fazla tür bulunan heterojen gruplar örnek toplamak için tercih edilmedi. Dinlenmek için sahile çıkan su kuşlarının sürüsüne yaklaşıldı. Kuşlar alandan ayrıldıktan sonra, taze dışkı örnekleri tespit edildi (Kuş türlerine göre dışkılar şekil ve büyüklük olarak genellikle spesifiktir). Daha sonra; taze dışkı örnekleri steril swap veya spatüllerle toplanıp, içerisinde transport medium (WHO, 2002) bulunan tüplere konuldu. Her hayvan türüne ait dışkı örneği, RT-PCR ve virüs izolasyonu için kullanılmak üzere iki seri olarak alındı. Grup oluşturan karasal kuşlar da benzer şekilde takip edildi ve grubun konduğu alandan dışkı örnekleri toplandı (Fotoğraf 2, 3, 4a, 4b, 4c, 5a, 5b ve 6). Grup oluşturmayan

bazı türler için kuş yakalama ağıları kullanıldı. Örneklerin toplanması sırasında hiç bir kuşa zarar verilmedi, öldürülmedi.



Fotoğraf 1: Teleskop ile kuş gruplarının gözlenmesi



Fotoğraf 2: Flamingo grubu ve içerisindeki farklı kuş türleri (heterojen bir grup)



Fotoğraf 3: Homojen bir ördek grubu



Fotoğraf 4a: Materyal toplanması



Fotoğraf 4b: Materyal toplanması



Fotoğraf 4c: Prof. Dr. Hiroshi KIDA (Hokkaido Üniversitesi, OIE Dünya HPAI Referans Laboratuvarı Direktörü, Japonya) 8 Ekim 2008 tarihinde projeyle ilgili arazi çalışması, Erçek Gölü, Van



Fotoğraf 5a: Belirlenen hayvan türüne ait taze dışkı örneği



Fotoğraf 5b: Belirlenen hayvan türüne ait taze dışkı örneği



Fotoğraf 6: Dışkı örneğinin transport mediyuma alınması

2.1.2. RT-PCR çalışmaları için örnek alınması: Bu amaçla 1/3 oranında olacak şekilde alınan taze dışkı örnekleri, 3 ml steril gliserinli (%20) ve antibiyotikli [(penisilin G- 2×10^6 U/l; streptomisin-200 mg/l; gentamisin-250 mg/l; nistatin- 0.5×10^6 U/l) fosfat buffer solüsyonu - PBS (8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1.15 gr Na_2HPO_4 , 0.2 gr KH_2PO_4 /1 lt distile su-pH: 7.2)] içeren tüplere konuldu. Örnekler soğuk zincirde ve kısa sürede; Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına ulaştırılıp, çalışılincaya kadar -80°C’de saklandı (WHO, 2002).

2.1.3. Virüs izolasyonu için örnek alınması: Virüs izolasyonu için 1/3 oranında olacak şekilde alınan taze dışkı örnekleri, 3 ml steril antibiyotikli (penisilin G - 2×10^6 U/l; streptomisin -200 mg/l; gentamisin -250 mg/l; nistatin- 0.5×10^6 U/l) PBS içeren tüplere konuldu. Örnekler soğuk zincirde ve kısa sürede; Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına ulaştırılıp, çalışılincaya kadar -80°C’de saklandı (WHO, 2002).

Proje öneri formunda örnek alınması hedeflenen 36 kanatlı türünün 3’ünden (*Athena noctua*-kukumav kuşu, *Hirundo daurica*-kızıl kırlangıç ve *Delichon urbica*-pencere

kırlangıcı) dışkı toplama dönemlerindeki gözlemlerde bu türlerin bölgeye gelişi ve konakladıkları alanlar tespit edilemediği için örnek alınamadı. Bu durum projenin 3. gelişme raporunda belirtildi ve kabul edildi.

Önerilen proje metninde bulunmamakla birlikte, havzada yapılan gözlemler ve literatür değerlendirmeleri neticesinde projeye her açıdan katkı sağlayacağı düşünülen 14 kanatlı hayvan türünden de [*Phalacrocorax carbo* (Karabatak), *Anser albifrons* (Akalınlı büyük sakarca kazı), *Anas crecca* (Çamurcun), *Anas penelope* (Fiyu), *Anas acuta* (Kılkuyruk), *Oxyura leucocephala* (Dikkuyruk), *Sterna hirundo* (Irmak sumrusu), *Anas querquedula* (Çıkrıkçı), *Sturnus roseus* (Pembe sığırcık), *Coracias garrulus* (Kuzgun), *Alectoris chukar* (Kınalı keklik), *Gallus domesticus* (Evcil tavuk), *Meleagris sp.* (Evcil hindi), *Anser anser domesticus* (Evcil kaz)] ilave olarak proje süresince dışkı örneği alındı, böylece örnek alınan kanatlı türü toplam 47 adet oldu.

Ayrıca, yine proje kapsamında olmamakla birlikte, çalışma süresince hastalık şüphesiyle çeşitli kişi ve kuruluşlarca Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirilen 6 adet karga, 2 adet tavuk, 2 adet güvercin, 1 adet karabatak ve 1 adet kaz olmak üzere toplam 12 ölü hayvan ile Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Araştırma Hastanesi, Çocuk Polikliniğine yatırılan 7 çocuktan alınıp, laboratuvarımıza gönderilen trakheal aspirat da araştırmaya dahil edilerek, RT-PCR’da incelendi.

Tablo 3: Dışkı örneklerinin toplandığı türlerin statüleri ve örnek sayıları

Statüsü	Kanatlı türü sayısı	Alınan örnek sayısı
Rastlantısal tür	1	25
Transit göçer	2	107
Kış ziyaretçisi	8	436
Göçmen	15	350
Yerli	21	992
Toplam	47	1910



Şekil 5: Örnek toplanan alanlar; 1: Arin (Sodalı) Gölü, 2: Çelebibaba Sazlığı, 3: Çaldıran, 4: Bend-i Mahi Deltası, 5: Çakırbey, 6: Karagündüz Sazlığı, 7: Erçek Gölü, 8: Anzaf, 9: Sıhke Gölü, 10: Karasu Deltası, 11: Morali Deresi, 12: Van Sazlığı, 13: Van Şehir Merkezi, 14: Havaalanı Sazlığı, 15: Edremit, 16: Dönemeç Deltası, 17: Akdamar Adası, 18: Göründü Deltası, 19: Çatak

Tablo 4: Dışkı örneklerinin toplandığı türler, statüleri ve toplanan örneklerin yıllara göre dağılımı

No	Örnek alınan tür			Yıllara göre toplanan örnek sayısı			Toplam
	Latince adı	Türkçe adı	Statüsü	2006	2007	2008	
1.	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Karabatak	RT	-	25	-	25
2.	<i>Philomachus pugnax</i>	Döğüşken kuş	TG	20	-	10	30
3.	<i>Phoenicopterus ruber</i>	Flamingo	TG	20	52	5	77
4.	<i>Cygnus cygnus</i>	Ötücü kuğu	KZ	-	60	10	70
5.	<i>Anas clypeata</i>	Kaşık gaga	KZ	40	65	-	105
6.	<i>Anser albifrons</i>	Akalınlı büyük sakarca kazı	KZ	20	-	3	23
7.	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	KZ	20	30	10	60
8.	<i>Anas penelope</i>	Fiyu	KZ	-	20	20	40
9.	<i>Aythya fuligula</i>	Tepeli patka	KZ	-	-	20	20
10.	<i>Anas acuta</i>	Kılkuyruk	KZ	-	20	15	35
11.	<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş patka	KZ / G	20	35	28	83

12.	<i>Nycticorax nycticorax</i>	Gece balıkçılı	G	19	25	-	44
13.	<i>Ciconia ciconia</i>	Akleylek	G	-	11	-	11
14.	<i>Himantopus himantopus</i>	Uzunbacak	G	20	18	10	48
15.	<i>Tringa totanus</i>	Kızılback	G	40	-	10	50
16.	<i>Vanellus vanellus</i>	Kızkuşu	G	20	14	9	43
17.	<i>Merops apiaster</i>	Arıkuşu	G	-	1	-	1
18.	<i>Oxyura leucocephala</i>	Dikkuyruk	G	-	20	-	20
19.	<i>Hirundo rustica</i>	İs (Kır) kırlangıcı	G	-	6	-	6
20.	<i>Riparia riparia</i>	Kum (Kıy) kırlangıcı	G	20	13	5	38
21.	<i>Motacilla flava feldegg</i>	Maskeli kuyruksallayan	G	-	22	5	27
22.	<i>Chlidonias leucopterus</i>	Akkanat sumru	G	-	20	-	20
23.	<i>Sterna hirundo</i>	İrmak sumrusu	G	-	20	-	20
24.	<i>Anas querquedula</i>	Çıkrıkçın	G	-	-	10	10
25.	<i>Sturnus roseus</i>	Pembe sığırcık	G	-	-	10	10
26.	<i>Coracias garrulus</i>	Kuzgun	G	-	-	2	2
27.	<i>Podiceps nigricollis</i>	Karaboyun batağan	Y	-	15	10	25
28.	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Bahri (Küçük batağan)	Y	-	13	10	23
29.	<i>Tadorna tadorna</i>	Suna	Y	20	84	-	104
30.	<i>Tadorna ferruginea</i>	Angıt	Y	20	50	21	91
31.	<i>Anas platyrhynchos</i>	Yeşilbaş ördek	Y	40	60	5	105
32.	<i>Fulica atra</i>	Sakarmeke	Y	17	80	-	97
33.	<i>Larus ridibundus</i>	Karabaş (Gülen) martı	Y	-	70	-	70
34.	<i>Larus michahellis*</i>	Van martısı	Y	40	30	19	89
35.	<i>Columba livia</i>	Kaya güvercini	Y	40	-	-	40
36.	<i>Alauda arvensis</i>	Tarlakuşu	Y	-	20	-	20
37.	<i>Motacilla alba</i>	Ak kuyruksallayan	Y	-	20	5	25
38.	<i>Pica pica</i>	Saksağan	Y	-	20	-	20
39.	<i>Corvus monedula</i>	Cüce karga	Y	-	40	-	40
40.	<i>Corvus frugilegus</i>	Ekin kargası	Y	20	-	5	25
41.	<i>Sturnus vulgaris</i>	Sığırcık	Y	20	-	5	25
42.	<i>Passer domesticus</i>	Ev serçesi	Y	25	-	-	25
43.	<i>Galerida cristata</i>	Tepeli toygar	Y	-	-	10	10
44.	<i>Alectoris chukar</i>	Kımalı keklik	Y	-	10	10	20
45.	<i>Gallus domesticus</i>	Evcil tavuk	Y	-	58	-	58
46.	<i>Meleagris sp.</i>	Evcil hindi	Y	-	25	-	25
47.	<i>Anser anser domesticus</i>	Evcil kaz	Y	40	10	5	55
Toplam				541	1082	287	1910

RT: Rastlantısal tür, TG: Transit göçer, KZ: Kış ziyaretçisi, G: Göçmen, Y: Yerli

*Projenin başlangıcından itibaren *Larus argentatus* olarak isimlendirilen bu martı türü, Kızıroğlu (2008)'de *Larus michahellis* olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle, kesin rapordaki isimlendirmede Kızıroğlu (2008) dikkate alınmıştır.

2.1.4. Referans suş: Çalışmanın tüm aşamalarında, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden temin edilen referans H5N1 suşu (A/Chicken/TR/47/Ekinlik/673/2006) kullanıldı.

2.2. Yöntem

Dışkı örneklerinden AI tip A virüslerinin tespiti ve tiplendirilmesine yönelik araştırma, aşağıdaki şekilde planlanıp gerçekleştirildi.

1. Dışkı örneklerinden viral RNA izolasyonu.
2. Viral RNA'dan cDNA sentezi.
3. RT-PCR ile AI tip A matrix protein (M2) geninin tespiti.
4. RT-PCR ile M2 pozitif bulunan örneklerin RT-PCR'da H5N1 alt tipinin belirlenmesi.
5. RT-PCR'da AI tip A pozitif bulunan örneklerden embriyolu tavuk yumurtasına ekim yapılması ve virüs izolasyonu.
6. Embriyolu tavuk yumurtalarından toplanan alantoik sıvıların HA testi ile incelenmesi.
7. HA testi ile pozitif sonuç veren allantoik sıvıların Influenza Tip A Antijen Hızlı Test Kiti (Symbiotics) ile incelenmesi.
8. AI tip A pozitif olarak tanımlanan virüslerin HI ve NI testleriyle alt tiplerinin belirlenmesi.

2.2.1. RT-PCR ve virüs izolasyon çalışmaları için dışkı örneklerinin hazırlanması:

Örnekler, -80°C'lik derin dondurucudan 4°C'ye alınarak çözündürüldü. Çözünen örnekler vorteks ile iyice homojenize edildikten sonra 1500 x g'de 5 dk santrifüj edildi ve üst sıvılar DNase–RNase free ependorf tüplerine aktarıldı. Sonraki aşamalarda bu materyal kullanıldı.

2.2.2. RT-PCR uygulamaları: RT-PCR ile M2 geninin saptanmasında Light Cycler Real Time PCR (Roche®, LC480) sistemi/cihazı kullanıldı (ANONİM, 2007e). Uygulama, ticari firmanın prosedürü doğrultusunda aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. Dışkı örneklerinden viral RNA izolasyonu.
2. Viral RNA'dan cDNA sentezi.
3. M2 geninin amplifikasyonu ve tespiti.
4. H5N1 alt tipinin belirlenmesi.

AI tip A virüslerinin RT-PCR ile analizinde aşağıdaki kitler kullanıldı:

- High Pure Viral RNA Isolation Kit (Roche[®], Cat No: 11 858 882 001) (ANONİM, 2007f).
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche[®], Cat No: 04 896 866 001) (ANONİM, 2007g).
- LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe Kit (Roche[®], Cat No: 03 003 248 001) (ANONİM, 2006b).
- LightMix[®] 480HT for the detection of influenza A virus M2 (TIB Molbiol, Cat No: 40-0277-96) (ANONİM, 2008a)
- LightMix[®] 480HT for the detection of Avian Influenza A Virus (*Subtype Asia*) H5N1 (TIB Molbiol, Cat No: 40-0311-96) (ANONİM, 2006c)

Bilgi Notu

1. RT-PCR tekniğinin test prosedüründe gösterilen tüm aşamaları her bir dışkı örneği için manuel olarak yapıldı.
2. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve okuma işlemlerinin her bir aşaması laboratuvarın UV ile sterilize edilebilen ve içerisinde steril kabin bulunan farklı bölümlerinde gerçekleştirildi.
3. Araştırmacılar çalışma süresince önlük, maske, pudrasız eldiven ve saç bonesi kullandı. Eldiven çok sık aralıklarla değiştirildi.

2.2.3. Dışkı örneklerinden viral RNA izolasyonu: Bu işlem için oda ısısında muhafaza edilen 100 testlik High Pure Viral RNA Isolation Kit (Roche[®]) kullanıldı. High Pure Viral RNA Isolation Kit içeriği:

- Binding buffer
- Poly (A)
- Inhibitor removal buffer
- Wash buffer
- Elution buffer
- High pure filtreli tüpler
- Koleksiyon tüpleri

2.2.3.1. Çalışma solüsyonlarının hazırlanması: Çalışma solüsyonları, üretici firmanın prospektüsünde önerdiği şekilde hazırlandı. Çalışma alanları öncelikle absöüt etanol ile temizlendi.

Poly (A): Liyofilize halde olan bu reagentin çözündürülmesi için 400 µl elution buffer kullanıldı. Çözdürme işlemi sonrasında her biri 50 µl'lik 8 porsiyona ayrıldı ve kullanılıncaya kadar -15 ile -25 °C arasında saklandı.

Binding buffer+poly (A): Bu solüsyon, 1 örnek için 400 µl binding buffer'a 4 µl poly A eklenmesiyle elde edildi. Karışım her zaman taze olarak hazırlanıp kullanıldı.

Inhibitor removal buffer: Bu solüsyonun üzerine 20 ml absolüt etanol eklendi ve iyice karıştırılarak kullanma solüsyonu elde edildi.

Wash buffer: 100 testlik kit kutusu içinde 2 şişe olarak bulunan bu solüsyonun her bir şişesine 40'ar ml absolüt etanol ilave edilip iyice karıştırılarak kullanıma hazır hale getirildi.

2.2.3.2. Viral RNA izolasyon prosedürü

- ◆ Örnek sayısına göre DNase - RNase free steril 1.5 ml'lik ependorf tüpleri alınarak, iki seri halinde kapaklarından numaralandırıldı.
- ◆ İlk seri tüplerin her birine 400 µl taze hazırlanmış binding buffer + poly (A) solüsyonu konuldu.
- ◆ Bu tüplerin her birine kendi numarasına uygun gelecek şekilde 200'er µl supernatant (örnek) ilave edildi.
- ◆ Ependorf tüplerin kapakları kapatılarak 10 dakika (dk) süreyle iyice karıştırıldı.
- ◆ Her bir ependorf tüpü içindeki karışımının tamamı (600 µl) koleksiyon tüpü içine yerleştirilmiş ve numaralandırılmış filtreli tüp içine aktarıldı.
- ◆ Koleksiyon tüpleri (içindeki filtreli tüplerle birlikte), 8000 x g'de 15 saniye (sn) santrifüj edildi.
- ◆ Santrifüjden çıkarılan filtreli tüplerin her biri, yeni koleksiyon tüplerinin içine konuldu.
- ◆ Filtreli tüplerin her birine 500'er µl inhibitor removal buffer eklendi.
- ◆ Koleksiyon tüpleri, 8000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
- ◆ Santrifüjden çıkarılan filtreli tüplerin her biri, yeni koleksiyon tüplerine konuldu.
- ◆ Filtreli tüplerin her birine 450'şer µl wash buffer ilave edildi.
- ◆ Koleksiyon tüpleri, 8000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.

- ◆ Santrifüjden çıkarılan filtreli tüplerin her biri, yeni koleksiyon tüplerinin içine konuldu.
- ◆ Filtreli tüplerin her birine 450'şer µl wash buffer ilave edildi.
- ◆ Koleksiyon tüpleri, 8000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
- ◆ Koleksiyon tüpleri tek tek santrifüjden çıkarılıp içerikleri döküldükten sonra aynı filtreli tüp tekrar içine konuldu ve 17.000 x g'de 10 sn santrifüj edildi.
- ◆ Santrifüjden çıkarılan filtreli tüplerin her biri, başlangıçta hazırlanan numaralandırılmış diğer seri ependorf tüplerin içine konuldu.
- ◆ Filtreli tüplerin her birine 50'şer µl elution buffer eklendi.
- ◆ Ependorf tüpleri, 8000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
- ◆ Filtreli tüpler çıkarılıp dezenfektan içeren atık kutusuna atıldı.
- ◆ 50 µl'lik saf RNA filtratı içeren ependorf tüpleri hemen kullanılacaksa +4°C'de, daha sonra kullanılacaksa -80°C'de saklandı.

2.2.4. cDNA sentezi: Viral RNA'dan, cDNA sentezi için -15 ile -25 °C arasında muhafaza edilen 100 testlik Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche®) kullanıldı.

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit içeriği:

- Transcriptor reverse transcriptase
- Transcriptor RT reaction buffer (5X)
- Protector RNase inhibitor
- Deoxynucleotide mix (dNTP)
- Random hexamer primer
- PCR grade water

2.2.4.1. cDNA sentez reagentlerinin hazırlanması

- ◆ Çalışma alanları öncelikle %100 etanol ile temizlendi.
- ◆ Reagentlar, üretici firmanın prospektüsünde önerildiği şekilde hazırlandı.
- ◆ Bunun için incelenecek örnek sayısı kadar 0.2 ml'lik steril DNase - RNase free PCR tüpü numaralandırıldı ve soğutucu bloklara yerleştirildi.

2.2.4.2. Template primer mix hazırlanması

- ◆ Karışımlar, 0.2 ml'lik DNase - RNase free PCR tüplerinde hazırlandı.
- ◆ Bir örneğin cDNA sentezini gerçekleştirmek için PCR tüpü içerisine önce 1 µl PCR grade water, ardından da 2 µl random hexamer primer aktarıldı ve pipetleyerek iyice homojenize edildi (Birden fazla örnek incelemelerinde bir PCR tüpünde incelenecek örnek sayısı kadar template primer mix hazırlandı ve test tüplerine 3'er µl transfer edildi).
- ◆ Karışım üzerine viral RNA izolasyon prosedüründe elde edilen filtrattan (total RNA) 10 µl ilave edildi ve 3-5 sefer pipetleyerek karıştırılıp spinlendi (toplam volüm 13 µl).
- ◆ Sonra PCR tüpü thermal cycler'a (Px2 Thermal Cycler, Thermo Electronic Corp., Milford, MA, ABD) yerleştirilerek 65°C'de 10 dk süreyle denatürasyon yapıldı.
- ◆ Denatürasyon işleminin son 10 saniyesinde cihaz durduruldu ve PCR tüpü hızlı bir şekilde thermal cyclerden çıkarılıp soğutucu blok içine yerleştirilerek işlem sonlandırıldı.

2.2.4.3. PCR master mix hazırlanması

- ◆ PCR master mix, 0.2 ml'lik DNase ve RNase free PCR tüpünde hazırlandı.
- ◆ Bir örnek için PCR tüpüne 2 µl deoxynucleotide mix, 4 µl transcriptor reverse transcriptase reaction buffer, 0.5 µl protector RNase inhibitor ve 0.5 µl transcriptor reverse transcriptase konuldu, 3-5 sefer pipetleyerek karıştırıldı ve spinlendi (Birden fazla örnek incelemelerinde bir PCR tüpünde incelenecek örnek sayısı kadar PCR master mix hazırlandı ve test tüplerine 7'şer µl transfer edildi).
- ◆ Bu karışımın tamamı (7 µl), denatürasyondan çıkarılan PCR tüpündeki template primer mix üzerine eklendi ve spinlendi.
- ◆ PCR Tüpü tekrar thermal cycler'e yerleştirilerek cDNA sentez protokolü uygulandı (Tablo 5).

Tablo 5: cDNA sentezinde uygulanan amplifikasyon aşamaları

Aşamalar	Isı	Süre
Step 1	25 °C	10 dk
Step 2	50 °C	60 dk
Step 3	85 °C	5 dk
Step 4	4 °C	Hold (sürekli)

- ◆ Protokol sonlandığında elde edilen cDNA'lar 1-2 saat içinde RT-PCR protokolü uygulanacaksa + 2 ile +8 °C; uzun süre bekletilecekse -15 ile -25 °C arasında saklandı.

2.2.5. RT-PCR ile avian influenza tip A matrix protein geninin (M2) tespiti: Bu işlem için LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe Kit (Roche®) ve LightMix® 480HT influenza A virus M2 (TIB molbiol) seti kullanıldı. 100 reaksiyonluk LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe Kiti -15 ile -25°C'de; 96 reaksiyonluk LightMix® 480HT influenza A virus M2 seti ise ışıktan korunarak oda ısısında (18-25°C) saklandı.

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe Kit içeriği:

- LightCycler® FastStart Enzyme
- LightCycler® FastStart Reaction Mix HybProbe (FastStart Taq DNA polimeraz, dNTP mix (dTTP yerine dUTP) reaksiyon bufferi ve 10mM MgCl₂)
- MgCl₂ stock solution, 25 mM
- H₂O, PCR-grade

LightMix® 480HT influenza A virus M2 set içeriği:

- Premixed and lyophilized primers and probes
- Internal positive control (IPC)
- 6 (10¹-10⁶) lyophilized standards (*Influenza A Virus M2* DNA)
- Sealing foil for the standard row

2.2.5.1. Karışım, standart ve reagentlerin hazırlanması

- ◆ Tüm reaktiflerin hazırlanma aşamalarında ve çalışma sürecinde enzimatik reaksiyonların kontrol altında tutulması amacıyla tüpler soğuk zinciri devam ettirmek için içerisinde kar bulunan kapta bekletildi.

- ◆ Işığın probler üzerindeki olumsuz etkisi nedeniyle tüm protokol mümkün olan en karanlık ortamda gerçekleştirildi.

2.2.5.2. LightMix® 480HT influenza A virus M2 setindeki parametre-spesifik reagentler ile internal pozitif kontrol reagentlerinin hazırlanması

- ◆ M2 primer ve probu (parametre-spesifik) ile IPC içeren 2 adet liyofilize reagent viali spinlendi.
- ◆ Işıktan korunması için vialler alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra her biri 100 µl PCR grade water ile çözdürölüp vortekslendi ve spinlendi.
- ◆ Çözeltilerden her bir 20 µl RT-PCR reaksiyonu için 1'er µl kullanıldı.
- ◆ Standartların hazırlanması için, birbirlerine bitişik seri halde 6 adet tüpte bulunan üzerleri alüminyum folyo ile kaplı liyofilize standart reagentlerin her biri 40'ar µl PCR suyu ile çözdürölüdü ve pipetlenerek karıştırıldı.
- ◆ Standartlardan 20 µl'lik bir PCR reaksiyonu için 5'er µl kullanıldı.

2.2.5.3. LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe kitindeki reagentlerin hazırlanması

- ◆ LightCycler® FastStart Reaction Mix HybProbe'dan 60 µl alınıp, LightCycler® FastStart Enzyme vialine eklenmek suretiyle FastStart Mix hazırlandı.

2.2.5.4. Avian influenza tip A virüs M2 geninin tespiti için LightCycler® reaksiyon karışımının hazırlanması

- ◆ Bir adet 1.5 ml'lik DNase - RNase free ependorf tüpü alüminyum folyo ile sarıldı ve kar içine daldırıldı.
- ◆ Bir RT-PCR reaksiyonu için ependorf tüp içine sırasıyla 8.6 µl PCR grade water, 2.4 µl Mg₂⁺ solüsyonu, 1.0 µl parametre-spesifik reagent, 1.0 µl IPC reagent ve 2.0 µl FastStart Mix eklenerek 15 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı.
- ◆ Karışım, yavaşça pipetlenerek karıştırıldı ve spinlendi.

2.2.5.5. RT-PCR pleytinin hazırlanması ve RT-PCR

- ◆ LightCycler® LC 480 cihazı için üretilen 96 kuyucuklu bir pleyt alınarak soğutucu blok üzerine yerleştirildi.

- ◆ Pleyt kuyucuklarının numaralandırma işlemi, incelenecek örnek sayısına göre önceden bir kağıt üzerinde hazırlanan 8 x 12'lik bir tablo üzerinde yapıldı.
- ◆ Her bir kuyucuğa reaksiyon karışımından 15 µl transfer edildikten sonra her örnek veya standarttan ilgili kuyucuğuna 5'er µl ilave edildi (Toplam volüm 20 µl).
- ◆ Pleytin üzeri şeffaf film ile kapatıldı ve 1500 x g'de 2 dakika santrifüj edildi.
- ◆ Pleyt, LightCycler® 480 cihazına yerleştirilip aşağıdaki protokol uygulanarak RT-PCR işlemi gerçekleştirildi (Tablo 6).
- ◆ Protokolün detection formatında M2 için 483-610 ve IPC için 483-670 filtreleri seçildi.

Tablo 6: Avian influenza tip A virüs M2 geninin RT-PCR ile tespit protokolü

	Program							
Parametre	Denatürasyon	Cycling			Melting			Cooling
Analiz modu	None	Quantification			Melting curves			None
Siklus	1	55			1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1
Hedef ısı (°C)	95	95	55	72	95	40	85	40
Süre (s:dk:sn)	00:10:00	00:00:05	00:00:15	00:00:08	00:00:30	00:01:00	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate LC480 [°C/s]	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	-	2.0
Acquisition mode	None	None	Single	None	None	None	Continu.	None
Acquisitions / °C LC480	-	-	-	-	-	-	1	-

2.2.6. RT-PCR ile avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örneklerin RT-PCR'da H5N1 alt tipinin belirlenmesi: Bu işlem için LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe Kit (Roche®) ve LightMix® 480HT for the detection of Avian Influenza A Virus (*Subtype Asia*) H5N1 (TIB molbiol) seti kullanıldı. 100 reaksiyonluk LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe Kiti -15 ile -25 °C'de; 96 reaksiyonluk LightMix® 480HT for the detection of Avian Influenza A Virus (*Subtype Asia*) H5N1 seti ise ışıktan korunarak oda ısısında (18-25°C) saklandı.

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe Kit içeriği:

- LightCycler® FastStart Enzyme
- LightCycler® FastStart Reaction Mix HybProbe (FastStart Taq DNA polimeraz, dNTP

mix (dTTP yerine dUTP) reaksiyon bufferi ve 10mM MgCl₂)

- MgCl₂ stock solution, 25 mM
- H₂O, PCR-grade

LightMix[®] 480HT for the detection of Avian Influenza A Virus (*Subtype Asia*) H5N1 set içeriği (96 reaksiyonluk):

- Premixed and lyophilized primers and hybridization probes
- 6 (10¹-10⁶) lyophilized standards (*Influenza A Virus H5N1* DNA)
- Sealing foil for the standard row

2.2.6.1. LightMix[®] 480HT for the detection of avian influenza A virus (*Subtype Asia*) H5N1 setindeki parametre spesifik reagentlerin hazırlanması

- ◆ Tüm primer ve hibridizasyon problemlerini (parametre-spesifik) içeren liyofilize reagent vialli spinlendi.
- ◆ Işıktan korunması için alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra 100'er µl PCR grade water ile çözündürülüp vortekslendi ve spinlendi.
- ◆ Çözeltiden 50 µl alınıp bir başka DNase–RNase free ependorf tüp içine aktarıldı ve üzerine 150 µl PCR grade water eklenerek karıştırıldı.
- ◆ Her bir 20 µl RT-PCR reaksiyonu için çözeltiden 4'er µl kullanıldı.
- ◆ Standartların hazırlanması için, birbirlerine bitişik seri halde 6 adet tüpte bulunan üzerleri alüminyum folyo ile kaplı liyofilize standart reagentlerin her biri 40'ar µl PCR suyu ile çözündürüldü ve pipetlenerek karıştırıldı.
- ◆ Standartlardan 20 µl'lik bir PCR reaksiyonu için 5'er µl kullanıldı.

2.2.6.2. LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe kitindeki reagentlerin hazırlanması

- ◆ LightCycler[®] FastStart Reaction Mix HybProbe'dan 60 µl alınıp LightCycler[®] FastStart Enzyme vialine eklenmek suretiyle FastStart Mix hazırlandı.

2.2.6.3. Avian influenza tip A virüs H5N1 alt tipinin tespiti için LightCycler[®] reaksiyon karışımının hazırlanması

- ◆ Bir adet 1.5 ml'lik DNase - RNase free ependorf tüpü alüminyum folyo ile sarıldı ve kar içine daldırıldı.

- ◆ Bir RT-PCR reaksiyonu için ependorf tüp içine sırasıyla 6.6 µl PCR grade water, 2.4 µl Mg_2^{+} solüsyonu, 4 µl parametre-spesifik reagent ve 2 µl FastStart Mix eklenerek 15 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı.
- ◆ Karışım, yavaşça pipetlenerek karıştırıldı ve spinlendi.

2.2.6.4. RT-PCR pleytinin hazırlanması ve RT-PCR

- ◆ LightCycler® LC 480 cihazı için üretilen 96 kuyucuklu bir pleyt alınarak soğutucu blok üzerine yerleştirildi.
- ◆ Pleyt kuyucuklarının numaralandırma işlemi, incelenecek örnek sayısına göre önceden bir kağıt üzerinde hazırlanan 8 x 12'lik bir tablo üzerinde yapıldı.
- ◆ Her bir kuyucuğa LightCycler® reaksiyon karışımından 15 µl transfer edildikten sonra her örnek veya standarttan ilgili kuyucuğuna 5'er µl ilave edildi (Toplam volüm 20 µl).
- ◆ Pleytin üzeri şeffaf film ile kapatıldı ve 1500 x g'de 2 dakika santrifüj edildi.
- ◆ Pleyt, LightCycler® 480 cihazına yerleştirilip aşağıdaki protokol uygulanarak RT-PCR işlemi gerçekleştirildi (Tablo 7).
- ◆ Protokolün detection formatında H5 için 483-640 ve N1 için 483-670 filtreleri seçildi.

Tablo 7: Avian influenza tip A virüs H5N1 alt tipinin RT-PCR ile tespit protokolü

	PROGRAM							
PARAMETRE	Denatürasyon	Cycling			Melting			Cooling
Analiz modu	None	Quantification			Melting Curves			None
Siklus	1	55			1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1
Hedef ısı (°C)	95	95	55	72	95	40	85	40
Süre (sa:da:sn)	00:10:00	00:00:05	00:00:15	00:00:10	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate LC480 [°C/s]	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	-	2.0
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Continu.	None
Acquisitions/°C LC480							1	

2.2.7. Agaroz jel elektroforez: Proje kapsamında olmamakla birlikte, RT-PCR ile AI M2 geni yönünden pozitif oldukları belirlenen PCR ürünleri agaroz jel elektroforez ile analiz edildi. M2 gen bölgesine spesifik 250 bp'lik bant ile internal kontrole spesifik 318 bp'lik

bantlar değerlendirildi.

Proje kapsamında bulunmamakla birlikte, RT-PCR’da M2 pozitif bulunan örneklerin RT-PCR ile H5N1 analizleri yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforez ile H5 gen bölgesine spesifik 161 bp ve N1 gen bölgesine spesifik 198 bp’lik bantlar yönünden incelendi.

Bu amaçla amplifiye ürünler %1.5’luk agaroz (AppliChem) jelde koşturuldu. Jelin hazırlanmasında etidium bromit (0.5 µg/ml, AppliChem) katılan 1xTBE (100 mM Tris-HCl (AppliChem), borik asit (AppliChem), EDTA (1 mM, AppliChem) (pH: 8.0) buffer kullanıldı. Hazırlanan jel, yatay mini DNA jel elektroforez sistemine (CLP, Model 75.710, England) yerleştirilerek, örnekler (3 µl gel loading solüsyonu + 5 µl örnek) çukurlara yüklenip, 100 voltta (CLP, Model 300, England) koşturuldu. Oluşan bantların molekül ağırlıklarını saptamak amacıyla, standart markerdan (GeneRuler 100bp DNA Ladder, Fermentas, Hilden, Germany) yararlanıldı. Jelin görüntülenmesi ve bantların yorumlanması, bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde (Spectronics Co., Model GL-5000, İngiltere) gerçekleştirildi (STARICK ve ark., 2000; SAMBROOK ve RUSSELL, 2001; VARICH ve ark., 2008).

2.2.8. Embriyolu tavuk yumurtalarına inokulasyon: Araştırmanın bu aşaması, avian influenza yönünden ulusal referans laboratuvarımız olan Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde gerçekleştirildi. Bu amaçla 9-11 günlük, SPF özellikteki embriyolu tavuk yumurtaları kullanıldı. Öncelikle, yumurtalarda hava kamaralarının sınırları belirlendi. Bölge iyotlu dezenfektanla ardından da %70’lik etanol ile temizlendi. Yumurta kabuğu uygun büyüklükte delindi ve 22 numaralı enjektör ile RT-PCR ile avian influenza tip A yönünden pozitif bulunan dışkı örneklerinin her birinden hazırlanan 100’er µl’lik inokulum, yumurtaların allantoik boşluğuna inokule edildi. Çalışmada her bir örnek için 5 adet embriyolu tavuk yumurtası kullanıldı. İnokulasyon bölgesi mühür mumu ile kapatıldıktan sonra yumurtalar, 35–37°C’de 24, 48 ve 72. saatlerde canlılık kontrolleri yapılarak inkübe edildi. Bu sürelerin sonunda embriyoları ölen yumurtalar +4°C’de 4-12 saat bekletildi. Yumurtalar açılarak allantoik sıvıları tek kullanımlık pastör pipetleriyle 10 ml’lik steril falkon tüplere toplandı ve embriyolar makroskopik olarak incelendi. Embriyolarda hemoraji, gelişmede gerileme ve allantoik sıvıda artış görülmesi pozitif olarak değerlendirildi. Üç gün içerisinde embriyoları ölmeyen yumurtalar, +4°C’de 4-12 saat bekletilerek embriyoların ölmeleri sağlandı, aynı şekilde allantoik sıvıları toplandı ve makroskopik muayeneleri yapıldı. Bir yumurtadaki allantoik sıvı miktarı az olduğu durumlarda her örnek için inokule edilen 5

yumurtanın tüm allantoik sıvıları aynı tüpte toplandı. Allantoik sıvılar 3000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi ve +4°C’ de 30 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda toplanan allantoik sıvılara %1’lik tavuk eritrositleri ile lam HA testi yapıldı. Hem HA negatif ve hem de pozitif olan allantoik sıvılar tekrar 5’er adet embriyolu tavuk yumurtalarına ekilerek, 2. ve 3. pasajları yapıldı (WHO, 2002).

2.2.9. Hemagglütinasyon testi (HA): Test, lam ve mikro hemagglütinasyon olarak 2 şekilde yapıldı.

2.2.9.1. Lam hemagglütinasyon testi: Lam hemagglütinasyon testi için, temiz bir lam üzerine bir damla %1’lik yıkanmış tavuk eritrositi damlatıldı, yanına bir damla allantoik sıvıdan konuldu ve karıştırıldı. Bir dakika içerisinde agglütinasyonun görülmesi pozitif, görülmemesi negatif olarak değerlendirildi (ARDA ve ark., 2002).

2.2.9.2. Mikro hemagglütinasyon testi: Mikro hemagglütinasyon testi “V” tabanlı 96 çukurlu mikroplyetlerde (Greiner) yapıldı.

- ◆ Mikroplyetin A, B, C, D, E, F ve G serilerinin tüm kuyucuklarına 25 µl 0.1 M PBS (pH 7.2) konuldu. A, B, C, D, E ve F serilerinin ilk kuyucuklarına, 25 µl allantoik sıvı (AI şüpheli antijen) konuldu ve log₂ tabanına göre çift katlı dilüe edildi.
- ◆ Her pleytin G serisinin ilk kuyucuğuna newcastle yönünden kontrol amacıyla, 25 µl bilinen newcastle antijeni konularak log₂ tabanına göre çift katlı sulandırıldı.
- ◆ Her pleytin H serisine eritrosit kontrolü amacıyla 50 µl 0.1 M PBS (pH 7.2) konuldu.
- ◆ Pleytlerin tüm kuyucuklarına 25 µl %1’lik yıkanmış tavuk eritrositi eklendi.
- ◆ Pleytler oda ısısında 30 dk (ortam ısı 25°C’den yüksek olduğunda +4°C’de 60 dk) bekletildi ve sonuçlar değerlendirildi.
- ◆ İnkübasyonu takiben pleyt, hafifçe eğimli tutularak gözyaşı tarzındaki akıntının oluşup oluşmadığı gözlemlendi. Eritrositlerin dantela şeklinde aglütine olduğu son dilüsyon 1 hemagglütinasyon ünitesi (1 HAÜ) olarak kabul edildi. Bu şekilde hem virüsün HA özelliği saptandı hem de HI testinde kullanılacak antijenin titresi belirlendi.
- ◆ HI testinde 4 HAÜ virüs kullanıldı (WHO, 2002; OIE, 2008).

2.2.10. Avian influenza virüs tip A antijeninin hızlı test kiti ile tespiti: Bu işlem rapid immuno-migration esasına göre üretilmiş olan hızlı test kiti (Avian influenza virus type A antigen test kit, Symbiotics Corporation, USA) kullanılarak yapıldı (Fotoğraf 7).

Test stripleri içeriğinde bulunan avian influenza tip A virüsünün p56 nükleoproteinine spesifik olan antikorların antijenle bağlanma sonrası gerçekleşen göç sonrasında, sekonder antikorların bu komplekse bağlanarak gözle görülür renk değişikliği oluşturması prensibi ile çalışmaktadır.

Test, üretici firmanın önerileri doğrultusunda prospektüsüne uygun olarak gerçekleştirildi (ANONİM, 2008b). Bu amaçla, kit içeriğinde bulunan test tüpüne 8 damla (yaklaşık 250 µl) ekstraksiyon buffer eklendi. Embriyolu tavuk yumurtalarından toplanan allontoik sıvıya batırılan steril swap, test tüpü içerisine daldırılarak 5-10 kez karıştırıldı. Swap, tüpün kenarına bastırılarak sıvının tüp içerisine akması sağlandı ve dezenfektan içeren bir kavanoza atıldı. Test stripi, işaretli kısmından tutularak tüp içerisindeki sıvıya daldırıldı. Bu şekilde 15 dakika süreyle oda ısısında inkübe edildikten sonra stripin kontrol (C) ve test (T) bölümlerinin her birinde pembe renkli bant oluşması pozitif, sadece kontrol kısmında pembe bant görülmesi ise negatif olarak değerlendirildi.



Fotoğraf 7: Avian influenza virüs tip A antijen test kiti

2.2.11. Hemagglütinasyon inhibisyon (HI) testi ile tiplendirme: İzole edilen ve AI pozitif bulunan virüslerin hemagglütinin alt tipleri; hem Veterinary Laboratories Agency, VLA (Weybridge, İngiltere) hem de Avian Influenza OIE/FAO Reference Laboratory, IZSV (Padova, İtalya)'den sağlanan antiserumlarla (H1-H16) belirlendi. Weybridge'den sağlanan antiserumlar kullanılarak yapılan tiplendirme Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında, Padova'dan temin edilen antiserumlarla yapılan tiplendirme ise Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde gerçekleştirildi. Her iki laboratuvarın sonuçları karşılaştırıldı ve karşılıklı olarak teyit edildi. Kullanılan antiserumlara ait detaylar tablo 8 ve 9'da verildi.

Tablo 8: Veterinary Laboratory Agency, VLA (Weybridge, İngiltere)’den sağlanan antiserumlar (H1-H16)

HA	Alt tip	İzolat
H1	H1N1	A/DK/ALB/35/76
H2	H2N3	A/DK/Germ/1215/73
H3	H3N2	A/TKY/Eng/69
H4	H4N6	A/DK/Czech/E6
H5	H5N1	A/ck/Scot/59
H6	H6N8	A/OST/rsa/946/98
H7	H7N7	A/tsky/Eng/647/77
H8	H8N4	A/tk/ONT/618/68
H9	H9N2	A/tsky/WISC/1/66
H10	H10N9	A/S.Africa/Eg.Goose/238/98
H11	H11N9	A/Duck/Memphis/546/74
H12	H12N5	A/Duck/Alberta/60/76
H13	H13N6	A/Gull/Maryland/704/77
H14	H14N6	A/Mall/Gurg/244/82
H15	H15N6	A/Shearwater/WA/2576/79
H16	H16N3	A/Gull/Denmark/68110/02

Tablo 9: Avian Influenza OIE/FAO Reference Laboratory, IZSV’den (Padova, İtalya) sağlanan antiserumlar (H1-H15)

HA	Alt tip	İzolat
H1	H1N1	A/Duck/It/1447/05
H2	H2N3	A/Dk/Germ/1215/73
H3	H3N8	A/Psitt/It/2873/00
H4	H4N8	A/Cockatoo/Eng/72
H5	H5N9	A/ck/Italy/22A/98
H5	H5N3	A/Duck/It/775/04
H5	H5N2	A/Turk/Eng/28/73
H6	H6N2	A/Ty/Canada/65
H7	H7N1	A/ck/It/1067/V99
H7	H7N3	A/ty/It/9289/V02
H7	H7N7	A/ck/nl/2586/2003
H8	H8N4	A/turk/ONT/6118/68
H9	H9N2	A/ty/Wis/66
H10	H10N1	A/Ostrich/SA/01
H11	H11N9	A/Duck/Memphis/546/174
H12	H12N5	A/Duck/Alberta/60/76
H13	H13N6	A/gull/Maryland/704/77
H14	H14N5	A/Mallard/Gurjev/263/82
H15	H15N6	A/Shear water/Aut/2576/79

- ◆ Hemaglütinasyon inhibisyon testi “V” tabanlı 96 çukurlu mikropleytlerde (Greiner) yapıldı.
- ◆ Mikropleytin A, B, C, D, E, F ve G serilerinin tüm kuyucuklarına 25 µl 0.1 M PBS (pH: 7.2) konuldu.
- ◆ A, B, C, D, E ve F serilerinin ilk gözlerine 25 µl AI tip A H alt tiplerine ait pozitif antiserumlar (H1-H16) konuldu ve log₂ tabanına göre çift katlı dilüe edildi.
- ◆ Newcastle yönünden kontrol amacıyla her pleytin G serisinin ilk gözüne, 25 µl newcastle pozitif antiserum konuldu ve log₂ tabanına göre çift katlı dilüe edildi.
- ◆ Eritrosit kontrolü amacıyla her pleytin H serisine 50 µl 0.1 M PBS (pH:7.2) konuldu.
- ◆ Pleytin tüm kuyucuklarına 25 µl AI 4 HAÜ antijen konuldu.
- ◆ Pleytler oda ısısında 30 dk (ortam ısısı 25°C’den yüksek olduğunda +4°C’de 60 dk) bekletildi.
- ◆ Bu süreyi takiben tüm kuyucuklara 25 µl %1’lik yıkanmış tavuk eritrositi konularak aynı şekilde inkübe edildi ve sonuçlar değerlendirildi. Böylece çalışmada izole edilen suşların hangi hemaglütinin (H1-H16) alt tipinden olduğu belirlendi.
- ◆ İnkübasyonu takiben pleyt, hafifçe eğimli tutularak gözyaşı tarzındaki akıntının oluşup oluşmadığı gözlenerek son gözyaşı şeklindeki akıntının olduğu dilüsyon, izolatin HI titresi olarak kabul edildi (WHO, 2002; OIE, 2008).

2.2.12. Neuraminidaz inhibisyon (NI) testi

2.2.12.1. Test için gerekli antiserum, kimyasal madde ve solüsyonlar: NI testinde Veterinary Laboratories Agency, VLA (Weybridge, İngiltere)’den sağlanan antiserumlar (N1-N9) kullanıldı. İşlem Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Kullanılan antiserumlara ait detaylar tablo 10’da gösterildi.

Tablo 10: Veterinary Laboratory Agency, VLA (Weybridge, İngiltere)’dan sağlanan antiserumlar (N1-N9)

NA	Alt tip	İzolat
N1	H1N1	A/DK/ALB/35/76
N2	H9N2	A/TKY/WISC/1/66
N3	H5N3	(A/TEAL/Eng/7394-2805/06)
N4	H8N4	(A/TK/ONT/61118/68)
N5	H12N5	(A/Duck/Alberta/60/76)
N6	H13N6	(A/Gull/Maryland/704/77)
N7	H10N7	(A/CK/Germ/N/49)
N8	H6N8	(A/OST/RSA/946/98)
N9	H9N9	(A/KNOT/Eng/SW497/2002)

- **0.1M PBS (pH:5.9)**
 - 250 ml distile su içinde 3.05 gr Na_2HPO_4 çözdürüldü.
 - 500 ml distile su içinde 6 gr NaH_2PO_4 çözdürüldü.
 - Na_2HPO_4 çözeltisi NaH_2PO_4 üzerine pH: 5.9 oluncaya kadar yavaşça ilave edildi.
 - Kullanıncaya kadar 2-8 °C arasında saklandı.
- **0.125 N H_2SO_4 içerisinde 0.025 M sodium periodate**
 - 2.67 g sodium periodate, 1.75 ml H_2SO_4 içeren 500 ml distile suda çözdürüldü.
 - Hazırlandıktan sonra 2-8°C’de saklandı.
- **0.5 N HCl içerisinde %2 sodium arsenite**
 - Hazırlandıktan sonra oda ısısında saklandı.
- **0.1 M Thiobarbituric asit (pH:9.0) (TBA)**
 - 14.4 g thiobarbituric asit 800 ml distile suda çözdürüldü.
 - pH: 9.0 oluncaya kadar NaOH solusyonu eklendi.
 - Distile su ile 1 litreye tamamlandı.
 - Hazırlandıktan sonra 2-8°C’de saklandı.
- **Standardize fetuin**
 - 1 g fetuin 900 ml distile suda çözdürüldü ve 1 litreye tamamlandı.
 - Solusyon hazırlandıktan sonra -20°C’de saklandı.

2.2.12.2. Testin yapılışı

- ◆ Testte kullanılacak 9 adet neuraminidaz alt tip antiserum ve negatif serum 0.1 M PBS (pH: 5.9) ile 1/10 oranında sulandırıldı.
- ◆ Allantoik sıvı (virüs süspansiyonu), 0.1 M PBS (pH: 5.9) ile 1/20 oranında sulandırıldı.
- ◆ Her bir alt tip ve kontroller için 20 ml'lik 11 adet kapaklı tüp hazırlandı ve numaralandırıldı (N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, 10 virüs ve 11 blank).
- ◆ İlk tüpe sulandırılmış N1 antiserumundan 100 µl eklendi. 2 nolu tüpe N2 antiserumu, 3 nolu tüpe N3 şeklinde devam edilerek, N9'a kadar bu işlem yapıldı.
- ◆ 10 nolu (virüs) tüpe 100 µl 0.1 M PBS (pH: 5.9) konuldu.
- ◆ 11 nolu (blank) tüpe ise 200 µl 0.1 M PBS (pH: 5.9) konuldu.
- ◆ 11 nolu tüp hariç tüm tüplere 100'er µl 1/20 oranında sulandırılmış allantoik sıvı eklendi ve tüpler, karışımın homojen olması için yavaşça çalkalandıktan sonra oda ısısında (18-30°C) 20 dk inkübe edildi.
- ◆ Substrat olarak hazırlanan standardize fetuin solüsyonundan tüm tüplere 300'er µl ilave edildi ve karışımın homojen olması için yavaşça çalkalandı.
- ◆ Tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra 37°C'de bir gece inkübe edildi.
- ◆ Bu süre sonunda tüm tüplere 200'er µl 0.125 N H₂SO₄ ile hazırlanmış 0.025 M sodium periodate ilave edildi ve hafifçe çalkalandıktan sonra 37°C'de 30 dk inkübe edildi.
- ◆ Inkübasyon sonrası her tüpe 200'er µl 0.5 N HCl ile hazırlanmış %2'lik sodium arsenite eklendi. Oluşan kahverengi renk (Fotoğraf 8), tüpler yavaşça çalkalanarak berraklaştırıldı.
- ◆ Her bir tüpe 2'şer ml 0.1 M thiobarbiturik asit (pH: 9.0) ilave edildi ve hafifçe çalkalandı.
- ◆ Tüm tüpler kaynar haldeki su banyosuna yerleştirildi ve tüplerdeki solüsyonun rengi pembe renge dönünceye kadar maksimum 7 dk bekletildi ve sonuçlar değerlendirildi.



Fotoğraf 8: Neuraminidaz inhibisyon testinde tüplere sodium arsenit eklenmesinden sonra kahverengi renk oluşumu

2.2.12.3. Değerlendirme

- ◆ Tüplerin herhangi birinde solüsyon pembe renge dönmüşse inhibisyon gerçekleşmediğinden o alt tip neuraminidaz negatif olarak değerlendirildi.
- ◆ Pembe renk oluşmayan açık renkli (şeffaf) tüpte inhibisyon gerçekleşmiş olduğundan, virüs, neuraminidaz bakımından o alt tip olarak değerlendirildi.
- ◆ 10 nolu (virüs) tüpteki solüsyonların pembe renkli; 11 nolu (blank) tüpteki solüsyonun ise berrak olması beklendi.
- ◆ Tiplendirilemeyen (pembe renk oluşan) allantoik sıvıların 1/10 oranında yoğunlaştırılmış yeni dilüsyonları yapıldı ve test aynı şekilde tekrar edildi (WHO, 2002; OIE, 2008).

2.2.13. Örneklerin imha edilmesi: Araştırmada kullanılan dışkı örneklerinin incelemeleri tamamlandıktan sonra, disposable materyalleri içeren tüm artık ürünler, Van Çimento Fabrikasının yakma fırınlarında imha edildi.

3. BULGULAR

3.1. Avian influenza tip A M2 RT-PCR sonuçları: Araştırma kapsamında Van Gölü Havzasındaki rastlantısal, transit göçer, kış ziyaretçisi, göçmen ve yerli 47 kanatlı hayvan türünden sağlanan toplam 1910 dışkı materyali avian influenza tip A M2 geni yönünden RT-PCR ile incelendi. İncelenen 1910 dışkı örneğinin 51'i (%2.7) RT-PCR'da pozitif bulundu (Tablo 11, Şekil 6a-6k).

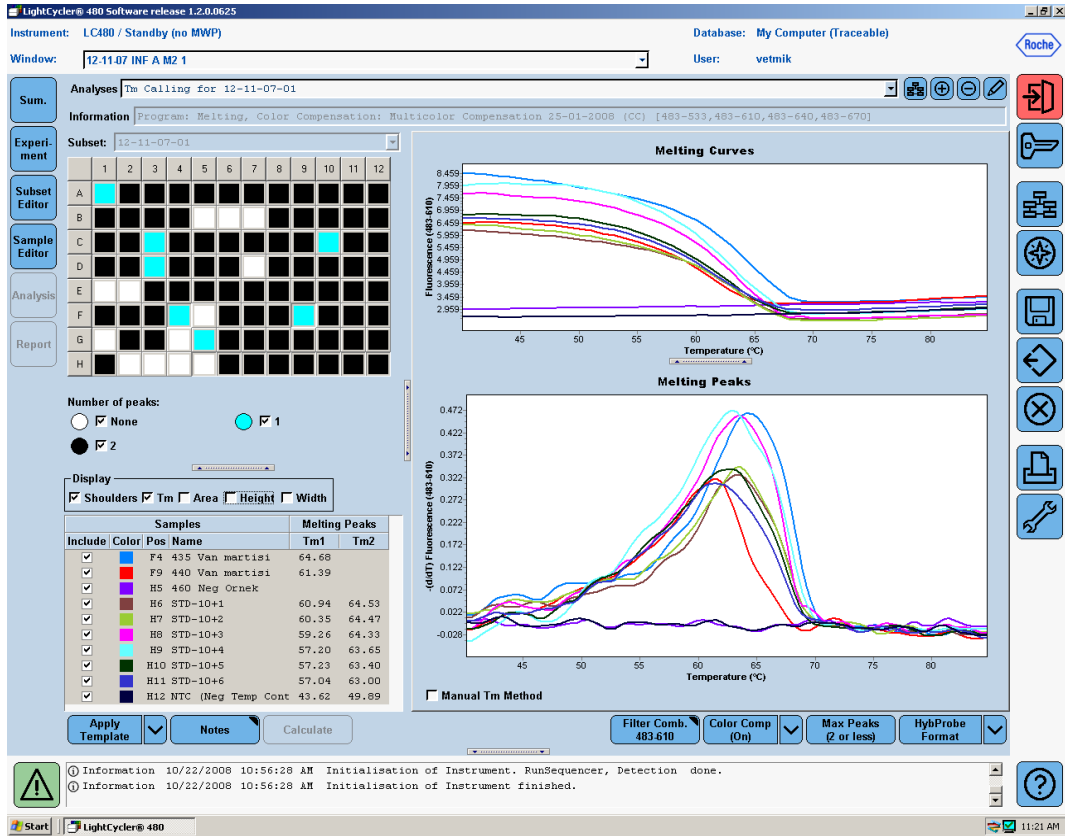
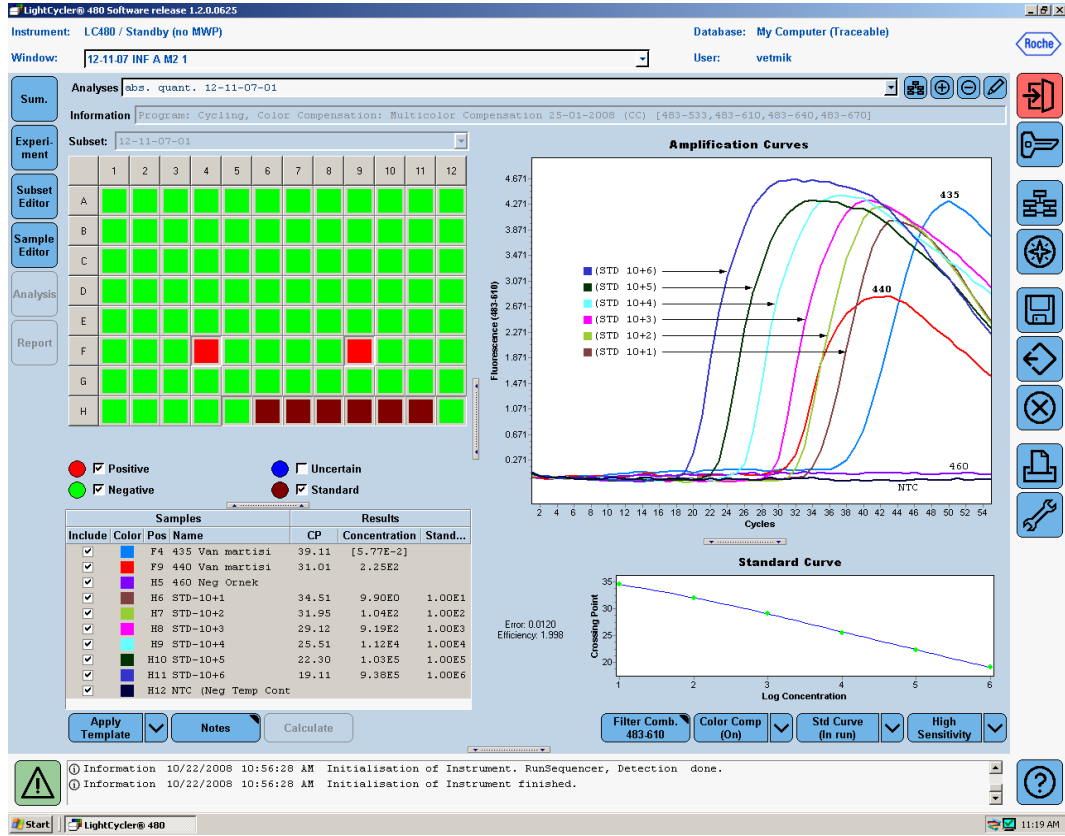
Proje süresince sulak alanlar ve göl kıyılarına bitişik yerleşim yerlerinin tamamında, evcil kanatlılar ile diğer kanatlıların temas halinde olduğu ve aynı mekânı kullandıkları gözlemlendi. Aynı zamanda, yerleşim yerlerinin tümünde martıların çöplükleri beslenme amacıyla kullandığı tespit edildi.

Tablo 11: Örnek alınan kanatlı türleri, statüleri, alınan örnek sayıları ve RT-PCR'da AI tip A M2 pozitif olan örneklerin dağılımı

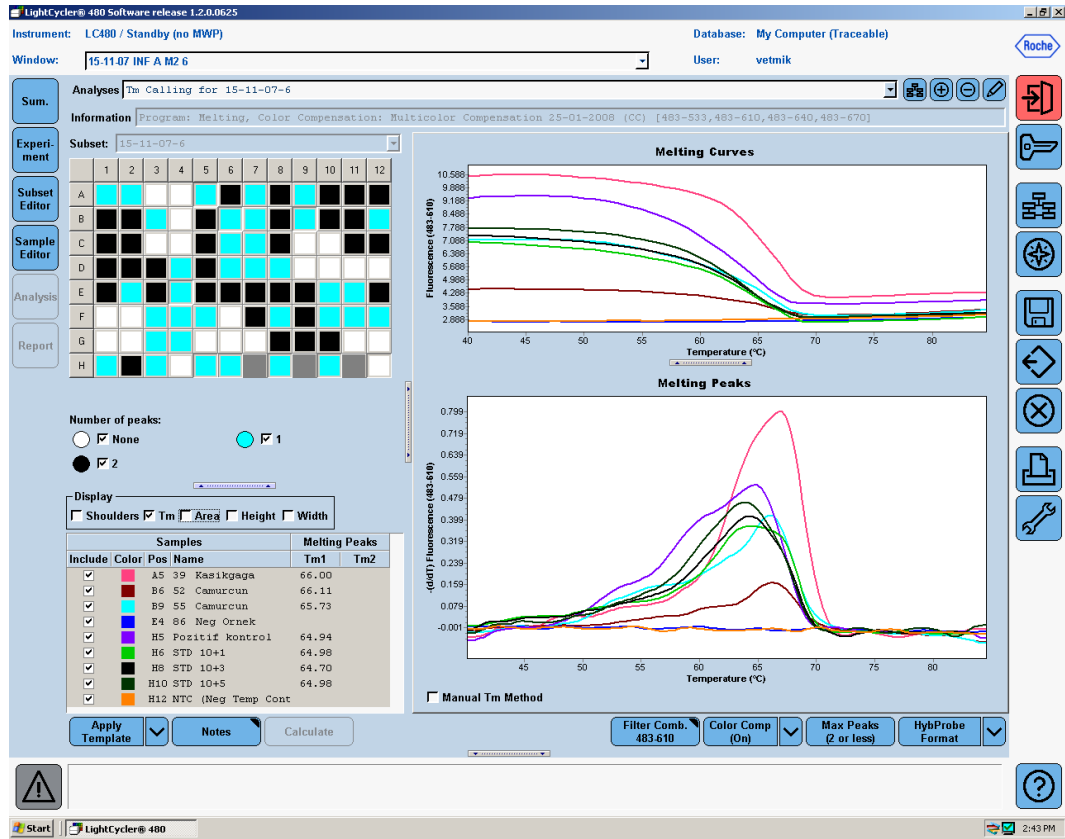
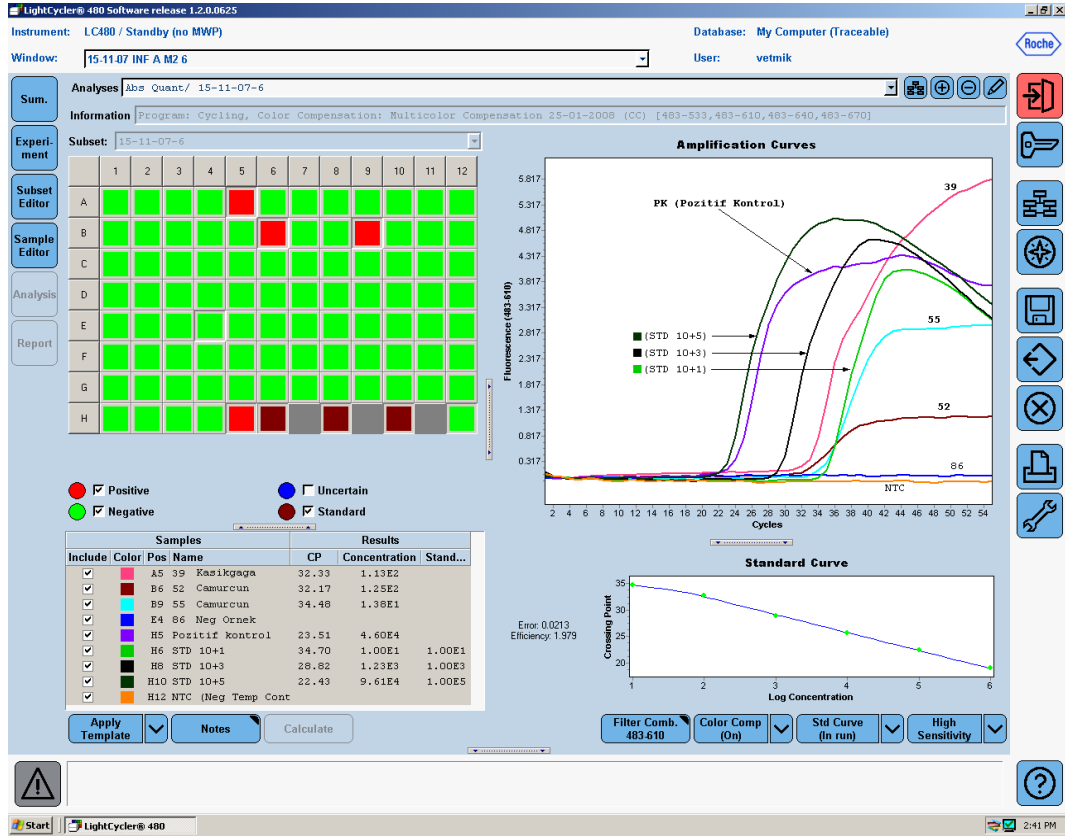
No	Örnek alınan tür			Alınan örnek sayısı	RT-PCR'da pozitif örnek sayısı (%)
	Latince adı	Türkçe adı	Statüsü		
1	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Karabatak	RT	25	0
2	<i>Philomachus pugnax</i>	Döğüşken kuş	TG	30	0
3	<i>Phoenicopterus ruber</i>	Flamingo	TG	77	1 (1.3)
4	<i>Cygnus cygnus</i>	Ötücü kuğu	KZ	70	0
5	<i>Anas cylpeata</i>	Kaşıkgaga	KZ	105	5 (4.8)
6	<i>Anser albifrons</i>	Akalınlı büyük sakarca kazı	KZ	23	0
7	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	KZ	60	6 (10)
8	<i>Anas penelope</i>	Fiyu	KZ	40	9 (22.5)
9	<i>Aythya fuligula</i>	Tepeli patka	KZ	20	2 (10)
10	<i>Anas acuta</i>	Kılkuyruk	KZ	35	13 (37.1)
11	<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş patka	KZ / G	83	3 (3.6)
12	<i>Nycticorax nycticorax</i>	Gece balıkçılı	G	44	0
13	<i>Ciconia ciconia</i>	Akleylek	G	11	0
14	<i>Himantopus himantopus</i>	Uzunbacak	G	48	2 (4.2)
15	<i>Tringa totanus</i>	Kızılacak	G	50	1 (2)
16	<i>Vanellus vanellus</i>	Kızkuşu	G	43	0
17	<i>Merops apiaster</i>	Arıkuşu	G	1	0
18	<i>Oxyura leucocephala</i>	Dikkuyruk	G	20	0
19	<i>Hirundo rustica</i>	İs (Kır) kırlangıcı	G	6	0
20	<i>Riparia riparia</i>	Kum (Kıyı) kırlangıcı	G	38	0
21	<i>Motacilla flava feldegg</i>	Maskeli kuyruksallayan	G	27	0

22	<i>Chlidonias leucopterus</i>	Akkanat sumru	G	20	0
23	<i>Sterna hirundo</i>	İrmak sumrusu	G	20	0
24	<i>Anas querquedula</i>	Çıkırıkçın	G	10	1 (10)
25	<i>Sturnus roseus</i>	Pembe sığırcık	G	10	0
26	<i>Coracias garrulus</i>	Kuzgun	G	2	0
27	<i>Podiceps nigricollis</i>	Karaboyun batağan	Y	25	0
28	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Bahri (Küçük batağan)	Y	23	0
29	<i>Tadorna tadorna</i>	Suna	Y	104	1 (1)
30	<i>Tadorna ferruginea</i>	Angıt	Y	91	0
31	<i>Anas platyrhynchos</i>	Yeşilbaş ördek	Y	105	3 (2.9)
32	<i>Fulica atra</i>	Sakarmeke	Y	97	0
33	<i>Larus ridibundus</i>	Karabaş (Gülen) martı	Y	70	1 (1.4)
34	<i>Larus michahellis</i>	Van martısı	Y	89	3 (3.4)
35	<i>Columba livia</i>	Kaya güvercini	Y	40	0
36	<i>Alauda arvensis</i>	Tarlakuşu	Y	20	0
37	<i>Motacilla alba</i>	Ak kuyruksallayan	Y	25	0
38	<i>Pica pica</i>	Saksağan	Y	20	0
39	<i>Corvus monedula</i>	Cüce karga	Y	40	0
40	<i>Corvus frugilegus</i>	Ekin kargası	Y	25	0
41	<i>Sturnus vulgaris</i>	Sığırcık	Y	25	0
42	<i>Passer domesticus</i>	Ev serçesi	Y	25	0
43	<i>Galerida cristata</i>	Tepeli toygar	Y	10	0
44	<i>Alectoris chukar</i>	Kıvalı keklik	Y	20	0
45	<i>Gallus domesticus</i>	Evcil tavuk	Y	58	0
46	<i>Meleagris sp.</i>	Evcil hindi	Y	25	0
47	<i>Anser anser domesticus</i>	Evcil kaz	Y	55	0
Toplam				1910	51 (2.7)

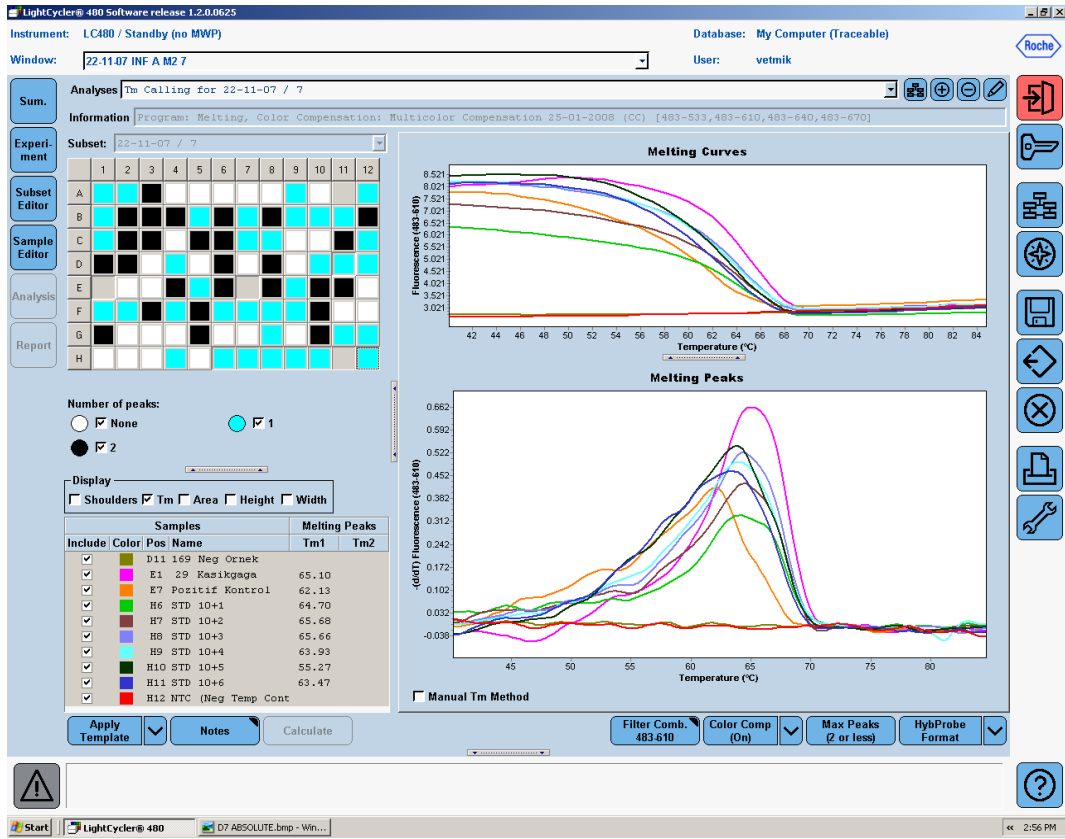
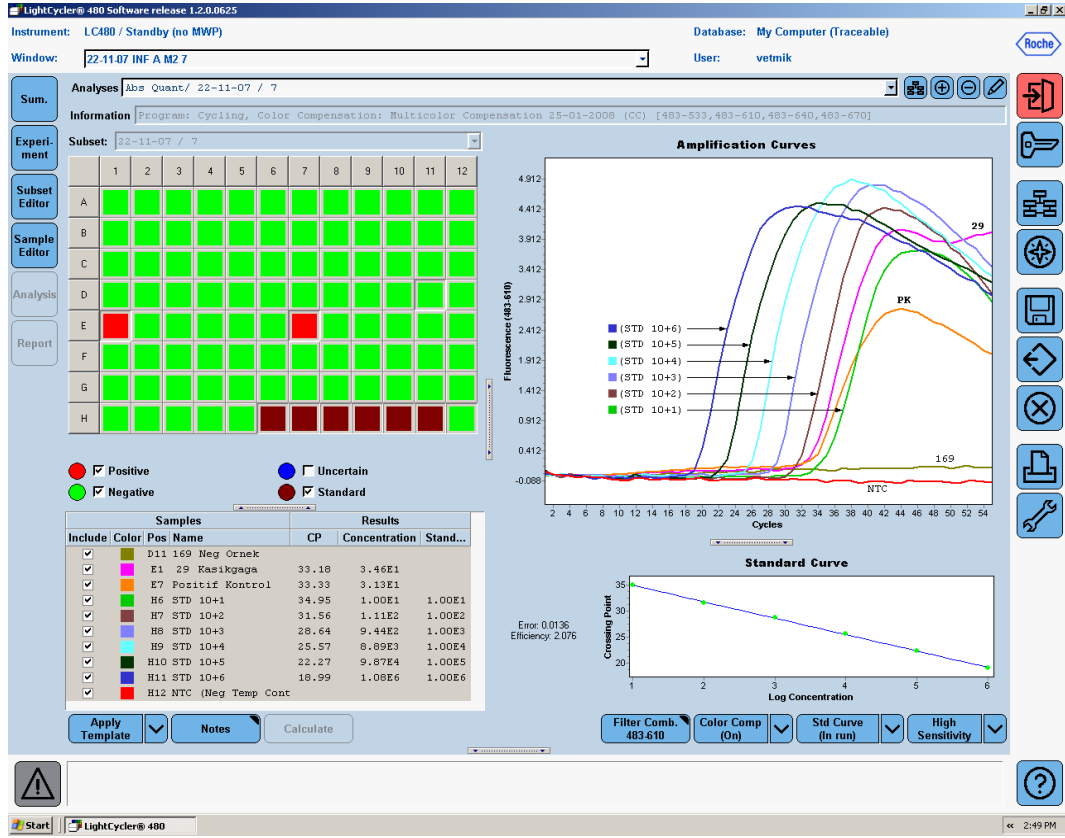
RT: Rastlantısal tür, **TG:** Transit Göçer, **KZ:** Kış Ziyaretçisi, **G:** Göçmen, **Y:** Yerli



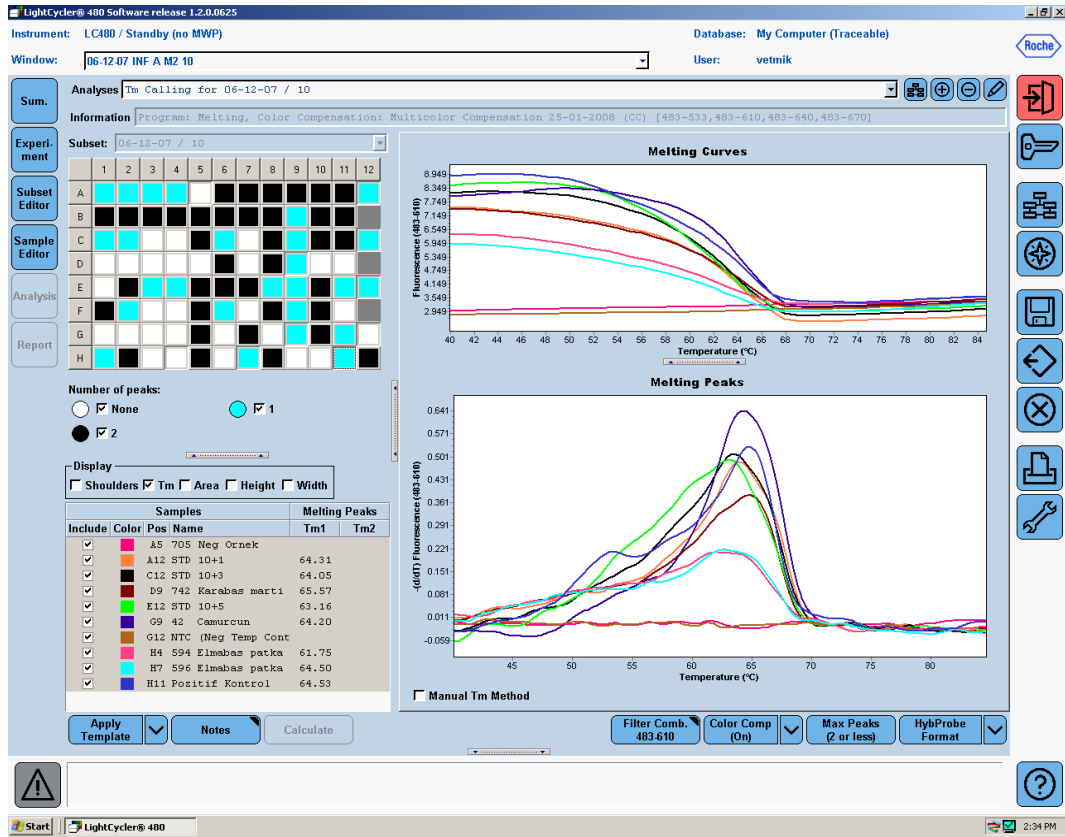
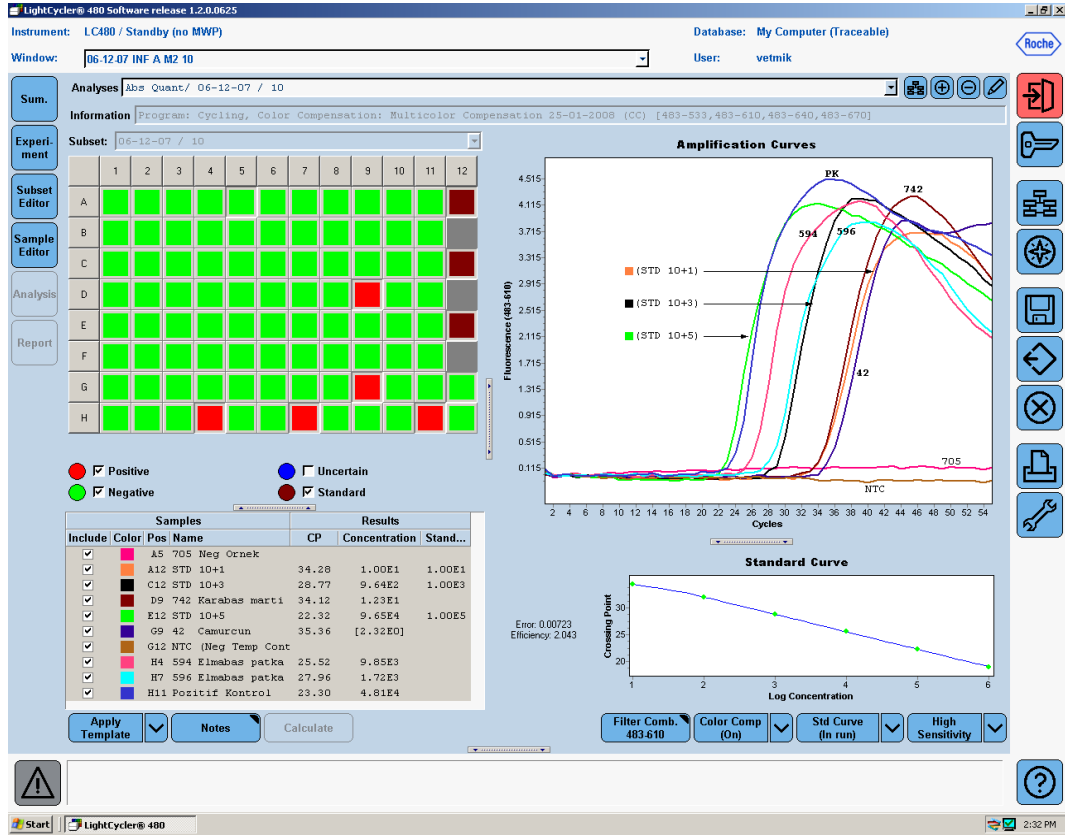
Şekil 6a: RT-PCR’da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler



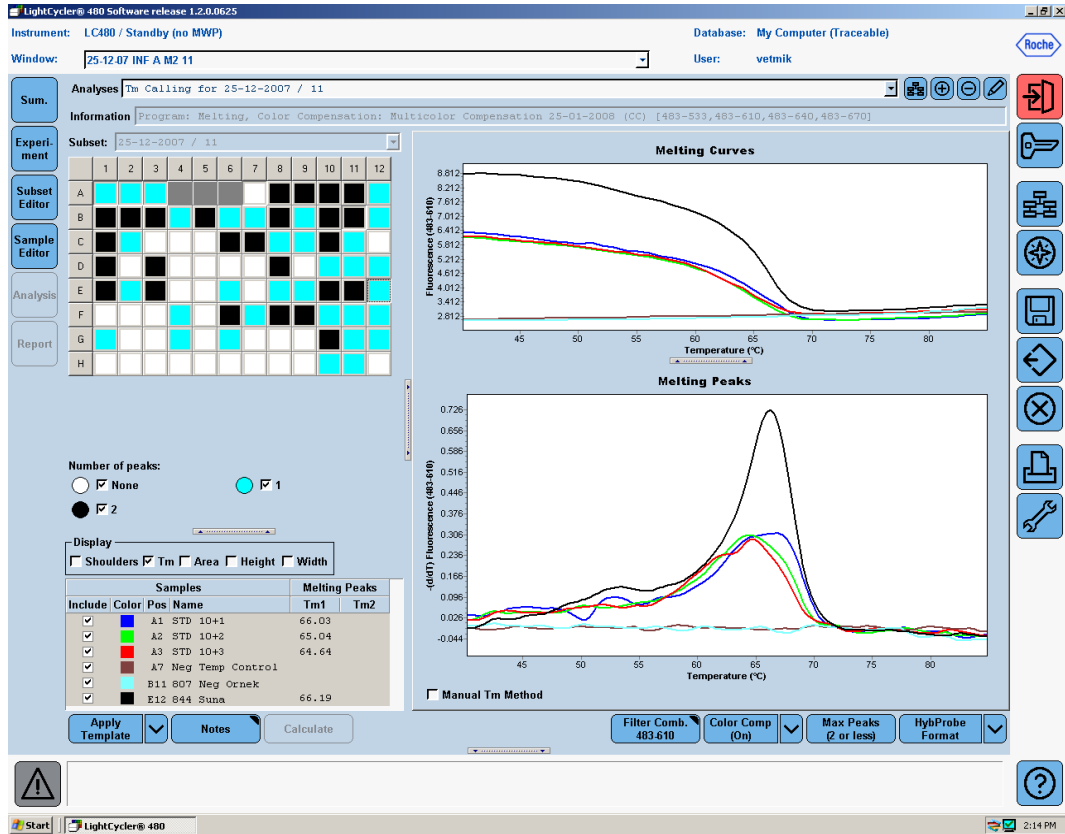
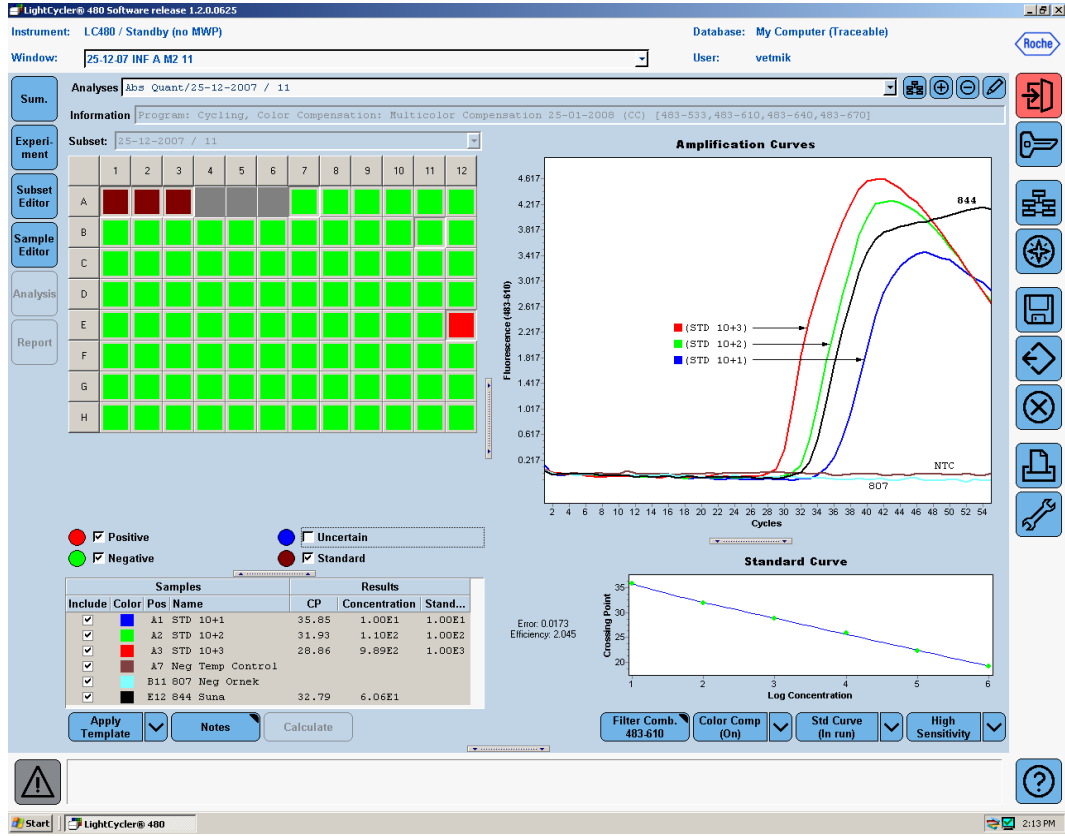
Şekil 6b: RT-PCR’da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler



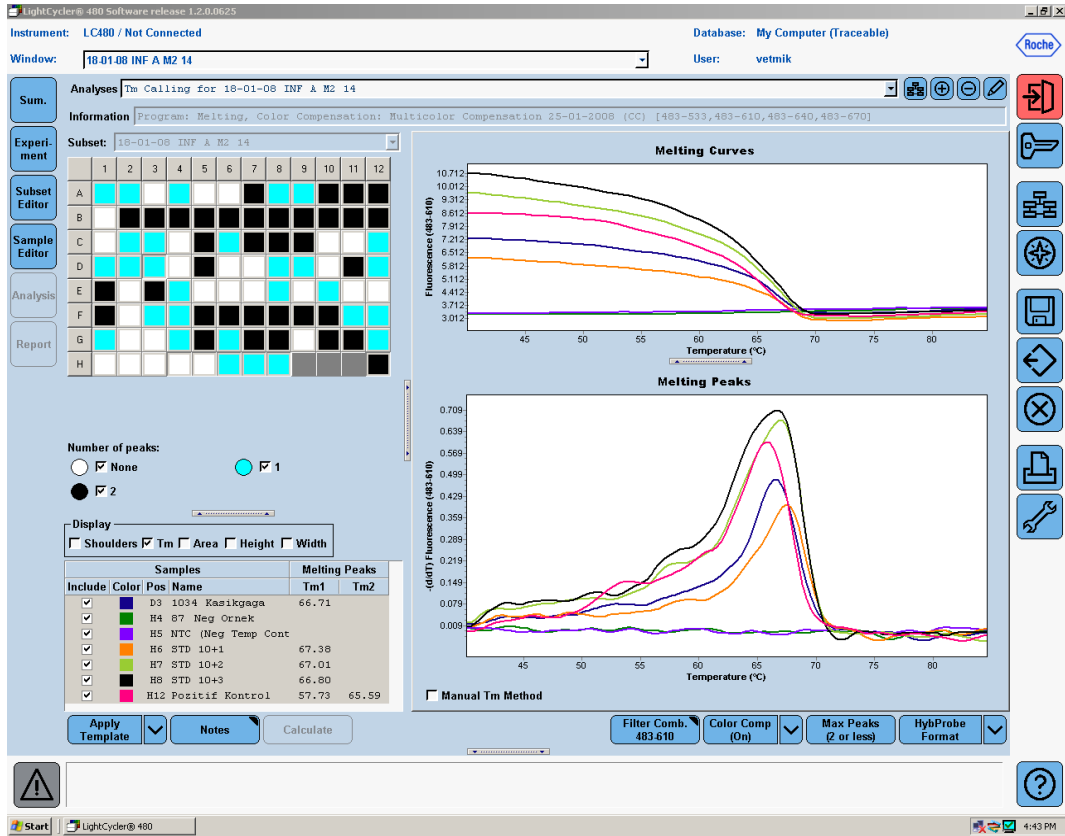
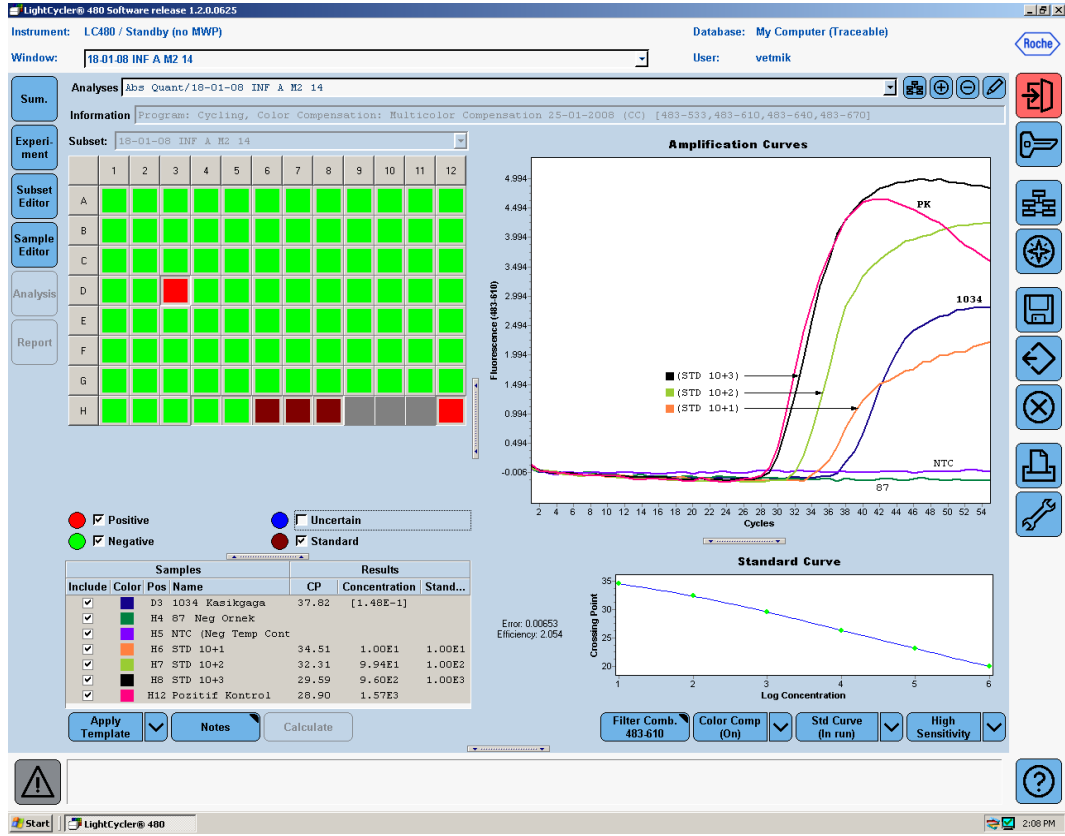
Şekil 6c: RT-PCR'da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler



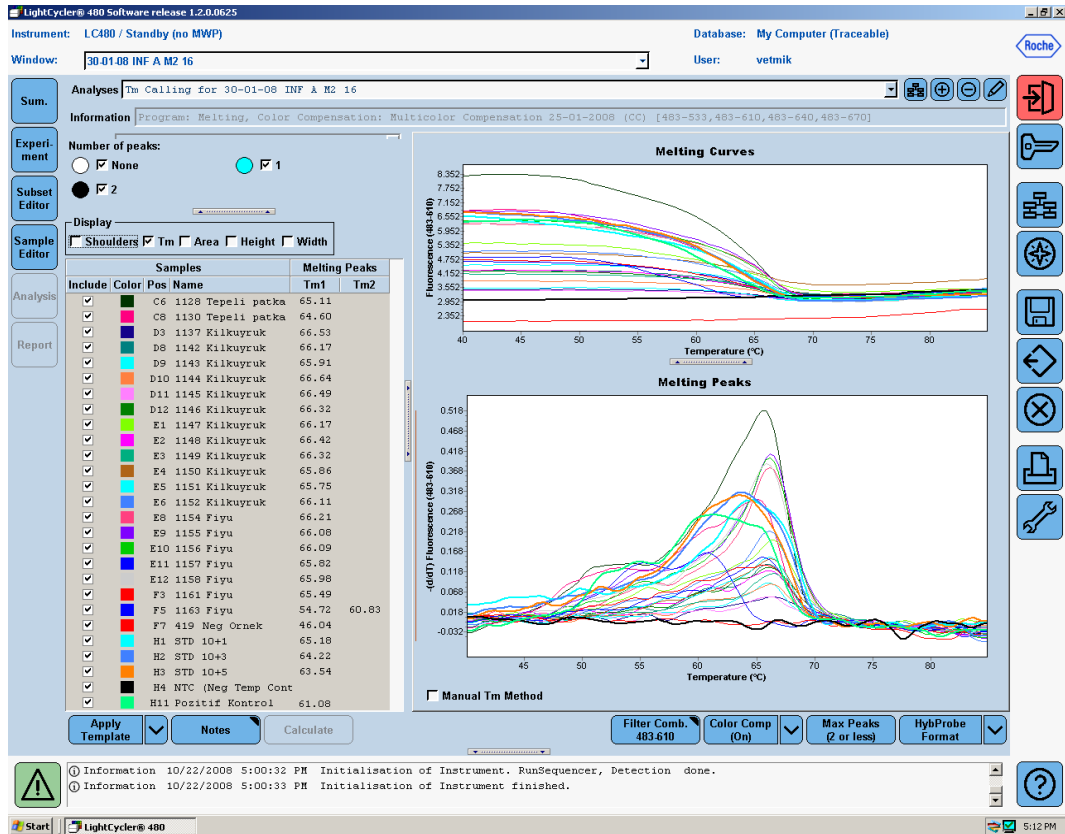
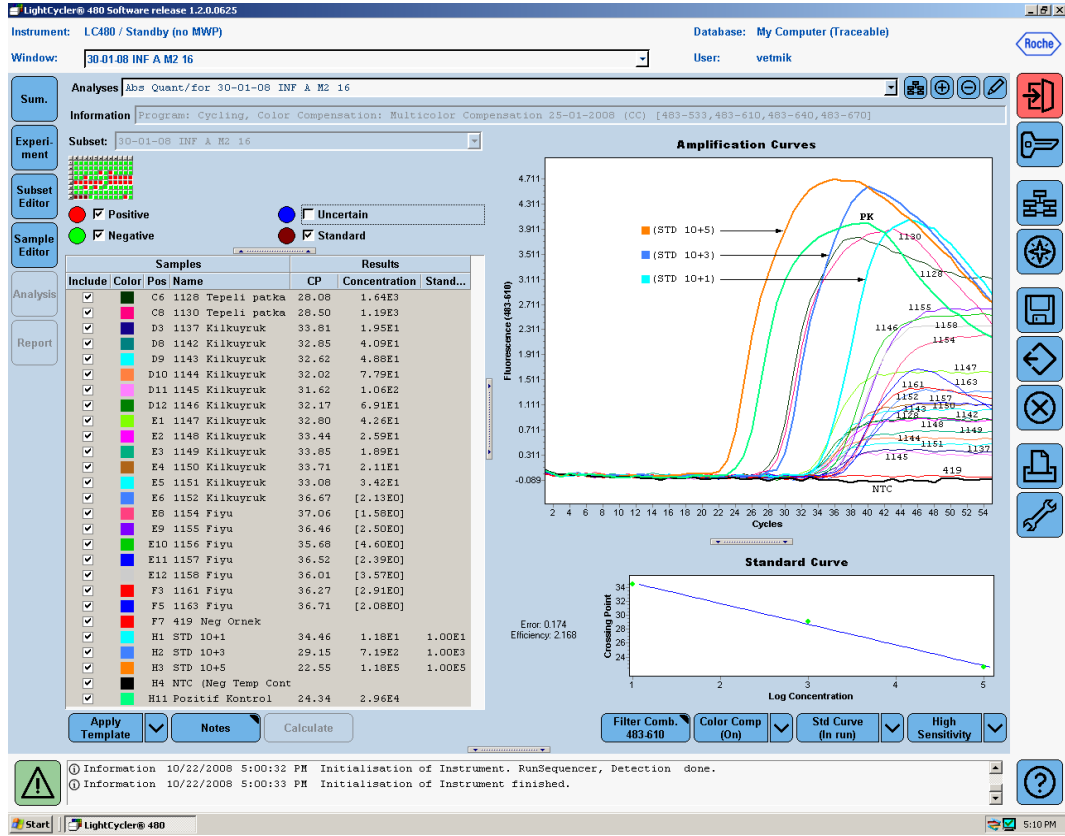
Şekil 6d: RT-PCR'da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler



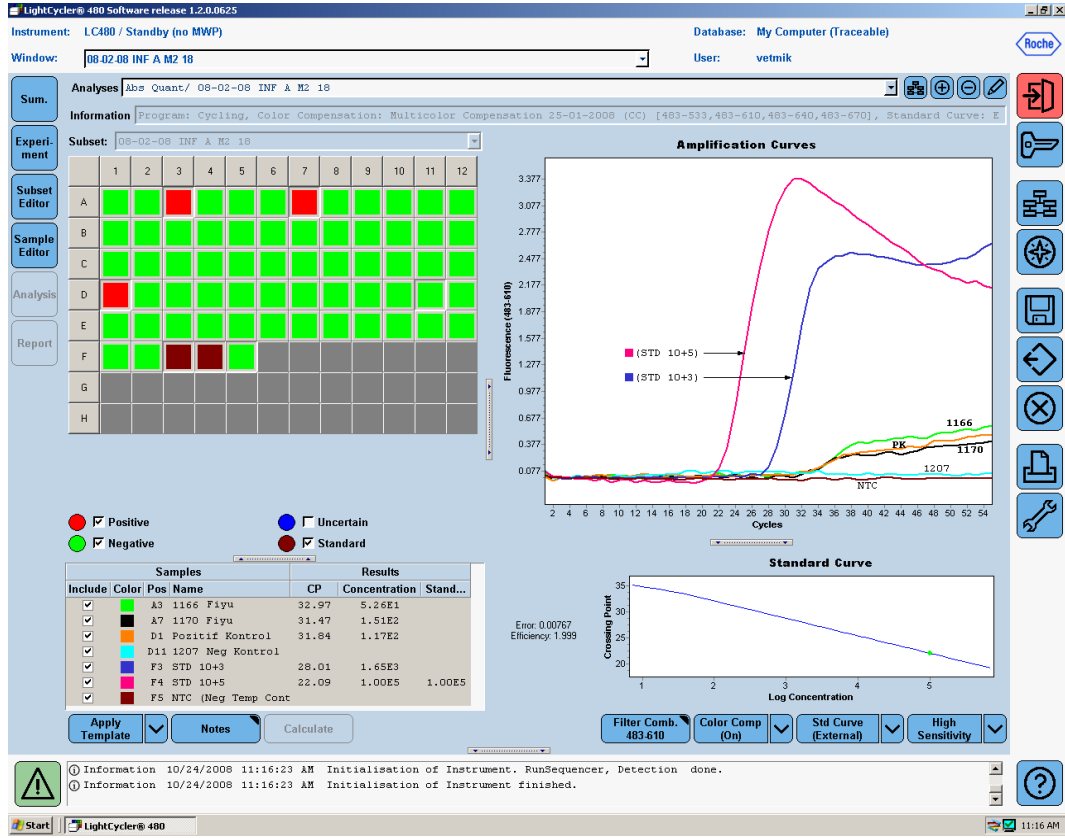
Şekil 6e: RT-PCR'da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler



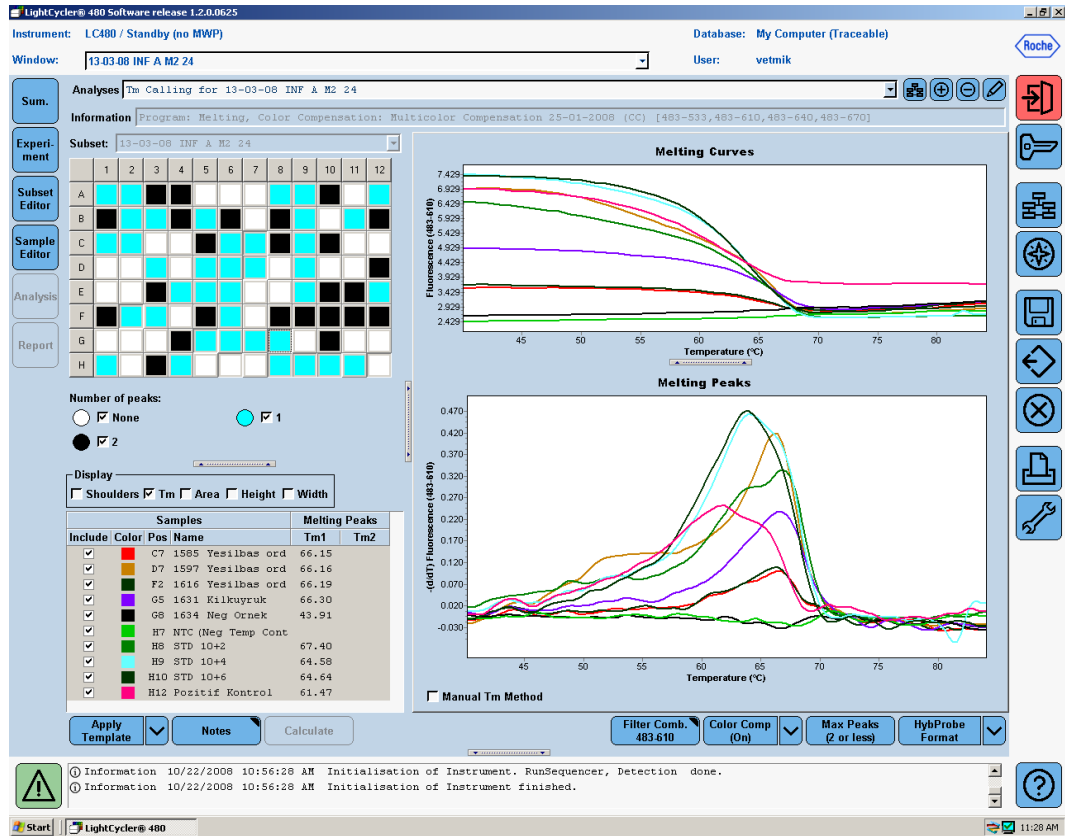
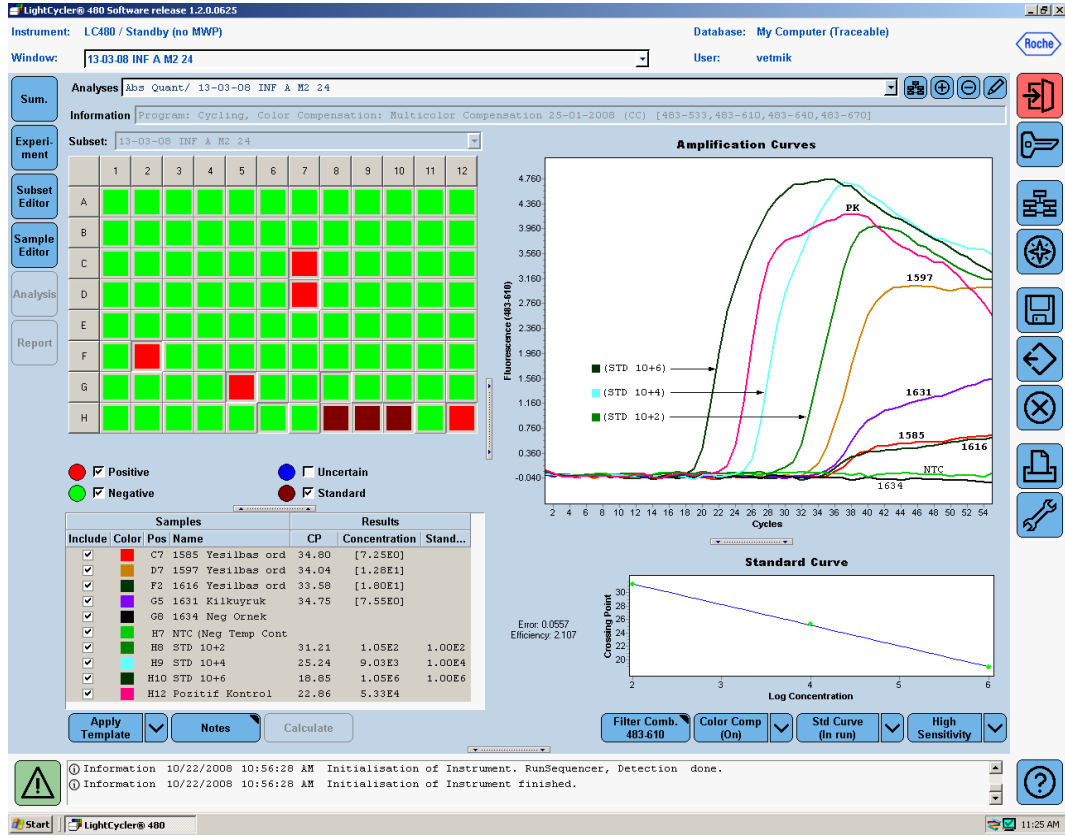
Şekil 6f: RT-PCR’da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler



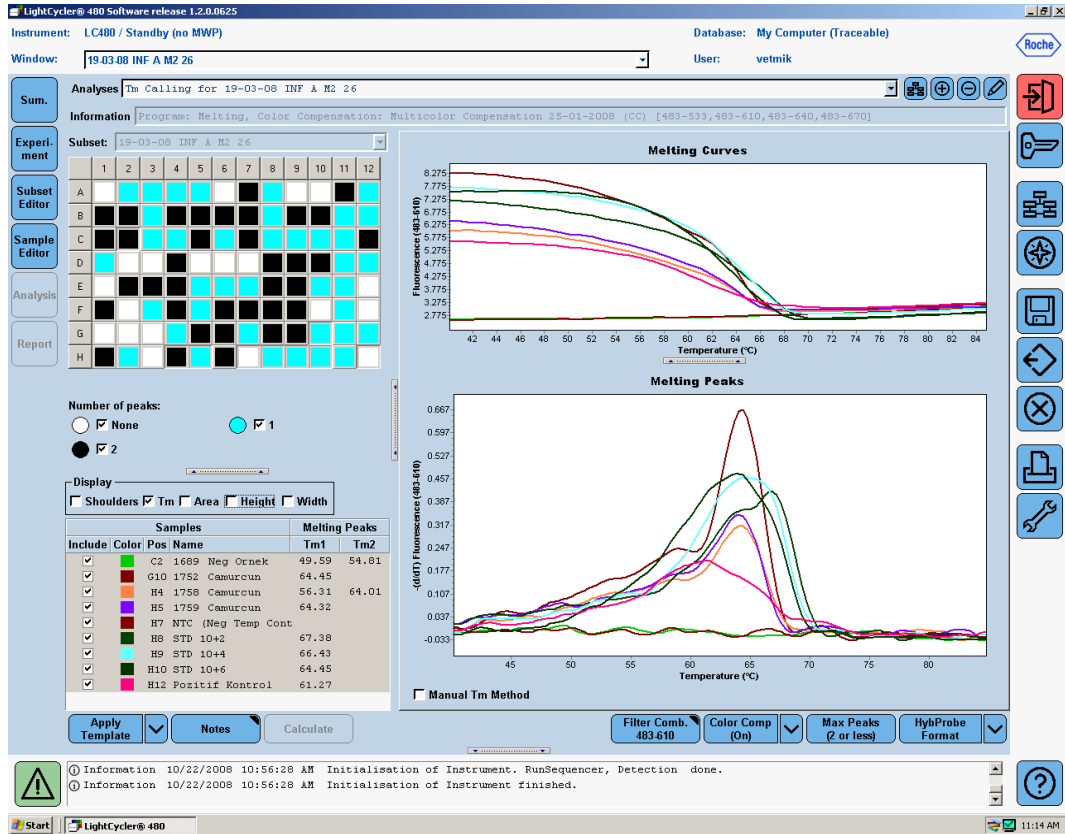
Şekil 6g: RT-PCR'da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler



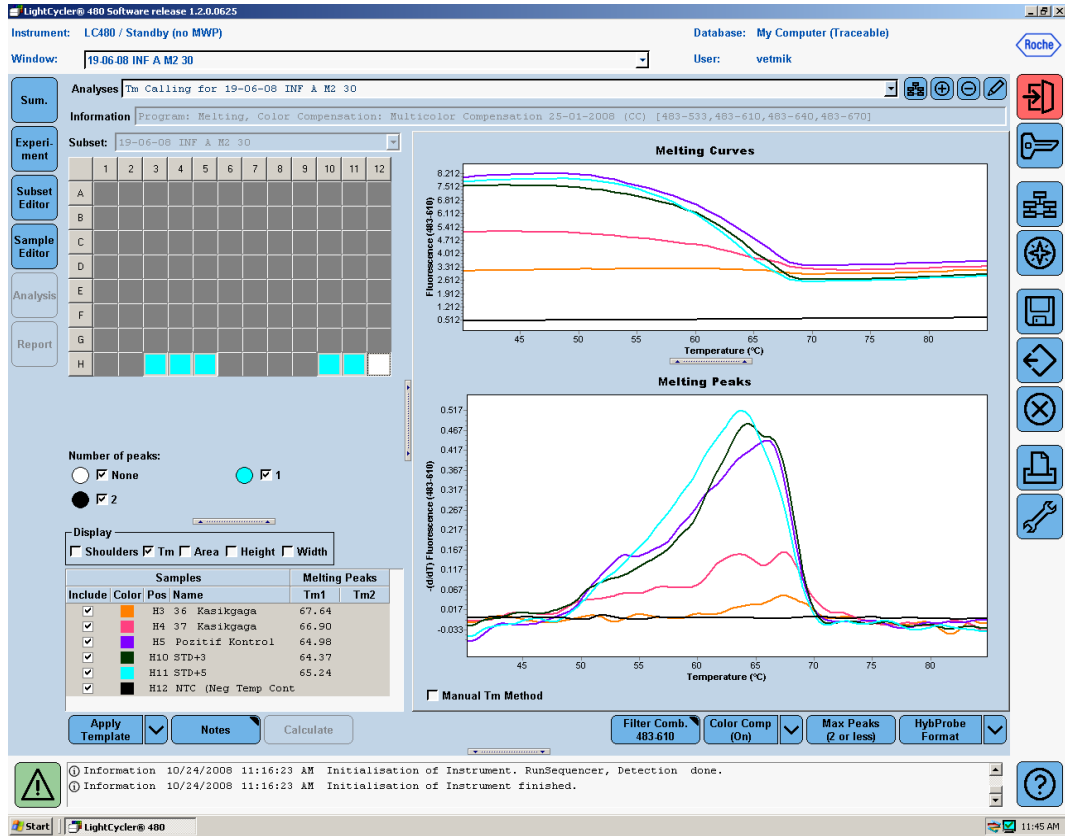
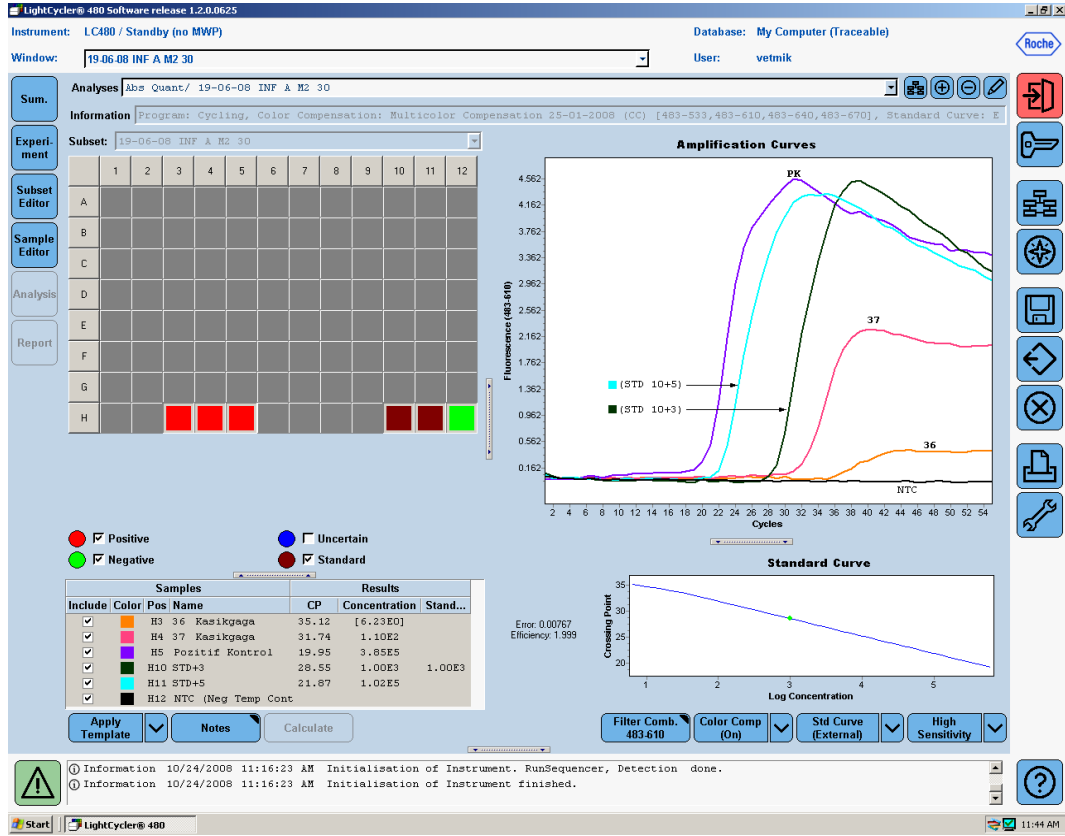
Şekil 6h: RT-PCR’da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler



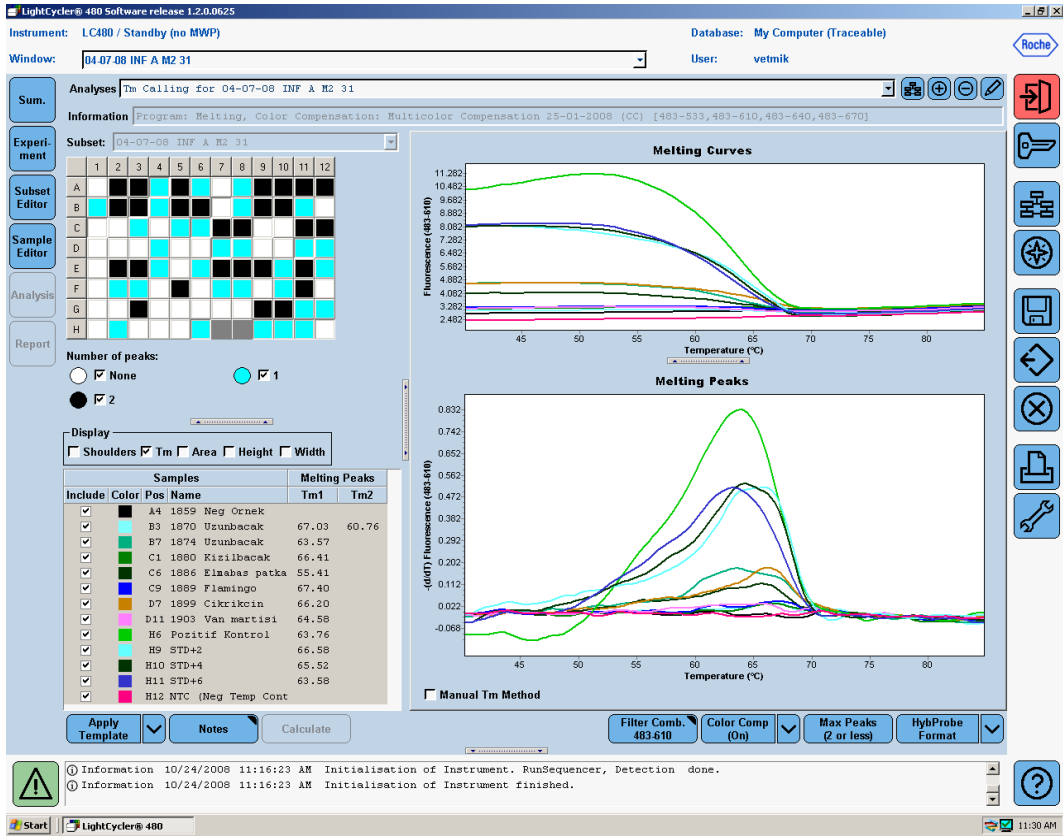
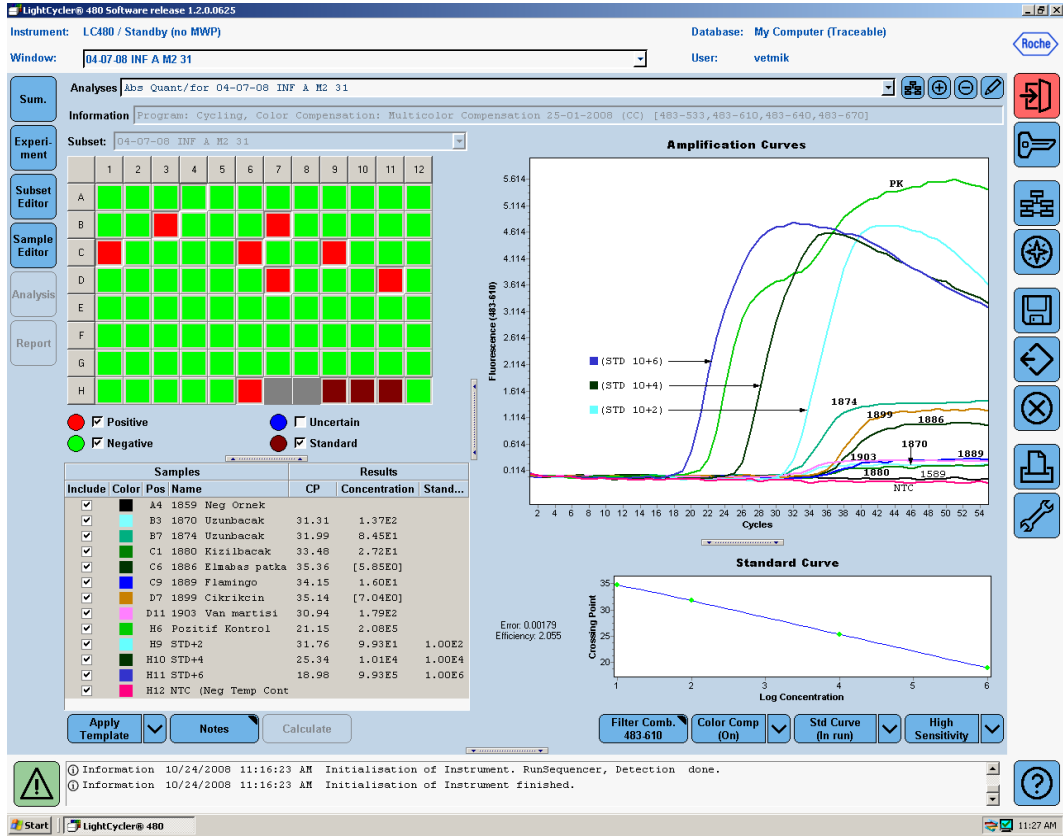
Şekil 6: RT-PCR'da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler



Şekil 6i: RT-PCR'da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler



Şekil 6j: RT-PCR’da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler



Şekil 6k: RT-PCR’da avian influenza tip A M2 pozitif bulunan örnekler

RT-PCR’da pozitif bulunan örnekler; incelen 47 kanatlı hayvan türünün 14’ünden (%29.8) toplanan 896 dışkı materyalinin 51 (%5.7) tanesinde tespit edildi. AI tip A M2 yönünden pozitiflik *Anas acuta* (Kılkuyruk), *Anas clypeata* (Kaşıkgağa), *Anas crecca* (Çamurcun), *Anas querquedula* (Çıkrıkçın), *Anas platyrhynchos* (Yeşilbaş ördek), *Anas penelope* (Fiyu), *Aythya ferina* (Elmabaş patka), *Aythya fuligula* (Tepeli patka), *Himantopus himantopus* (Uzunbacak), *Larus michahellis* (Van martısı), *Larus ridibundus* (Karabaş-Gülen martı), *Phoenicopterus ruber* (Flamingo), *Tadorna tadorna* (Suna) ve *Tringa totanus* (Kızılbacak) türlerinde saptandı (Ek-2).

RT-PCR ile pozitiflik saptanan dışkı örneklerinin toplandığı 14 kanatlı türünün 9’u (%64.3) *Anseriformes*, 4’ü (%28.6) *Charadriiformes* ve 1’i de (%7.1) *Phoenicopteriformes* takımına ait türlerden toplandı. Pozitif 51 örneğin 38’i (%74.6) 2006, 2007 ve 2008 yıllarının ocak-şubat-mart-nisan aylarını kapsayan I. dönemde, 9’u (%17.6) 2006 ve 2007 yıllarının eylül-ekim-kasım-aralık aylarını kapsayan III. dönemde, 4’ü (%7.8) ise 2008 yılının mayıs-haziran-temmuz-ağustos aylarını kapsayan II. döneminde toplandı. Pozitif örneklerin yıllara göre dağılımı değerlendirildiğinde; en yüksek oran %8.6 ile 2008 yılında görüldü. Bu oran 2007 yılında %6, 2006 yılında %3.5 olarak belirlendi. RT-PCR AI M2 pozitif 51 örneğin 35 (%68.6) tanesi beş adet kış ziyaretçisi türden, 8 tanesi (%15.7) dört yerli türden, 4 tanesi (%7.8) üç göçmen türden, 3 tanesi (%5.9) hem kış ziyaretçisi hem de göçmen olarak statülendirilen bir türden ve 1 tanesi de (%2) transit göçer bir türden alınan dışkı örneklerinde saptandı. Hayvan statüleri dikkate alındığında, en yüksek pozitiflik kış ziyaretçisi olan kılkuyruk (%37.1) ve fiyu (%22.5) ördek türlerinde tespit edildi (Tablo 12).

Tablo 12: RT-PCR ile AI tip A M2 geni yönünden pozitiflik saptanan türler, statüleri, toplanan dışkı örneklerinin yıllara ve alındığı dönemlere göre dağılımı

No	RT-PCR'da AI tip A M2 pozitif olan dışkıların toplandığı türler		Statüsü	Pozitif örneklerin yıllara ve alındığı dönemlere göre dağılımı										
	Latince adı (Takım adı)	Türkçe adı		2006			2007			2008		Toplam	Pozitif	%
				I	II	III	I	II	III	I	II			
1	<i>Phoenicopterus ruber</i> (<i>Phoenicopteriformes</i>)	Flamingo	TG	-	-	20	-	20	32	-	5 (1)	77	(1)	1.3
2	<i>Anas cylpeata</i> (<i>Anseriformes</i>)	Kaşıkgağa	KZ	20	-	20 (4)	20	-	45 (1)	-	-	105	(5)	4.8
3	<i>Anas crecca</i> (<i>Anseriformes</i>)	Çamurcun	KZ	-	-	20 (3)	-	-	30	10 (3)	-	60	(6)	10
4	<i>Anas penelope</i> (<i>Anseriformes</i>)	Fiyu	KZ	-	-	-	20 (9)	-	-	20	-	40	(9)	22.5
5	<i>Aythya fuligula</i> (<i>Anseriformes</i>)	Tepeli patka	KZ	-	-	-	-	-	-	20 (2)	-	20	(2)	10
6	<i>Anas acuta</i> (<i>Anseriformes</i>)	Kılkuş	KZ.	-	-	-	20 (12)	-	-	15 (1)	-	35	(13)	37.1
7	<i>Aythya ferina</i> (<i>Anseriformes</i>)	Elmabaş patka	KZ/G	-	20	-	30 (2)	-	5	25	3 (1)	83	(3)	3.6
8	<i>Himantopus himantopus</i> (<i>Charadriiformes</i>)	Uzunbacak	G	-	20	-	-	18	-	10 (2)	-	48 (2)		4.2
9	<i>Tringa totanus</i> (<i>Charadriiformes</i>)	Kızılbaş	G	40	-	-	-	-	-	10 (1)	-	50 (1)		2
10	<i>Anas querquedula</i> (<i>Anseriformes</i>)	Çıkrıkçın	G	-	-	-	-	-	-	5	5 (1)	10	(1)	10
11	<i>Tadorna tadorna</i> (<i>Anseriformes</i>)	Suna	Y	-	-	20	35	20	29 (1)	-	-	104	(1)	1
12	<i>Anas platyrhynchos</i> (<i>Anseriformes</i>)	Yeşilbaş ördek	Y	20	-	20	60 (3)	-	-	5	-	105	(3)	2.9
13	<i>Larus ridibundus</i> (<i>Charadriiformes</i>)	Karabaş (Gülen) martı	Y	-	-	-	70 (1)	-	-	-	-	70	(1)	1.4
14	<i>Larus michahellis</i> (<i>Charadriiformes</i>)	Van martısı	Y	40 (2)	-	-	20	-	10	10	9 (1)	89	(3)	3.4
Toplam örnek sayısı (Pozitif örnek sayısı)				120 (2)	40 (-)	100 (7)	275 (27)	58 (-)	151 (2)	130 (9)	22 (4)			
Yıllara göre toplam örnek, (pozitif örnek) sayısı ve yüzdesi				260 (9) %3.5			484 (29) %6			152 (13) %8.6		896	(51)	5.7

(I): Ocak-şubat-mart-nisan; (II): Mayıs-haziran-temmuz-ağustos; (III): Eylül-ekim-kasım-aralık

TG: Transit göçer, KZ: Kış ziyaretçisi, G: Göçmen, Y: Yerli

Pozitif örnekler yoğun olarak Çakırbey–Erçek-Göründü göç hattı üzerindeki sulak alanlardan toplanan dışkı örneklerinde elde edildi (Şekil 7). Aynı tarihlerde aynı mekânı paylaşan farklı kanatlı türlerinden alınan örneklerin RT-PCR sonuçları değerlendirildiğinde; 14 Mart 2007’de Çakırbey’de kılkuyruk ve fiyudan, 16 Nisan 2008’de Dönemeç Deltasında uzunbacak ve kızılbacktan, 14 Mayıs 2008’de Erçek Gölü ve buna yakın bir habitat olan Karagündüz Köyünde flamingo ve elmabaş patkadan alınan dışkı örneklerinde pozitiflik saptandı. Pozitif örneklerin toplandığı tarih, yer ve örnek sayıları tablo 13 ve şekil 7’de sunuldu.

Tablo 13: RT-PCR’da AI tip A M2 yönünden pozitif bulunan örneklerin alındıkları tarih, yer ve örnek sayılarına göre dağılımı

Örnek alınan tür		Örnek alınım tarihi	Örnek alınan yer	Aynı tarihte alınan örnek sayısı	Aynı tarihte pozitif örnek sayısı
Latince adı	Türkçe adı				
<i>Larus michahellis</i>	Van martısı	24.02.06	Sihke Gölü	20	2
<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkçaga	15.09.06	Karagündüz Köyü	20	4
<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	21.11.06	Karagündüz Köyü	20	3
<i>Anas platyrhynchos</i>	Yeşilbaş ördek	23.01.07	Havaalanı-Edremit	40	2
<i>Anas platyrhynchos</i>	Yeşilbaş ördek	22.02.07	Anzaf Kale önü	20	1
<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş patka	04.03.07	Serhat Lisesi	10	2
<i>Anas acuta</i>	Kılkuyruk	14.03.07	Çakırbey	20	12
<i>Anas penelope</i>	Fiyu	14.03.07	Çakırbey	20	9
<i>Larus ridibundus</i>	Karabaş (Gülen) martı	28.03.07	Arin Gölü Karşıyaka	20	1
<i>Tadorna tadorna</i>	Suna	10.12.07	Göründü Deltası	5	1
<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkçaga	31.12.07	Bendimahi Deltası	10	1
<i>Aythya fuligula</i>	Tepeli patka	28.01.08	Çelebibağ Sazlığı	10	2
<i>Anas acuta</i>	Kılkuyruk	05.03.08	Dönemeç Deltası	15	1
<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	12.03.08	Çakırbey	10	3
<i>Himantopus himantopus</i>	Uzunbacak	16.04.08	Dönemeç Deltası	10	2
<i>Tringa totanus</i>	Kızılback	16.04.08	Dönemeç Deltası	5	1
<i>Phoenicopterus ruber</i>	Flamingo	14.05.08	Erçek Gölü	5	1
<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş patka	14.05.08	Karagündüz Köyü	3	1
<i>Anas querquedula</i>	Çıkırıkçın	28.05.08	Erçek Gölü	5	1
<i>Larus michahellis</i>	Van martısı	12.06.08	Sihke Gölü	9	1
Toplam örnek sayısı				277	51



Şekil 7: Pozitif bulunan örneklerin dışkı alınan merkezlere göre dağılımı

Proje süresince Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına hastalık şüphesiyle ölü olarak getirilen 6 adet karga, 2 adet tavuk, 2 adet güvercin, 1 adet karabatak ve 1 adet kaz olmak üzere toplam 12 hayvanın iç organlarından hazırlanan inokulumlar ile Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi, Çocuk polikliniğinden hastalık şüphesiyle gönderilen 7 trakheal aspirattan oluşan toplam 19 numune RT-PCR’da negatif bulundu.

3.2. H5N1 RT-PCR sonuçları: Proje kapsamında bulunmamakla birlikte; RT-PCR ile M2 pozitif bulunan 51 örnek, RT-PCR’da H5N1 spesifik primerlerle analiz edilerek mevcut pozitif numuneler içinde H5N1 alt tipinin varlığı araştırıldı.

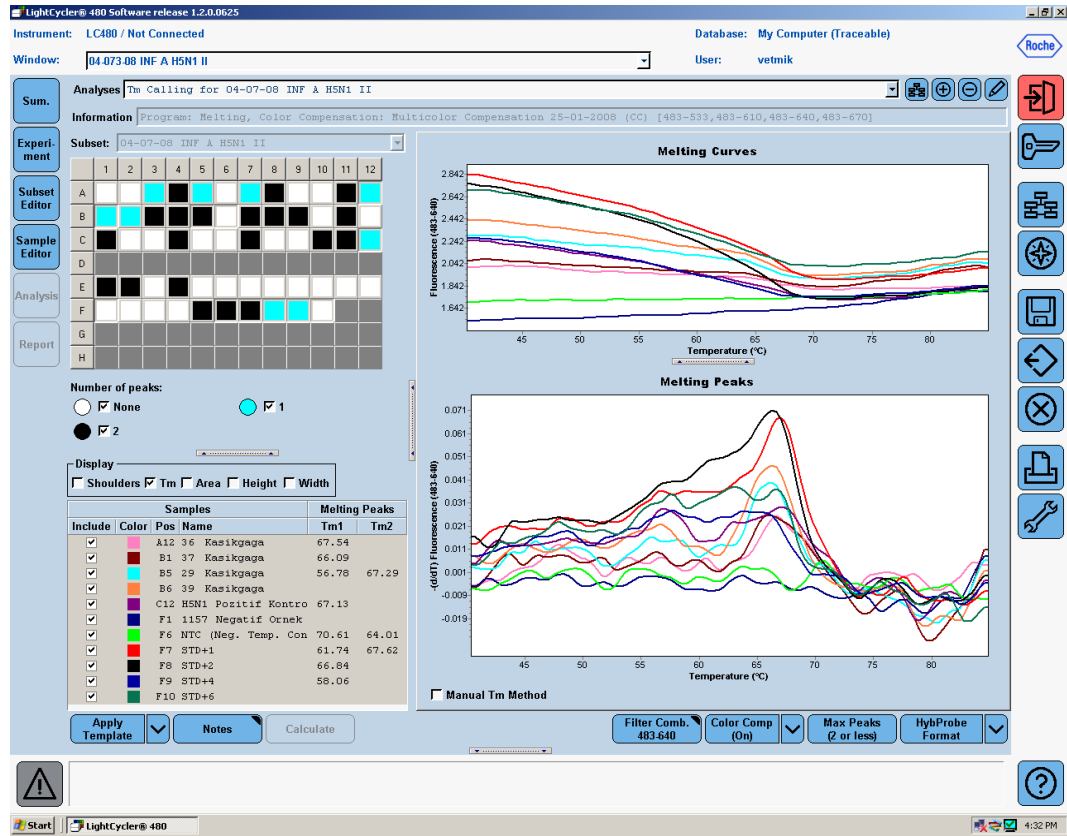
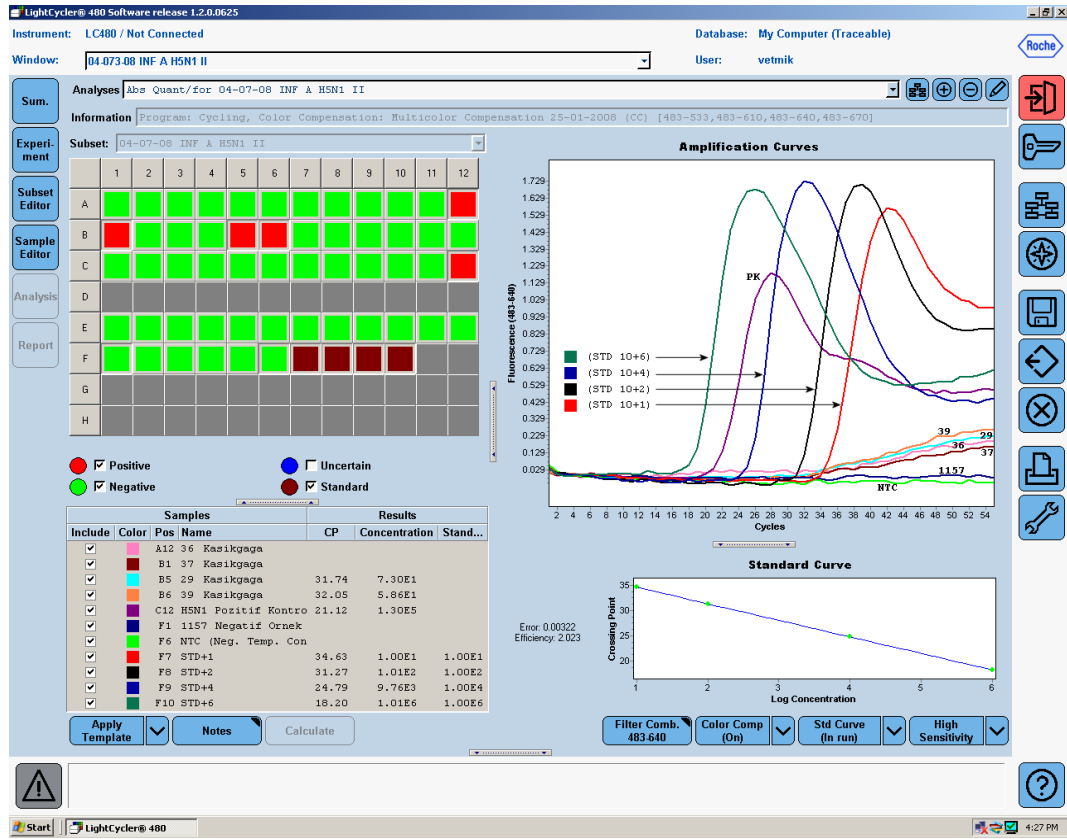
RT-PCR testi test sonucunda, 36 ve 37 nolu örnekler logaritmik faza girişte bir değer vermemiş olmamakla birlikte; 29, 36, 37 ve 39 nolu örnekler, H5 analizinde pozitif pik oluşturdular. Aynı örneklerin N1 analizlerinde tam bir pozitiflik saptandı (Tablo 14, Şekil 8 ve 9). Sonuç olarak, RT-PCR ile 4 örnek (%7.8) H5N1 pozitif bulundu. Pozitif bulunan örnekler 15 Eylül 2006 tarihinde, Erçek Gölü kenarı, Kargündüz Köyünde kaşıkgaga türü ördeklerden toplandı.

Tablo 14: RT-PCR ile M2 pozitif bulunan örneklerin RT-PCR’da H5N1 analiz sonuçları

No	Örnek No	Örnek alınan tür			RT-PCR
		Latince adı	Türkçe adı	Statüsü	
1	1889	<i>Phoenicopterus ruber</i>	Flamingo	TG	-
2	29	<i>Anas cylpeata</i>	Kaşıkğaga	KZ	H5N1
3	36	<i>Anas cylpeata</i>	Kaşıkğaga	KZ	H5N1
4	37	<i>Anas cylpeata</i>	Kaşıkğaga	KZ	H5N1
5	39	<i>Anas cylpeata</i>	Kaşıkğaga	KZ	H5N1
6	1034	<i>Anas cylpeata</i>	Kaşıkğaga	KZ	-
7	42	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	KZ	-
8	52	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	KZ	-
9	55	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	KZ	-
10	1752	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	KZ	-
11	1758	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	KZ	-
12	1759	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	KZ	-
13	1154	<i>Anas penelope</i>	Fiyu	KZ	-
14	1155	<i>Anas penelope</i>	Fiyu	KZ	-
15	1156	<i>Anas penelope</i>	Fiyu	KZ	-
16	1157	<i>Anas penelope</i>	Fiyu	KZ	-
17	1158	<i>Anas penelope</i>	Fiyu	KZ	-
18	1161	<i>Anas penelope</i>	Fiyu	KZ	-
19	1163	<i>Anas penelope</i>	Fiyu	KZ	-
20	1166	<i>Anas penelope</i>	Fiyu	KZ	-
21	1170	<i>Anas penelope</i>	Fiyu	KZ	-
22	1128	<i>Aythya fuligula</i>	Tepeli patka	KZ	-
23	1130	<i>Aythya fuligula</i>	Tepeli patka	KZ	-
24	1137	<i>Anas acuta</i>	Kılkuyruk	KZ	-
25	1142	<i>Anas acuta</i>	Kılkuyruk	KZ	-
26	1143	<i>Anas acuta</i>	Kılkuyruk	KZ	-
27	1144	<i>Anas acuta</i>	Kılkuyruk	KZ	-
28	1145	<i>Anas acuta</i>	Kılkuyruk	KZ	-
29	1146	<i>Anas acuta</i>	Kılkuyruk	KZ	-
30	1147	<i>Anas acuta</i>	Kılkuyruk	KZ	-
31	1148	<i>Anas acuta</i>	Kılkuyruk	KZ	-
32	1149	<i>Anas acuta</i>	Kılkuyruk	KZ	-
33	1150	<i>Anas acuta</i>	Kılkuyruk	KZ	-
34	1151	<i>Anas acuta</i>	Kılkuyruk	KZ	-
35	1152	<i>Anas acuta</i>	Kılkuyruk	KZ	-
36	1631	<i>Anas acuta</i>	Kılkuyruk	KZ	-
37	594	<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş patka	KZ / G	-
38	596	<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş patka	KZ / G	-
39	1886	<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş patka	KZ / G	-

40	1870	<i>Himantopus himantopus</i>	Uzunbacak	G	-
41	1874	<i>Himantopus himantopus</i>	Uzunbacak	G	-
42	1880	<i>Tringa totanus</i>	Kızılacak	G	-
43	1899	<i>Anas querquedula</i>	Çıkrıkçın	G	-
44	844	<i>Tadorna tadorna</i>	Suna	Y	-
45	1585	<i>Anas platyrhynchos</i>	Yeşilbaş ördek	Y	-
46	1597	<i>Anas platyrhynchos</i>	Yeşilbaş ördek	Y	-
47	1616	<i>Anas platyrhynchos</i>	Yeşilbaş ördek	Y	-
48	742	<i>Larus ridibundus</i>	Karabaş (Gülen) martı	Y	-
49	435	<i>Larus michahellis</i>	Van martısı	Y	-
50	440	<i>Larus michahellis</i>	Van martısı	Y	-
51	1903	<i>Larus michahellis</i>	Van martısı	Y	-

TG: Transit göçer, KZ: Kış ziyaretçisi, G: Göçmen, Y: Yerli

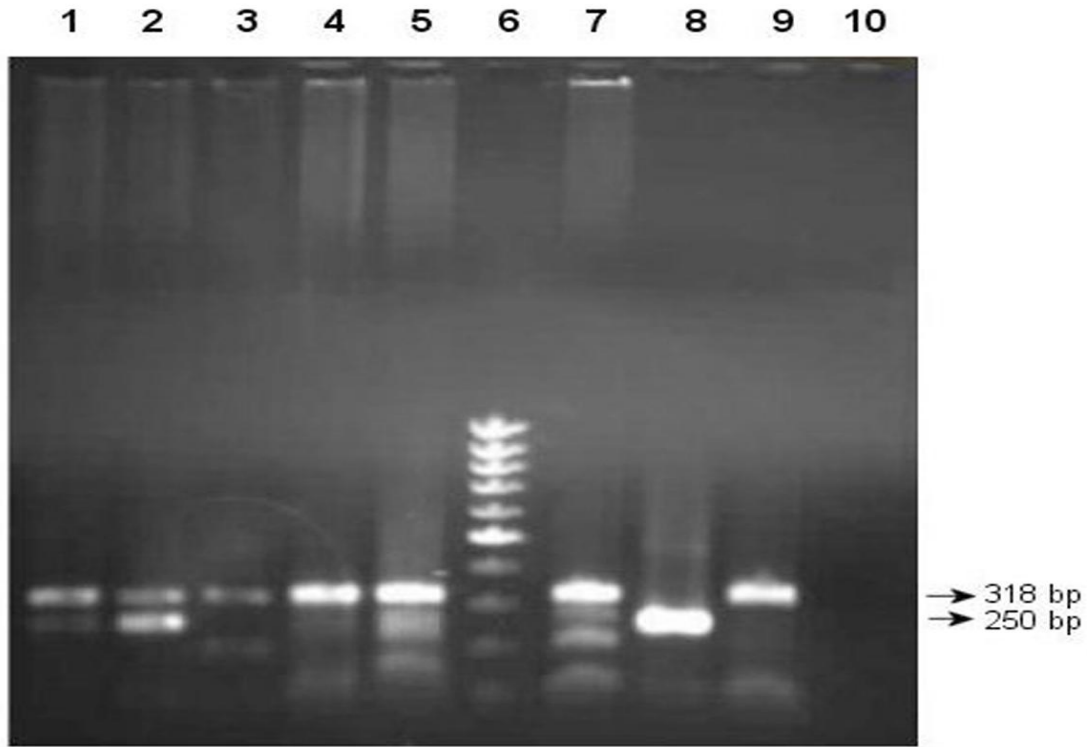


Şekil 8: RT-PCR'da H5 pozitif örneklerin analiz sonuçları (29, 36, 37, 39)

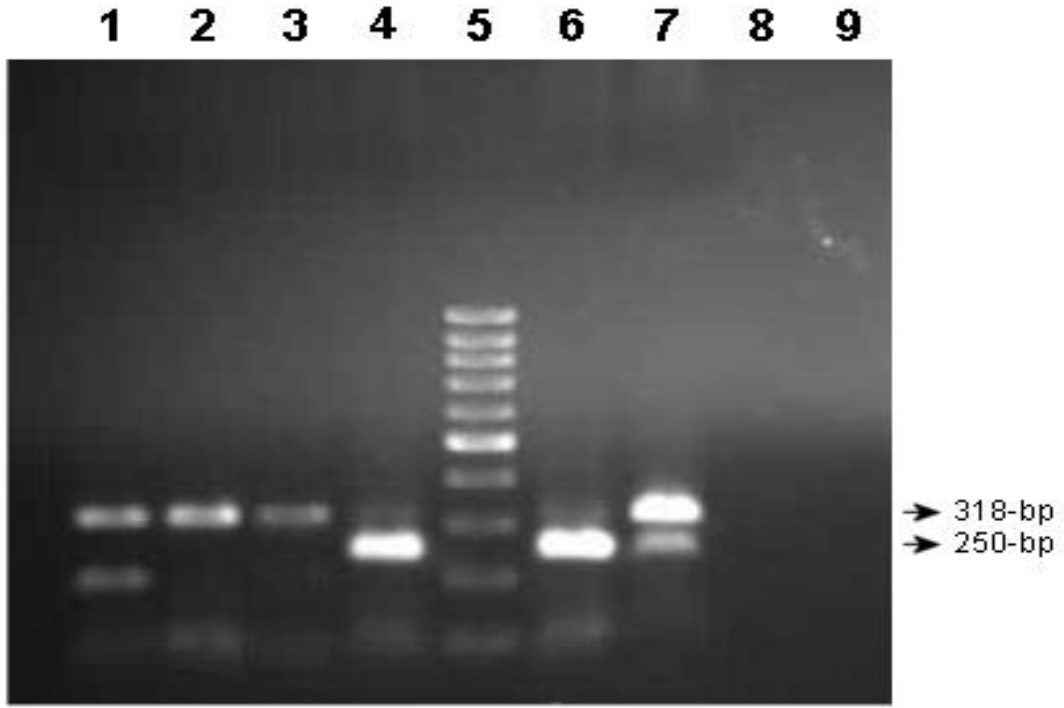


Şekil 9: RT-PCR’da N1 pozitif örneklerin analiz sonuçları (29, 36, 37, 39)

3.3. Agaroz jel elektroforez sonuçları: Sunulan bu proje kapsamında olmamakla birlikte, M2 gen bölgesine spesifik 250-bp ve internal kontrole ait 318-bp'lik bantları görüntülemek amacıyla, bazı pozitif ve negatif örneklerin RT-PCR ürünleri agaroz jel elektroforez ile analiz edildi ve bu bantlar görüntülendi (Fotoğraf 9 ve 10).

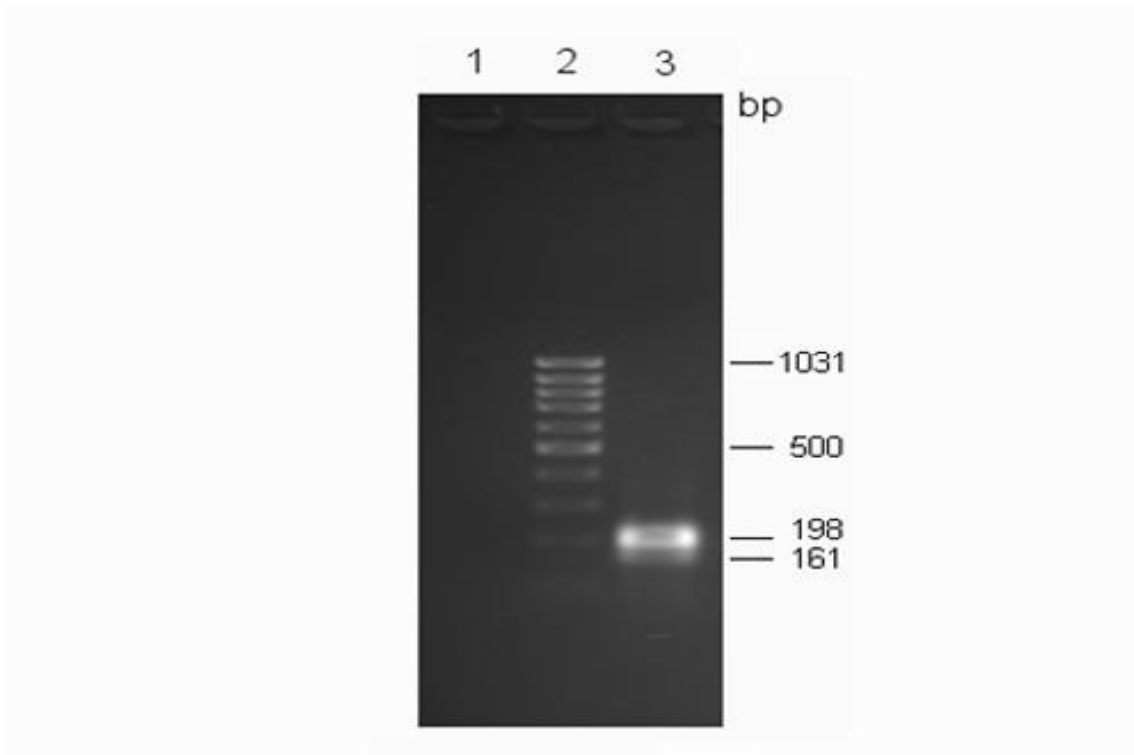


Fotoğraf 9: RT-PCR ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforezdeki görüntüsü: 3 ve 9: RT-PCR'da avian influenza tip A negatif olan dışkı örnekleri (internal kontrolleri pozitif-318 bp); 1, 2, 4, 5 ve 7: RT-PCR'da avian influenza tip A pozitif dışkı örnekleri-250 bp (internal kontrolü pozitif-318 bp); 6: Marker (100 bp DNA Ladder Plus, SM0241, Fermentas); 8: Pozitif kontrol (RT-PCR standardı); 10: Negatif kontrol (DNase, RNase free distile su)

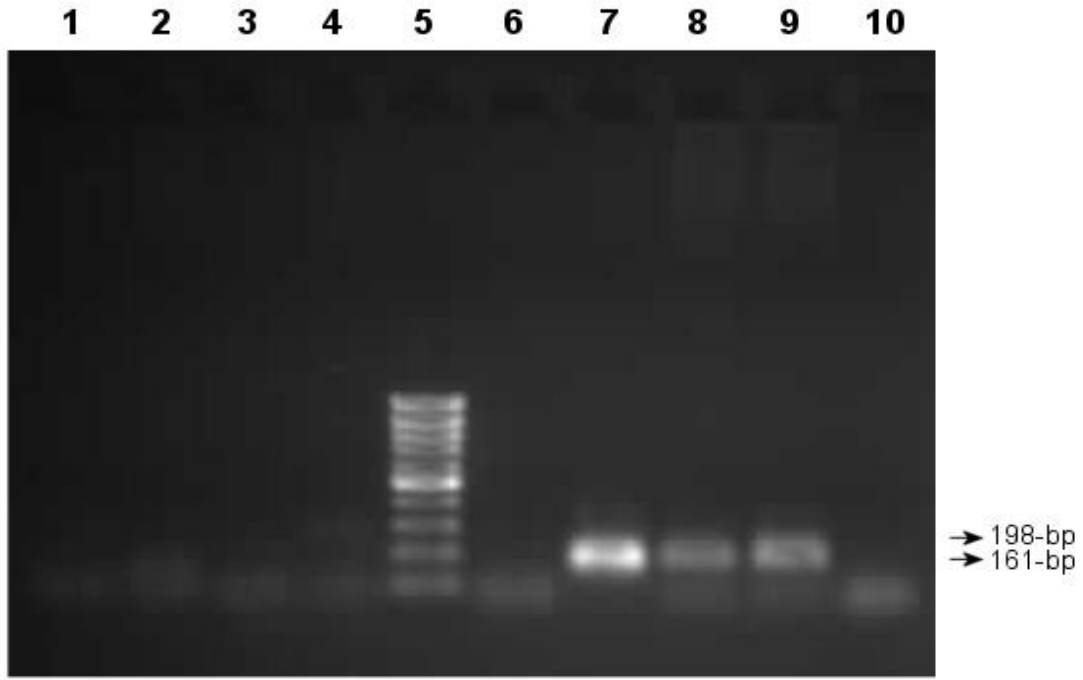


Fotoğraf 10: AI tip A M2 pozitif RT-PCR ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforezdeki görüntüsü: 1, 2 ve 3: RT-PCR'da avian influenza tip A negatif olan dışkı örnekleri (internal kontrolleri pozitif-318 bp); 4, 6 ve 7: RT-PCR'da avian influenza tip A pozitif dışkı örnekleri - 250 bp (internal kontrolü pozitif-318 bp); 5: Marker (100 bp DNA Ladder Plus, SM0241, Fermentas); 8 ve 9: Negatif kontrol (DNase, RNase free distile su)

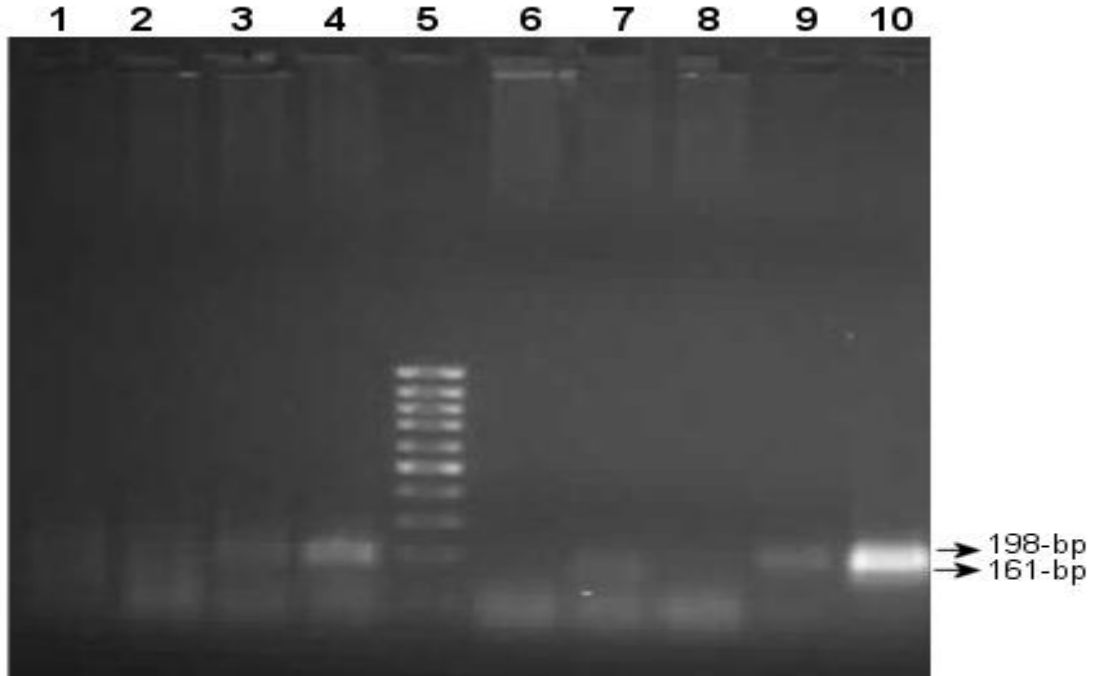
RT-PCR’da H5N1 pozitif örneklerin, proje kapasamında olmamakla birlikte, elde edilen amplikonları agaroz jel elektroforezde koşturuldu. H5 (161-bp) ve N1 (198-bp) alt tiplerine spesifik bantlar görüntülendi (Fotoğraf 11, 12 ve 13).



Fotoğraf 11: H5N1 alt tipine ait RT-PCR  r nlerinin %1.5’luk agaroz jel elektroforezdeki görüntüsü. 1: Negatif kontrol (DNase, RNase free distile su) 2: (Marker 100 bp DNA Ladder Plus, SM0241, Fermentas); 3: Pozitif kontrol (Referans H5N1 Bornova suşu)



Fotoğraf 12: H5N1 alt tipine ait RT-PCR ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforezdeki görüntüsü. 1, 2, 3, 4 ve 6: RT-PCR H5N1 negatif örnek; 5: Marker (100 bp DNA Ladder Plus, SM0241, Fermentas); 7: Pozitif kontrol (Referans H5N1 Bornova suşu); 8 ve 9: RT-PCR H5N1 pozitif örnek (29 ve 39 nolu örnekler); 10: Negatif kontrol (DNase, RNase free distile su)



Fotoğraf 13: H5N1 alt tipine ait RT-PCR ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforezdeki görüntüsü. 1 ve 2: Negatif örnek; 3 ve 4: RT-PCR H5N1 pozitif örnek (36 ve 37 nolu örnek); 5: Marker (100 bp DNA Ladder Plus, SM0241, Fermentas); 6: Negatif kontrol (DNase, RNase free distile su); 7 ve 8: Negatif örnek; 9: RT-PCR H5N1 pozitif örnek (29 nolu örnek); 10: Pozitif kontrol (Referans H5N1 Bornova suşu)

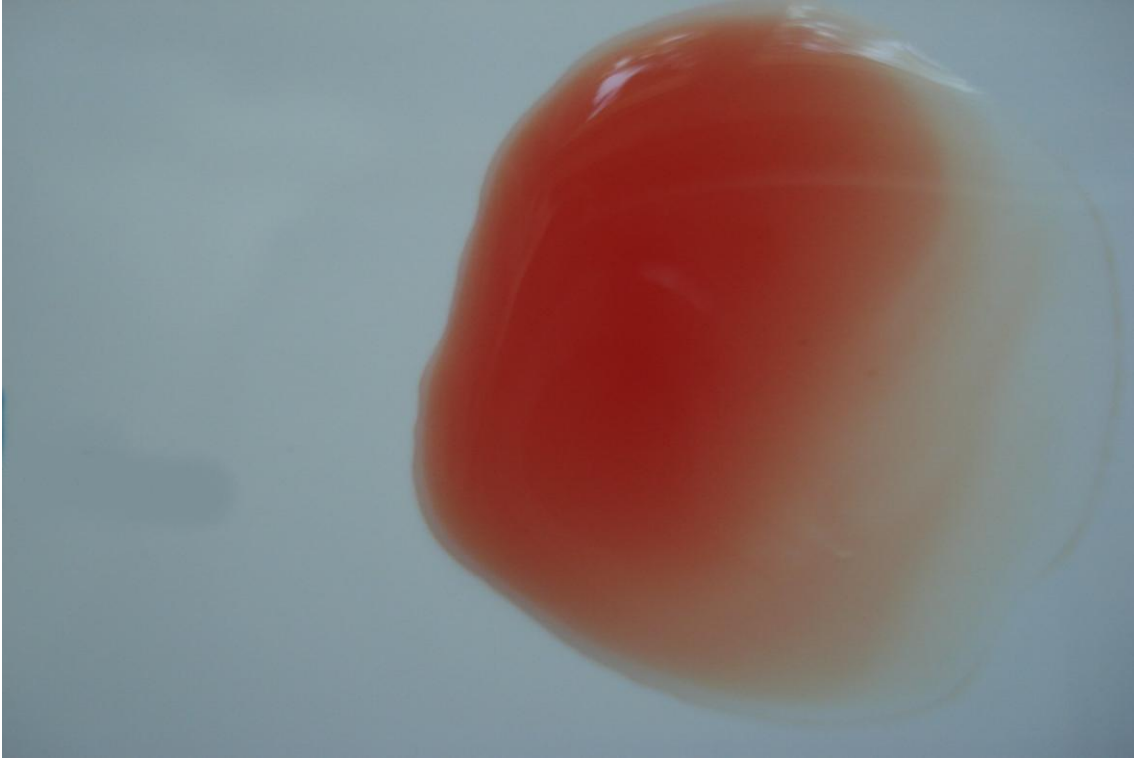
3.4. Embriyolu tavuk yumurtalarına inokulasyon sonuçları: RT-PCR ile AI tip A M2 geni bakımından pozitif bulunan 51 örneğin PCR ve virüs izolasyonu için iki seri olarak toplanan dışkı numuneleri karıştırıldı ve bu karışımdan hazırlanan inokulumların embriyolu tavuk yumurtalarına ekimleri, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde gerçekleştirildi. Bu amaçla; her bir örnek için 9-11 günlük 5'er adet embriyolu tavuk yumurtası kullanıldı. İlk inokulasyon sonrası toplanan allantoik sıvılar (Fotoğraf 14a ve 14b), %1'lik yıkanmış tavuk eritrositi ile lamda HA testine tabi tutuldu (Fotoğraf 15a, 15b ve 15c). Hem HA negatif ve hem de pozitif olan allantoik sıvılar (virüs miktarını arttırmak amacıyla) aynı şekilde 5'er adet embriyolu tavuk yumurtalarına ekilerek 2. ve 3. pasajları yapıldı. Yumurtalar açılarak embriyolar makroskopik olarak incelendi. Embriyolarda ölüm, hemoraji, gelişme geriliği, allantoik sıvıda artış (Fotoğraf 16a ve 16b) ve bu sıvıdan yapılan lamda HA testinin sonuçları birlikte değerlendirildi. Pozitif örneklerde her üç pasajda da 24, 48 ve 72. saatlerde embriyo ölümleri çoğunlukla oluştu.



Fotoğraf 14a: İnkübasyon sonrası embriyolu tavuk yumurtalarının allantoik sıvılarının toplanması



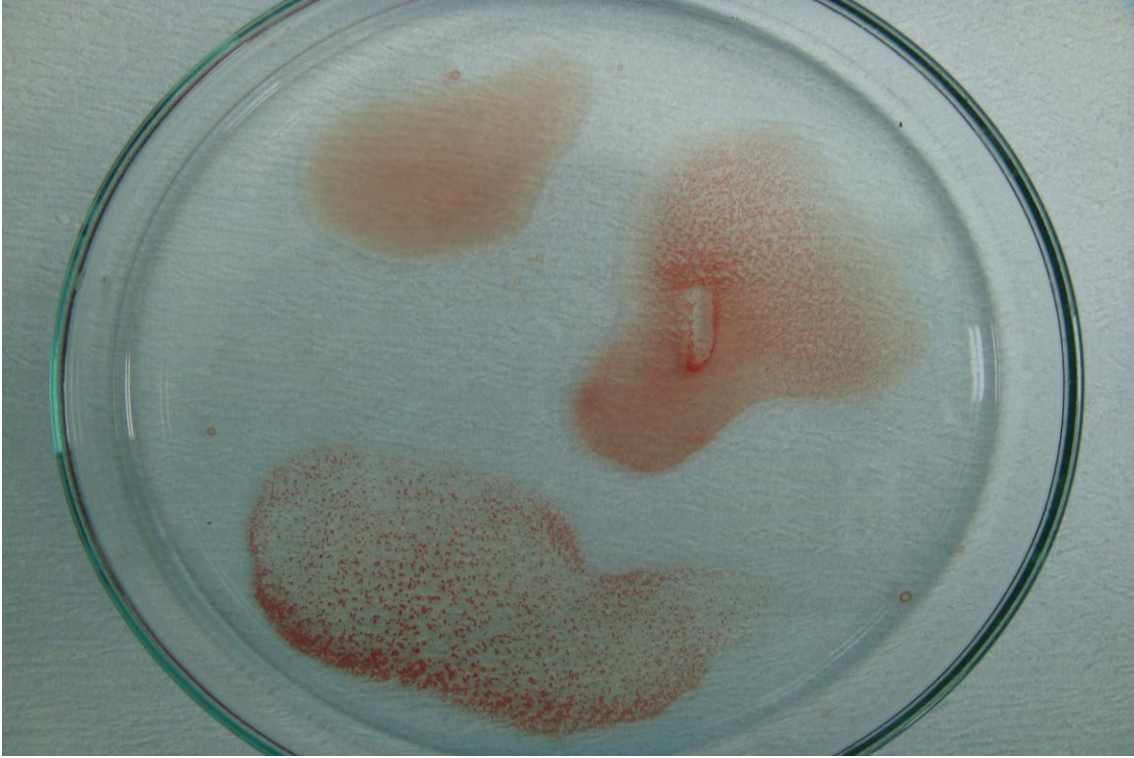
Fotoğraf 14b: İnkübasyon sonrası embriyolu tavuk yumurtalarının allantoik sıvılarının toplanması



Fotoğraf 15a: Lam hemagglütinasyon testinde fizyolojik tuzlu su ile eritrosit kontrolü (%1'lik yıkanmış tavuk eritrositi)



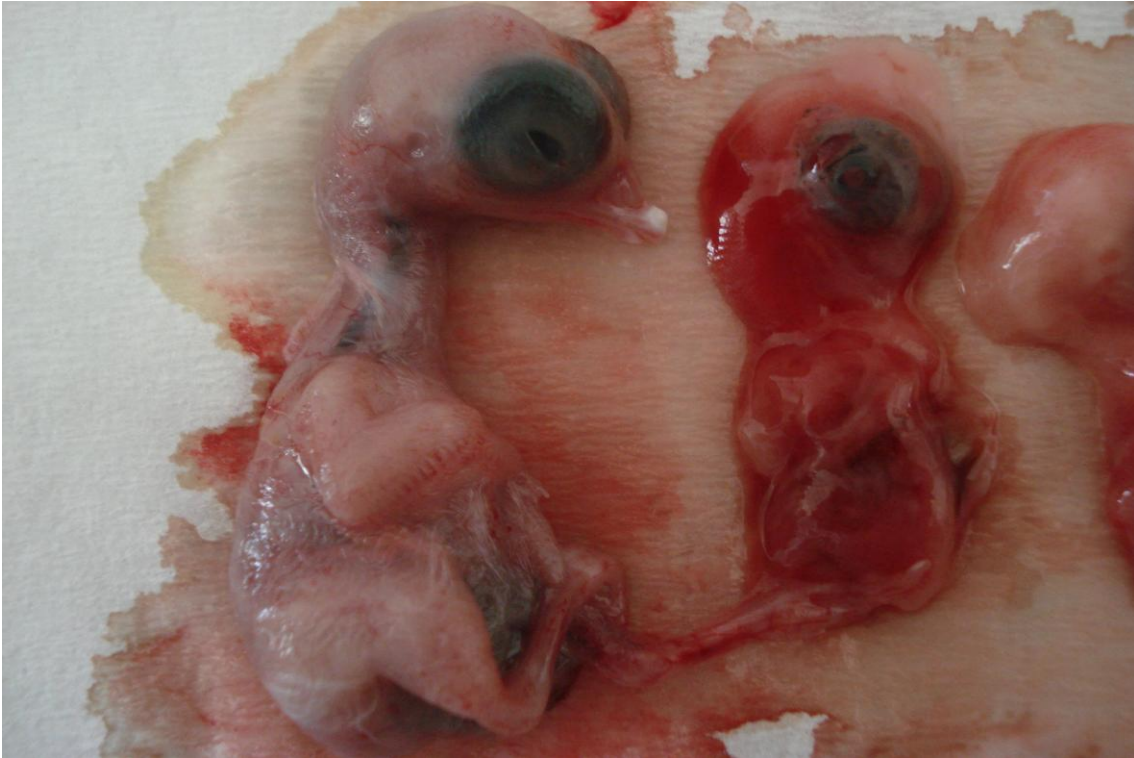
Fotoğraf 15b: Lam hemaglutinasyon testinde pozitif reaksiyon (%1'lik yıkanmış tavuk eritrositi ile 1752 nolu izolata ait allantoik sıvı)



Fotoğraf 15c: Lam hemaglutinasyon testinde pozitif (1752 nolu izolat) ve negatif (fizyolojik tuzlu su) reaksiyon (%1'lik yıkanmış tavuk eritrositi)



Fotoğraf 16a: İnokulasyon sonrası embriyolardaki gelişme geriliği ve hemorajik değişiklikler



Fotoğraf 16b: İnokulasyon sonrası embriyolardaki gelişme geriliği ve hemorajik değişiklikler

3.5. Hamagglütinasyon (HA) ve hızlı test sonuçları: Embriyolu tavuk yumurtalarında inokulasyonu yapılan 51 örneğin lam HA ve hızlı test kiti ile pozitif sonuç veren 11 tanesi (%21.6), AI tip A virüsü olarak tanımlanarak edildi. Bunların tamamı *Anseriformes* takımına ait ördeklerden izole edildi. Embriyolu tavuk yumurtalarının 1, 2 ve 3. pasajlarından toplanan allantoik sıvıların lamda HA testi ve 3. pasaj sonucunda HA pozitif olan suşların avian influenza type A antijen test kiti ile hızlı test sonuçları tablo 15’de (Fotoğraf 17a ve 17b) gösterildi.

Tablo 15: Embriyolu tavuk yumurtasına ekim yapılan örneklerin lam hemagglütinasyon ve hızlı test sonuçları

No	Örnek no	Virüs izolasyonu yapılan hayvan türleri		Lam HA			Hızlı test (3. pasaj)
		Latince adı	Türkçe adı	1.pasaj	2.pasaj	3.pasaj	
1	29	<i>Anas clypeata</i>	Kaşık gaga	+	+	+	+
2	36	<i>Anas clypeata</i>	Kaşık gaga	-	+	+	+
3	37	<i>Anas clypeata</i>	Kaşık gaga	-	+	+	+
4	39	<i>Anas clypeata</i>	Kaşık gaga	+	+	+	+
5	42	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	+	+	+	+
6	52	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	+	+	+	+
7	55	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	+	+	+	+
8	594	<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş patka	+	+	+	+
9	596	<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş patka	+	+	+	+
10	1752	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	+	+	+	+
11	1758	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	? (zayıf)	+	+	+



Fotoğraf 17a: Avian influenza tip A antijen test kiti ile pozitif (sol) ve negatif sonuçlar

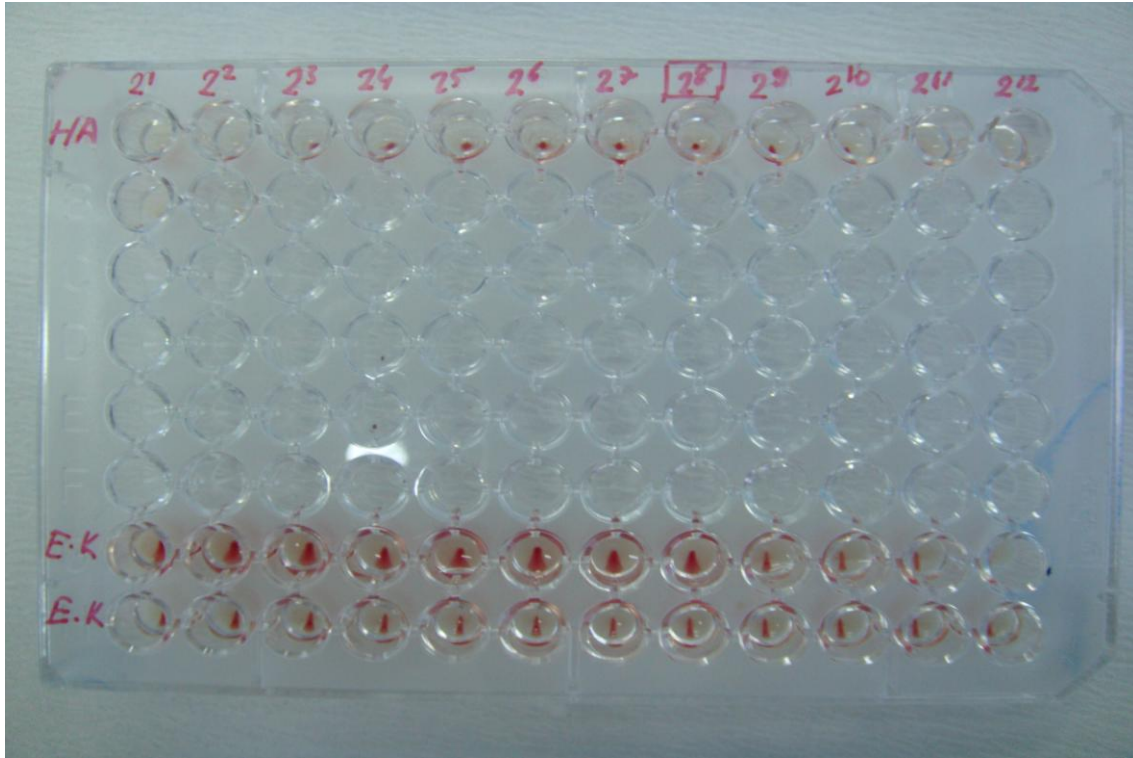


Fotoğraf 17b: Avian influenza tip A antijen test kiti ile pozitif sonuçlar

Lamda HA testi ve Avian influenza type A antijen test kiti ile pozitif bulunan suşların mikropleytte HA testleri yapılarak virüslerin titreleri belirlendi (Tablo 16, Fotoğraf 18). HI testinde bu virüsler 4 HAÜ'nden kullanıldı.

Tablo 16: Lam hemagglütinasyon ve hızlı test pozitif izolatların mikro hemagglütinasyon test sonuçları

No	İzolat no	Virüs izolasyonu yapılan hayvan türleri		Mikro hemagglütinasyon titresi
		Latince adı	Türkçe adı	
1	29	<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkgağa	1/128
2	36	<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkgağa	1/64
3	37	<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkgağa	1/128
4	39	<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkgağa	1/256
5	42	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	1/64
6	52	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	1/64
7	55	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	1/64
8	594	<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş patka	1/64
9	596	<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş patka	1/32
10	1752	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	1/128
11	1758	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	1/64



Fotoğraf 18: Mikro hemagglütinasyon testi ile titre tespiti (39 nolu izolatın titresi 1/256) ve eritrosit kontrolü (E.K 1, 2)

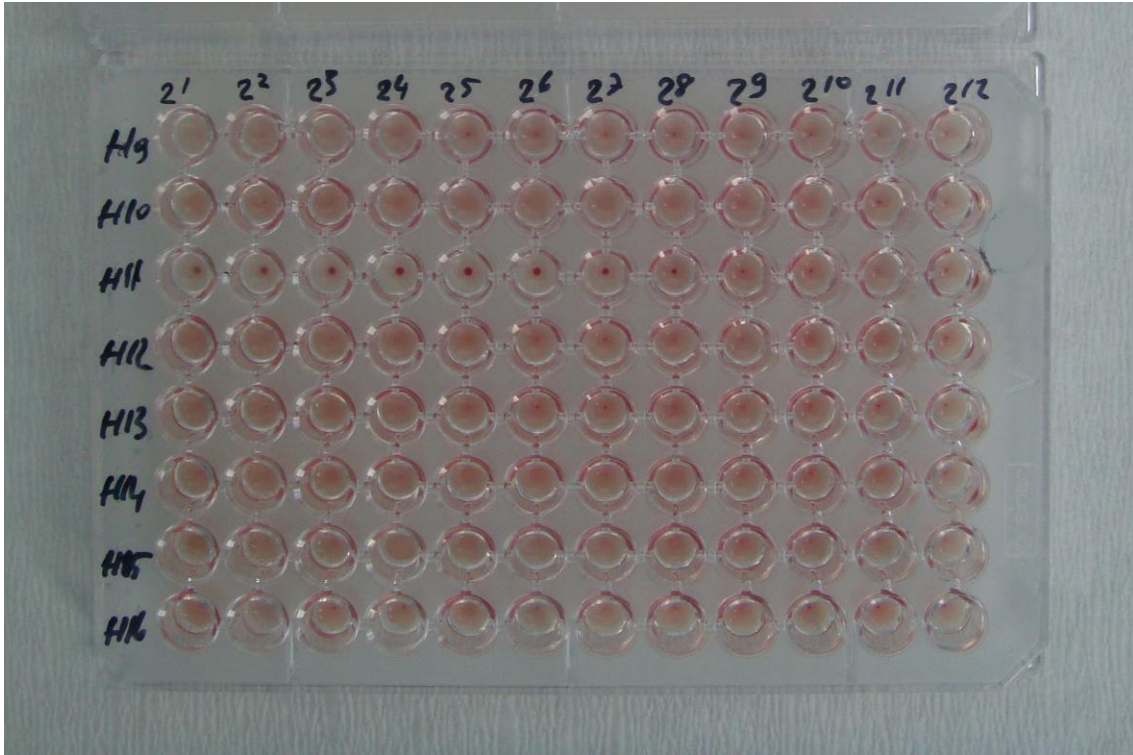
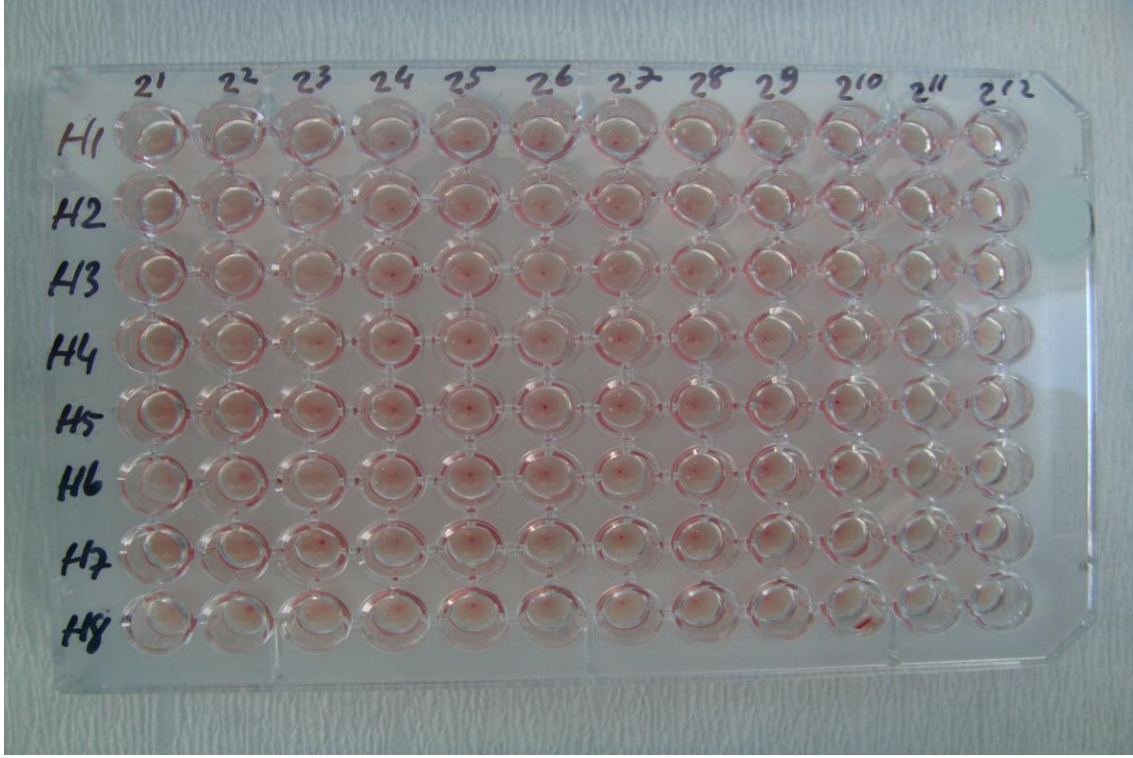
3.6. Hemaglütinasyon inhibisyon (HI) ve neuraminidaz inhibisyon (NI) test sonuçları:

İzolatların hemaglütinin alt tiplerini belirlemek amacıyla Veterinary Laboratories Agency, VLA (Weybridge, İngiltere)’den ve Avian Influenza OIE/FAO Reference Laboratory, IZSV (Padova, İtalya)’dan sağlanan antiserumlarla yapılan tiplendirme sonucunda, 3’ü H1, 2’si H7 ve yine 2 tanesi H11 olarak tiplendirildi (Fotoğraf 19a ve 19b). H7 olarak tiplendirilen izolatlar, 12 Mart 2008 tarihinde Çakırbey’de çamurcunlardan toplanan dışkı materyallerinden elde edildi.

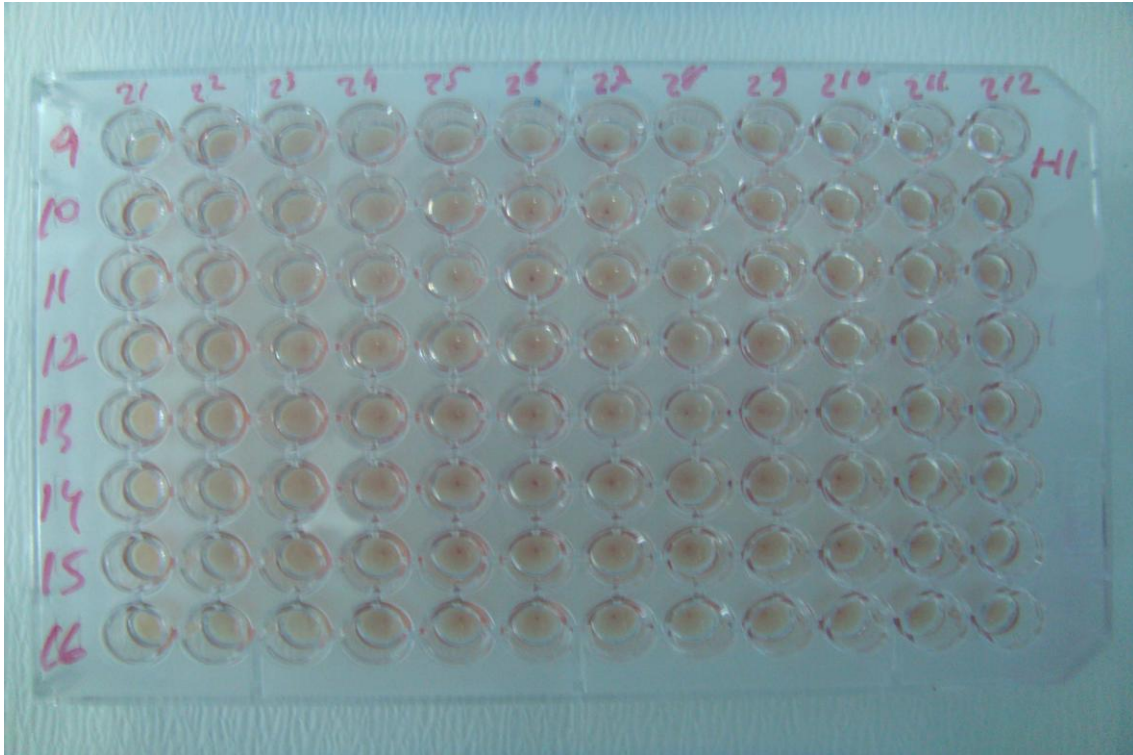
29, 36, 37 ve 39 nolu izolatlar hem H1 ve hem de H5 antiserumlarıyla pozitif reaksiyon verdi (Fotoğraf 20a ve 20b)

36 ve 37 nolu izolatlar HI testinde, aynı zamanda newcastle antiserumu ile de pozitif reaksiyon oluşturdu (Fotoğraf 21 ve Fotoğraf 22).

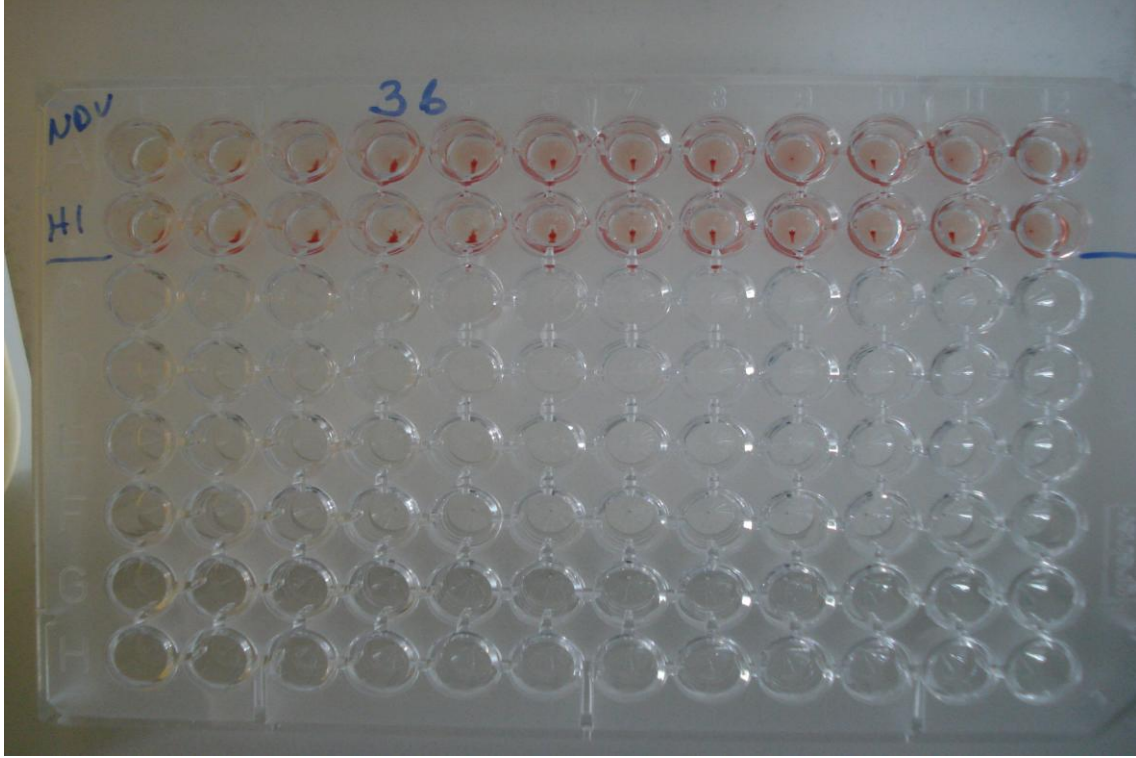
İzolatların hemaglütinasyon inhibisyon testinde antiserumlarla pozitif reaksiyon oluşturduğu titreler tablo 17’de sunuldu.



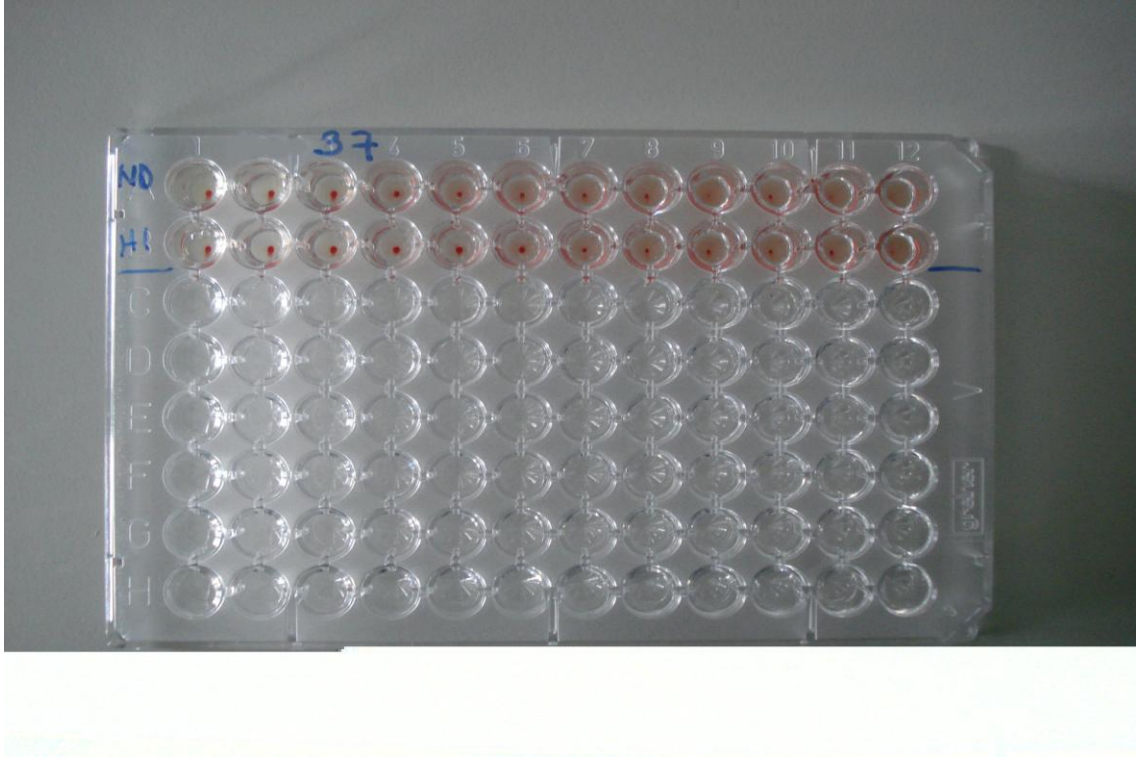
Fotoğraf 19a,b: Toplam 16 adet (H1-H16) hemaglütinin alt tipine ait antiserumlarla yapılan hemaglütinasyon inhibisyon testinde, H11 antiserumu ile pozitif sonuç veren izolat (594 nolu izolat)



Fotoğraf 20a,b: Toplam 16 adet (H1-H16) hemaglütinin alt tipine ait antiserumlarla yapılan hemaglütinasyon inhibisyon testinde, H1 ve H5 antiserumları ile pozitif sonuç veren izolat (39 nolu izolat)



Fotoğraf 21: 36 nolu izolatın hemaglütinasyon inhibisyon testinde newcastle ve avian influenza tip A H1 alt tipine ait antiserumlarla verdiği reaksiyonlar



Fotoğraf 22: 37 nolu izolatın hemaglütinasyon inhibisyon testinde, newcastle ve avian influenza tip A H1 alt tipine ait antiserumlarla verdiği reaksiyonlar

Tablo 17: İzolatların hemagglütinasyon inhibisyon testi ile elde edilen hemagglütinin alt tipleri ve titreleri

No	İzolat no	Virüs izolasyonu yapılan hayvan türleri		Hemagglütinin alt tipi
		Latince adı	Türkçe adı	
1	29	<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkgaga	H1: 1/512, H5: 1/64
2	36	<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkgaga	H1: 1/64, H5: 1/8
3	37	<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkgaga	H1: 1/128, H5: 1/16
4	39	<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkgaga	H1: 1/512, H5: 1/512
5	42	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	H1: 1/128
6	52	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	H1: 1/64
7	55	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	H1: 1/32
8	594	<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş patka	H11: 1/256
9	596	<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş patka	H11: 1/128
10	1752	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	H7: 1/128
11	1758	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	H7: 1/128

İzolatların neuraminidaz alt tiplerini belirlemek amacıyla Veterinary Laboratories Agency, VLA (Weybridge, İngiltere)’den temin edilen antiserumlarla yapılan tiplendirme sonucunda; 4’ünün N9, 3’ünün N7 ve 2’sinin N1 olduğu tespit edildi (Fotoğraf 23, Fotoğraf 24, Fotoğraf 25 ve Fotoğraf 26).

36 ve 37 nolu izolatlar RT-PCR H5N1 analizinde N1 olarak tiplendirildiği ve agaroz jel elektroforezde N1’e spesifik bant oluşturduğu halde, NI testiyle yapılan tiplendirmede antiserumların hiç biriyle reaksiyon vermedi ve dolayısıyla bu 2 izolat NI testinde tiplendirilemedi (Tablo 18).

İzolatların hemagglütinasyon inhibisyon ve neuraminidaz inhibisyon test sonuçları da tablo 19’da verildi.

Tablo 18: İzolatların neuraminidaz inhibisyon testi ile elde edilen neuraminidaz alt tipleri

No	İzolat no	Virüs izolasyonu yapılan hayvan türleri		Neuraminidaz alt tipi
		Latince adı	Türkçe adı	
1	29	<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkgaga	N1
2	36	<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkgaga	?
3	37	<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkgaga	?
4	39	<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkgaga	N1
5	42	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	N7
6	52	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	N7
7	55	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	N7
8	594	<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş patka	N9
9	596	<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş patka	N9
10	1752	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	N9
11	1758	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	N9



Fotoğraf 23: Neuraminidaz inhibisyon testinde elde edilen negatif sonuç



Fotoğraf 24: Neuraminidaz inhibisyon testi ile yapılan tiplendirmede N1 alt tipine ait izolat (29 nolu izolat)



Fotoğraf 25: Neuraminidaz inhibisyon testi ile yapılan tiplendirmede N7 alt tipine ait izolat (55 nolu izolat)



Fotoğraf 26: Neuraminidaz inhibisyon testi ile yapılan tiplendirmede N9 alt tipine ait izolat (1752 nolu izolat)

Tablo 19: İzolatların hemagglütinasyon inhibisyon ve neuraminidaz inhibisyon testinde belirlenen alt tipleri

No	Örnek alınan tür			Alt tip
	İzolat no	Latince adı	Türkçe adı	
1	29	<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkgaga	H1N1 / H5N1
2	36	<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkgaga	H1N? / H5N?
3	37	<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkgaga	H1N? / H5N?
4	39	<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkgaga	H1N1 / H5N1
5	42	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	H1N7
6	52	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	H1N7
7	55	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	H1N7
8	594	<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş patka	H11N9
9	596	<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş patka	H11N9
10	1752	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	H7N9
11	1758	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	H7N9

4. TARTIŞMA / SONUÇ

AI tip A virüsleri çeşitli kanatlı (tavuk, hindi ve evcil ördek gibi) ve bazı memeli (domuz, at, balina, fok balığı, vizon ve ren geyiği gibi) hayvanlarda infeksiyonlara neden olmaktadır. İnfluenza A virüslerinin taşınmasında göçmen kuşlar, önemli roller üstlenmektedir (HANSON ve ark., 2005; TUMPEY ve ark., 2005). *Anseriformes* (ördek, kaz ve kuğu gibi) ve *Charadriiformes* (sahil kuşları, su kenarında yaşayan kuşlar ve martılar gibi) takımlarına dahil olan türler, bu virüslerin önemli rezervuar konakçıları ve yayıcıları olarak kabul edilmekle birlikte, söz konusu hayvanların hastalığa özgü klinik bulgular sergilemedikleri belirtilmektedir (IVANOV ve ark., 2008). Tek iplikli RNA genetik materyali taşıyan AI tip A virüsleri, hayvanlardan insanlara da bulaşarak öldürücü infeksiyonlar oluşturabilmektedir. Canlılar arasındaki tür direncini aşacak nitelikte yüksek mutasyon yeteneğine sahip olan bu etkenler ve oluşturdukları infeksiyonlara olan ilgi son yıllarda artmıştır. Dünyanın birçok yerinde influenza A virüsleriyle ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (WOOD ve ark., 1997; ELLIS ve ZAMBON, 2001; GAIDET ve ark., 2007; NAGY ve ark., 2007; RUNSTADLER ve ark., 2007; DUGAN ve ark., 2008).

İnfluenza A virüsü şüpheli materyallerin laboratuvarlara taşınmasında farklı transport mediumlar kullanılmaktadır. Transport mediumların bileşimi, pH'sı, tuz oranı ve taşıma ısı materyallerin uygun koşullarda taşınması açısından önem arz etmektedir. Stallknecht ve ark. (1990), Louisiana'da avcılar tarafından 1986-1987 yıllarında öldürülen ördeklerden 1389 (605 *Anas discors*, 75 *Anas fulvigula*, 375 *Anas strepera* ve 334 *Anas crecca*) kloakal ve trakheal svap topladıklarını ve bunlardan 28 (%2) adet AI tip A virüsü izole ettiklerini bildirmişlerdir. Örnekleri 10000 U/ml penisilin G, 2 µg/ml streptomisin, 0.6 mg/ml kanamisin, 1 mg/ml gentamisin ve 0.02 mg/ml amfoterasin B içeren 3.6 ml brain-heart infusion brothtan oluşan transport mediuma aldıklarını ve test edinceye kadar -20°C'de sakladıklarını belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada (ALFONSO ve ark., 1995), alınan kloakal svaplar; 10000 U/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin içeren 2 ml PBS'e transfer edilerek, kullanılıncaya kadar -70°C'de saklanmıştır. Widjaje ve ark. (2004), yabani su kuşlarından aldıkları fekal ve kloakal örnekleri; 1000 U/ml penisilin G, 0.2 mg/ml streptomisin sulfat, 0.24 mg/ml gentamisin sulfat, 100 U/ml polimiksin B ve 50 U/ml mikostatin içeren %50 gliserollü PBS'e (pH: 7.2) yerleştirdiklerini ve -70°C'de sakladıklarını bildirmişlerdir. Çözdürülen örnekleri; 4000 U/ml penisilin G, 800 U/ml streptomisin sulfat, 400 U/ml polimiksin B ve 0.1 mg/ml gentamisin sulfat içeren 0.3 ml PBS ile eşit miktarda karıştırdıklarını ve 11 günlük embriyolu tavuk yumurtasına ekim yaptıklarını ifade etmişlerdir. Karabaş martılardan kloakal svapların

alındığı ve metot olarak RT-PCR'in uygulandığı başka bir çalışmada (FOUCHIER ve ark., 2005), örneklerin %10 gliserol, %0.5 laktalbumin, 200 U/ml penisilin, 200 µg/ml streptomisin, 100 U/ml polimiksin B sülfat, 250 µg/ml gentamisin ve 50 U/ml nistatin içeren Hanks' balanced salt transport mediuma (ICN, Zoetermeer, The Netherlands) alındığı ve kullanılıncaya kadar -70°C'de sakladığı bildirilmiştir. Hanks' balanced salt transport mediumun kullanıldığı ve materyallerin RT-PCR ile analiz edildiği diğer bir araştırmada (MUNSTER ve ark., 2005), çeşitli kanatlı türlerinden alınan kloakal svaplar %10 gliserol, 200 U/ml penisilin, 200 µg/ml streptomisin, 2000 U/ml polimiksin B ve 250 µg/ml gentamisin içeren vasata toplanmıştır. Nguyen ve ark. (2005), 2001 yılında Vietnam'da yaptıkları çalışmada, canlı kuş marketlerinde bulunan çeşitli kuş türlerine ait (98 tavuk, 39 güvercin, 33 kaz, 13 ördek ve 6 bildircin) 189 hayvandan kloakal ve orofarengeal svap alarak; %50 gliserol, 2000 U/ml penisilin, 250 µg/ml gentamisin, 2000 U/ml polimiksin B, 500 U/ml nistatin, 60 µg/ml ofloksasin ve 200 µg/ml sulfametoksazol içeren PBS transport mediuma koyduklarını, soğuk zincirde laboratuvara getirdiklerini ve çalışıncaya kadar -70°C'de sakladıklarını bildirmişlerdir. Afrika'daki çeşitli ülkelerde barınan yabani su kuşlarından alınan 4553 kloakal svap örneği; %10 gliserol, 10000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin, 25 µg/ml amfoterisin B ve 250 µg/ml gentamisin içeren PBS'e (pH: 7.0-7.4) aktarılmıştır. Örneklerin sıvı nitrojen tankında transfer edilip, inceleninceye kadar -70°C'de saklandığı bildirilmiştir (GAIDET ve ark., 2007). Lei ve ark. (2007), 2006 yılı Nisan ayında Çin'in Qinghai bölgesinde, 34 ördek, 40 martı ve 19 kuğudan aldıkları taze dışkı örneklerini toplamış ve 0.5-1 ml PBS ile %10 olacak şekilde sulandırarak, 6000 g'de 5 dk santrifüj etmişlerdir. Santrifüj sonrası elde ettikleri supernatantı eşit miktarda ve 40000 U/ml penisilin G ve 8000 U/ml streptomisin sülfat içeren PBS ile karıştırarak, çalışmalarında kullanmışlardır. Araştırmacılar, embriyolu tavuk yumurtasına ekim yaparak hayvanların 3'ünden (%3.2) HPAI H5N1 alt tipini izole ettiklerini bildirmişlerdir. Parmley ve ark. (2008) ise; Kanada'da 2005 yılında 4268 yabani ördekten aldıkları kloakal svaplarda, HPAI tip A virüslerini RRT-PCR ile saptamayı amaçladıkları çalışmalarında; materyalleri %10 gliserol, 200 U/µl penisilin, 200 µg/ml streptomisin, 100 U/µl polimiksin B sülfat, 250 µg/ml gentamisin ve 50 U/µl nistatin içeren Hanks' balanced salt transport mediuma aldıklarını ve test edinceye kadar -20°C'de sakladıklarını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, dışkı materyallerinin toplanması, taşınması ve saklanması amacıyla Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 2002) tarafından önerilen transport medium kullanıldı. Bu amaçla, 3 ml hacminde ve iki seri olarak PBS (8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1.15 gr Na₂HPO₄, 0.2 gr

KH₂PO₄/l distile su, pH: 7.2) hazırlandı. Bir serinin PBS'ine %20 gliserol ilave edildikten sonra steril edilip, penisilin G-2x10⁶ U/l, streptomisin-200 mg/l, gentamisin-250 mg/l ve nistatin-0.5 x 10⁶ U/l katıldı. Taze dışkı örnekleri transport medium içeren tüplere yaklaşık 1/3 oranında alınarak, soğuk zincirde ve kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı. Materyaller çalışmaya kadar -80°C'de saklandı. Taze olarak hazırlanan ve projenin devam ettiği 28 ay süresince kullanılan bu transport mediumun; ucuz olması, kısa sürede hazırlanması ve içerdiği antibiyotikler ile antifungal preparatın kolaylıkla temin edilebilmesinden dolayı, konuyla ilgili yapılacak benzer çalışmalarda kullanılabileceği ve araştırmacılara tavsiye edilebileceği sonucuna varıldı.

Çeşitli klinik materyallerde etkenin ortaya konulması ve hastalığın teşhisi amacıyla virüs izolasyon yöntemleri ve PCR metotları uygulanmaktadır (PLAYFORD ve DWYER, 2002; DE MARCO ve ark., 2004; ALEXANDER, 2008). Canlı kanatlılardan trakheal svap ve dışkı örnekleri; ölü hayvanlardan ise akciğer, karaciğer, hava keseleri, trakhea, beyin ve pankreas materyal olarak kullanılmaktadır (ARDA ve ark., 2002; CHEN ve ark., 2005; MUNSTER ve ark., 2005; GAIDET ve ark., 2007; CAPUA ve ALEXANDER, 2007; RUNSTADLER ve ark., 2007; ALEXANDER, 2008). PCR yöntemleri, örneklerde bulunan az miktardaki canlı veya ölü hastalık etkenlerini hızlı ve güvenilir olarak tespit edebildiği için son yıllarda yaygın kullanım alanı bulmuş ve çeşitli PCR metotları geliştirilmiştir. AI tip A virüslerinin saptanmasında one-step PCR (PODDAR, 2002; SPACKMAN ve ark., 2002), nested PCR (ELLIS ve ZAMBON, 2001; HERRMANN ve ark., 2001), reverse transcription PCR (ELLIS ve ZAMBON, 2001; LEE ve ark., 2001), multiplex-PCR (LI ve ark., 2001; HINDIYEH ve ark., 2005); RT-PCR (MUNCH ve ark., 2001; SPACKMAN ve ark., 2002; LEE ve ark., 2004; WIDJAJE ve ark., 2004; LODES ve ark., 2006; KARLSSON ve ark., 2007) ve RRT-PCR (SPACKMAN ve ark., 2002; SPACKMAN ve ark., 2006; HOFFMANN ve ark., 2007; MUNSTER ve ark., 2007; ALEXANDER, 2008) gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Ayrıca, daha çok insanlarda olmak üzere çeşitli hayvan türlerinde lateks aglütinasyon, VN, FA ve ELISA gibi farklı serolojik yöntemlerle de etkene ait antikorların varlığı ortaya konulabilmektedir (DAISY ve ark., 1979; CHERIAN ve ark., 1994; DE MARCO ve ark., 2003; DE MARCO ve ark., 2004; XU ve ark., 2004; CHEN ve ark., 2008).

RT-PCR ve RRT-PCR metotları, çeşitli kanatlı türlerinde AI tip A virüslerinin varlığını ortaya koymak amacıyla son yıllarda en fazla kullanılan yöntemler olmuşlardır. Her iki metodun, izolasyon yöntemi başta olmak üzere, konvansiyonel PCR yöntemlerine göre

daha avantajlı olduğu bildirilmektedir (STARICK ve ark., 2000; MUNCH ve ark., 2001; SPACKMAN ve ark., 2002; NGUYEN ve ark., 2005; RUNSTADLER ve ark., 2007).

Çoğunluğunu yeşilbaş ördeklerin oluşturduğu 3200 hayvandan alınan kloakal svapların RT-PCR ile analiz edildiği bir çalışmada (WALLENSTEN ve ark., 2004), hayvanların 384'ünde (%12) AI tip A virüsü bulunmuştur. Cattoli ve ark. (2004), İtalya'da Ekim 2002-Eylül 2003 arasında görülen H7N3 salgınlarında tavuk ve hindiler ile deneysel olarak infekte ettikleri hindilerden aldıkları toplam 232 trakheal svap örneğine, AI tip A virüslerinin saptanmasına yönelik one-step reverse transcription PCR ve RRT-PCR yöntemleri uygulayarak, klasik virüs izolasyon yöntemiyle karşılaştırdıkları bir çalışma yapmışlardır. Her iki PCR yönteminde ekstraksiyon ticari kitle yapılmış ve M gen bölgesi hedef alınmıştır. One-step reverse transcription PCR ile 50 (%21.6), RRT-PCR yöntemi ile 45 (%19.4) hayvanda pozitiflik saptanmıştır. Materyallerin 45'inden (%19.4) ise embriyolu yumurtaya ekim yöntemiyle AI tip A virüsü izole edildiği, HI ve NI testleriyle yapılan tiplendirmede tüm izolatların H7N3 alt tipine ait oldukları ifade edilmiştir. Fouchier ve ark. (2005), yaptıkları tarama çalışmasında önceden belirlenen karabaş martılardan alınan 10 kloakal svap örneğin 6'sını RT-PCR ve agaroz jel elektroforez ile AI tip A virüsü pozitif bulduklarını, RT-PCR ile pozitif bulunan örneklerden 11 günlük embriyolu tavuk yumurtasına ekimleri sonrasında 4'ünden virüs izolasyonu gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, 17 Haziran-6 Temmuz 2000 tarihleri arasında Pieterburen, Hollanda'da karabaş martılardan 90 kloakal svap örneği aldıklarını, bunlardan 3'ünü RT-PCR ile pozitif bulduklarını, ancak sadece 1'ini embriyolu tavuk yumurtasında üretebildiklerini belirtmişlerdir. RNA izolasyonunda high pure viral RNA isolation kit (Roche Molecular Biochemicals) kullandıklarını ifade etmişlerdir. Wallensten ve ark. (2006), İsveç'te 2003 yılı ilkbahar mevsiminde 358 yeşilbaş ördek ve 203 sunadan aldıkları kloakal svap örneklerini AI tip A virüslerinin prevalansını belirlemek amacıyla RT-PCR ile analiz etmişlerdir ve %3.4 oranında pozitiflik bulmuşlardır. Munster ve ark. (2006), 1997 yılından itibaren 27000'den fazla kloakal svap toplayarak, AI tip A virüsü varlığı yönünden RT-PCR ile test ettiklerini ve örneklerde %2.1 oranında pozitiflik saptadıklarını ifade etmişlerdir. Çalışmada, örneklerin çoğunun Hollanda ve İsviçre'deki farklı bölgelerden toplandığı, büyük çoğunluğu ördekler olmak üzere kaz, martı ve sahil kuşlarından oluşan 250'den fazla kuş türünden örnek alındığı, sadece *Anser albifrons*, *Anser anser*, *Anas platyrhynchos*, *Anas penelope*, *Anas clypatea*, *Anas acuta*, *Anas crecca*, *Larus ridibundus* ve *Uria alge* türlerinde pozitiflik saptadığı belirtmişlerdir. Gaidet ve ark. (2007); Nijerya, Çad, Mali, Malawi, Moritanya, Senegal,

Kenya, Mozambik, Tunus, Fas, Sudan ve Mısır'daki su kuşlarında, influenza A virüslerinin prevalansını belirlemek amacıyla, kloakal svaplar olarak RRT-PCR ile analiz etmişlerdir. Araştırmada, toplam 4553 hayvanın 159'unda (%3.5) influenza A virüsü yönünden pozitiflik belirlenmiştir. Hayvan türleri dikkate alındığında; 2864 ördekten 134'ü (%4.6), 409 sahil kuşundan 6'sı (%1.4), 438 su tavuğundan 3'ü (%0.6), 366 martıdan 14'ü (%3.8), 159 deniz kırlangıcından 2'si (%1.2) pozitif bulunurken, 317 karabatağın tamamı negatif olarak bulunmuştur. Nagy ve ark. (2007), Çek Cumhuriyeti'nde yabani kuşlarda AI tip A virüslerinin varlığını belirlemek amacıyla 2006 yılında yaptıkları çalışmada; 61 kuş türünden toplam 2101 örnek alıp RT-PCR ve embriyolu tavuk yumurtasına inokulasyon yaparak kültür yöntemiyle analiz etmişlerdir. Hayvanların 12'si (%0.6) RT-PCR pozitif bulunmuş, 10'undan (%0.5) ise influenza A virüsü izole edilmiştir. Kanada'da yabani ördeklerdeki HPAI tip A virüslerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, 6 coğrafi bölgedeki 56 farklı noktada barınan, toplam 4268 hayvandan kloakal svap alınmıştır. M1 genine yönelik olarak RRT-PCR ile yapılan analizde, ördeklerin 1572'si (%37) M1 pozitif olarak değerlendirilmiştir. M1 pozitif örnekler, H5 ve H7 alt tipleri yönünden RRT-PCR ile test edildiklerinde, 208'inin (%4.9) H5 alt tipinden olduğu bildirilmiştir. Çalışmada, H7 alt tipine ait bir pozitiflik elde edilmemiştir. Araştırmada en yüksek pozitiflik gerek M1 gerekse H5 yönünden yeşilbaş ördeklerden alınan örneklerde saptanmıştır (PARMLEY ve ark., 2008).

Bu çalışmada; 28 ay süreyle taranan Van Gölü Havzasında, 47 kanatlı türünden 1910 dışkı örneği toplandı ve bunların 51'i (%2.7), RT-PCR ile AI tip A virüsü M2 geni yönünden pozitif bulundu. Pozitiflik sayı ve oranları dikkate alındığında, bu projeye ait verilerin bazı çalışmalarla uyumlu (MUNSTER ve ark., 2006; WALLENSTEIN ve ark., 2006; LEBARBENCHON ve ark., 2007), bazı çalışmalardan yüksek (NAGY ve ark., 2007), bazı çalışmalardan (CATTOLI ve ark., 2004; PARMLEY ve ark., 2008) ise düşük olduğu görüldü. Çalışma bulgularının bazı literatür verilerinden daha düşük olması; Cattoli ve ark. (2004)'nın çalışmalarını yaptıkları dönemde, İtalya'da sık aralıklarla AI tip A virüs salgınlarının görülmesi ve materyallerini infekte olan sürülerden almış olmaları; Parmley ve ark., (2008)'nin ise AI tip A virüslerini yüksek oranda asemptomatik olarak taşıyan ve etkenin doğal rezervuarı oldukları bildirilen (SHARP ve ark., 1993; JUCKETT, 2006; CAPUA ve ALEXANDER, 2007) yabani ördeklerde çalışmış olmasıyla açıklanabilir. Bu çalışmada, RT-PCR'da en yüksek pozitifliğin ördek türleri olan kılkuş (%37.1) ve fıyuda (%22.5) saptanmış olması da araştırmacıların verileri ile (SHARP ve ark., 1993; JUCKETT, 2006; CAPUA ve ALEXANDER, 2007) uyumlu bulundu.

AI tip A virüs infeksiyonlarının prevalans ve insidensini tespit etmek amacıyla 1-5 yıl süren tarama çalışmaları yapılmaktadır (HALVORSON ve ark., 1984; STALKNECHT ve ark., 1990; OKAZAKI ve ark., 2000; HANSON ve ark., 2005; KHAWAJA ve ark., 2005; KRAUSS ve ark., 2007; LEBARBENCHON ve ark., 2007). Böylece infeksiyonun varlığı ve yayılması hakkında elde edilen bilgiler salgınlarla mücadelede kullanılmaktadır.

Stallknecht ve ark. (1990), Louisiana'da 1986 ve 1987 yılları arasında ördeklerden (605 *Anas discors*, 75 *Anas fulvigula*, 375 *Anas strepera* ve 334 *Anas crecca*) 1389 kloakal ve trakeal svap örneği almışlar ve ördeklerde eylül, kasım ve aralık-ocak süresince prevalans oranlarını sırasıyla %3.1, %2 ve %0.4 olarak bulduklarını, prevalanstaki farklılıkların sezon ve yaş grubundan kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Teksas'da, Şubat 2001-Şubat 2002 tarihleri arasında yapılan bir çalışmada (HANSON ve ark., 2005), Şubat 2001'de, 29 *Anas crecca*'dan 2 (%6.8) adet, 2 *Anas cyanoptera*'dan 1 (%50) adet, 32 *Anas discors*'dan 7 (%21.8) adet AI virüs izolasyonu yapıldığı, 3 *Anas fulvigula*'dan ise izolasyon yapılmadığı, Ağustos 2001'de 30 *Anas acuta*'dan 1 (%3.3) adet ve Şubat 2002'de 75 *Anas discors*'dan 11 (%14.6) adet AI virüs izolasyonu yapıldığı bildirilmiştir. Yıllara göre prevalansın sırasıyla %11 ve %15 olduğu ifade edilmiştir. Araştırmada, H2 ve H7 alt tiplerinin her iki yılda da belirlendiği, H1 ve H8'in ise 2001 yılında tespit edildiği belirtilmiştir. Wallensten ve ark. (2006), Kuzey Avrupa'da yabani kuşlarda AI virüs tarama çalışmasında 2003 yılı baharı boyunca Güney İsveç'te yakalanan 358 yeşilbaş ördek ve 203 sunadan aldıkları dışkı örneklerinin RT-PCR ile analiz edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, yeşilbaş ördeklerde nisan-haziran arası alınan örneklerde %3.4, mayıs ayındaki örneklerde ise %6.5 oranında virüs tespit ettiklerini, sunalarda ise prevalansın %1'in altında bulunduğunu ifade etmişlerdir. Krauss ve ark. (2007), 5 yıl boyunca yabani ördeklerden 490 kloakal örnek alındığını ve 98 (%20) influenza A virüsü izole edildiğini, sahil kuşları ve martılardan 1970 fekal örnek alındığını ve 114 (%5.8) influenza A virüsü izole edildiğini bildirmişlerdir. Lebarbenchon ve ark. (2007), Fransa'da, Eylül 2005-Mart 2006 arasında H5N1 virüslerin yayılmasında göçmen su kuşlarının özellikle ördeklerin rolünü araştırdıkları çalışmada, 17 su kuşu türüne ait 1345 kuştan kloakal svap örneği aldıklarını, RRT-PCR ile analizinde prevalansı %1.8 olduğunu ve çalışmada hiçbir materyalden H5N1 virüsü izole edilmediğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, RT-PCR ile pozitif 51 örneğin 38'i (%74.6) 2006, 2007 ve 2008 yıllarının ocak-şubat-mart-nisan aylarını kapsayan I. dönemde, 9'u (%17.6) 2006 ve 2007 yıllarının eylül-ekim-kasım-aralık aylarını kapsayan III. Dönemde, 4'ü (%7.8) ise 2008 yılının mayıs-haziran-temmuz-ağustos aylarını kapsayan II. dönemde toplanan dışkı

materyallerinde saptandı. Pozitif örneklerin yıllara göre dağılımı değerlendirildiğinde, pozitiflik oranının (%8.6) 2008 yılında en yüksek olduğu, bunu sırasıyla %6 ile 2007 yılı ve %3.5 ile 2006 yılının izlediği görüldü. Gerçekleştirilen bu projede, 51 pozitif örnekten 38'inin (%74.6) 2006, 2007 ve 2008 yılları kış-bahar döneminde tespit edilmiş olması, virüsün soğuk bölgelerde, soğuk ve rutubetli mevsimlerde daha çok görüldüğü ve daha hızlı yayıldığı görüşlerini (STALLKNECHT ve ark., 1990; DE MARCO ve ark., 2004; HANSON ve ark., 2005; WALLENSTEN ve ark., 2006) desteklemektedir.

HPAI virüsleri olarak kabul edilen H5 ve H7 alt tiplerinin çeşitli materyallerdeki varlığını ortaya koymak, tiplendirmeleri ve sekans analizlerini yapmak amacıyla da PCR esasına dayanan yöntemlerden yararlanılmaktadır (STARICK ve ark., 2000; MUNCH ve ark., 2001; SPACKMAN ve ark., 2002; SPACKMAN ve ark., 2006; NAGY ve ark., 2007; GRONESOVA ve ark., 2008; PARMLEY ve ark., 2008).

Ellis ve ark. (2004), Hong Kong'da 1997, 2001, 2002 ve 2003 yıllarında çocuklarda ve tavuksu kuşlarda patojenitesi yüksek avian influenza H5N1 salgınlarının oluştuğunu, yüksek ölüm oranlarının tavuksu kuşlarda görüldüğünü bildirmişlerdir. Ancak, 2002'nin sonuna doğru patojenitesi yüksek H5N1 alt tipinin iki su parkında bulunan su kuşlarında (kaz, ördek ve kuğu), flamingo ve diğer yabani kuşlarda (küçük akbalıkçıl), Hong Kong'ta iki ölü yabani gri balıkçıl ve bir adet karabaş martıda görülünceye kadar evcil kuşlarda, yabani su kuşlarında ve diğer yabani kuşlarda görülmediğini rapor etmişlerdir. Güney Kore'de bir ördek işletmesindeki ölü ördeklerden alınan sekal tonsil, dışkı ve böbrek örneklerinin embriyolu tavuk yumurtasına ekilmesiyle, hayvanların ölüm nedeninin H5N1 virüsü olduğu bildirilmiştir (KWON ve ark., 2005). Batı Çin'deki 92 göçmen kaz ve martıdan alınan kloakal ve trakheal svaplar, embriyolu tavuk yumurtasına ekilerek, hayvanların 28'inden (%30.4) H5N1 alt tipinin izole edildiği bildirilmiştir (CHEN ve ark., 2005). Nguyen ve ark. (2005), Vietnam'da gerçekleştirdikleri bir çalışmada, klinik olarak sağlıklı görünen 33 kazdan aldıkları kloakal svap örneklerini RT-PCR ile analiz ederek, hayvanların 2'sinde (%6.1) H5N1 yönünden pozitiflik saptadıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, sekans analizleri sonucu izolatların, 2001 yılında Vietnam'dan izole edilen H5N1 virüsü ile benzer olduğunu ifade etmişlerdir. Chen ve ark. (2006), Çin'in Quinghai Gölünde 2005 yılı nisan ayının sonlarından haziran ayına kadar yabani kuşlar arasında sadece bir H5N1 salgını görüldüğünü, hastalığın daha sonra göl popülasyonundaki diğer kuş türlerine yayıldığını, salgın süresince farklı zamanlarda toplanan ve 6 kanatlı türünden izole edilen 15 virüsün sekans analizlerinin 4 farklı H5N1 genotipini ortaya çıkardığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, H5N1 virüsünün Asya'da kümes

hayvanları arasında çok yaygın olduğunu ve son yıllara kadar sınırlı sayıda yabani kuşun etkilendiğini vurgulamaktadırlar. Lebarbenchon ve ark. (2007), HPAI H5N1 virüslerinin yayılmasında göçmen su kuşlarının (özellikle ördeklerin) rolünü araştırdıkları çalışmada, Camorqu'e'de (Fransa) Eylül 2005-Mart 2006 arasında 17 su kuşu türüne ait 1345 kuştan kloakal svap alındığını ve PCR ile AI tip A virüs prevalansının %1.8 bulunduğunu, HPAI H5N1 virüsü tespit edilmediğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, 303 örnek alınan çamurcunların 11'inden (%3.6), 275 örnek alınan yeşilbaş ördeklerin 8'inden (%2.9), 149 örnek alınan kaşıkgagaların 4'ünden (%2.7), 5 örnek alınan çıkırcınların 1'inden (%20) izolasyon yapıldığını, diğer türlerden izolasyon yapılamadığını belirtmişlerdir. Nagy ve ark. (2007) ise Çek Cumhuriyetindeki yabani kuşlardan izole ettikleri influenza A virüslerini, HI ve NI testleriyle tiplendirerek bunların H5N1 alt tipinden olduklarını bildirmişlerdir. Parmley ve ark. (2008), Kanada'da 2005 yılında yabani ördeklerde HPAI virüslerini RRT-PCR ile belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, toplam 4268 kloakal svap örneğinin %37'sinin M1 proteini pozitif, %5'inin H5 pozitif olduğunu ve örneklerin H7 geni yönünden ise incelenmediğini bildirmişlerdir.

H5N1 pozitif PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezde analiz edildiği araştırmalar incelendiğinde; Starick ve ark. (2000) influenza A virüslerinin alt tiplerine özgü primerler kullanarak, RT-PCR ile analizler yaptıklarını, ürünleri agaroz jel elektroforezde koşturduklarında H5N1 alt tipinden olan tüm izolatlarda pozitif bant saptadıklarını, Poddar (2002) H5N1, H1N1 ve H3N2 alt tiplerine spesifik primerler kullanılarak bu alt tiplerin multiplex-PCR ile ayırımlarının amaçlandığı bir çalışmada, PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezde analiz ederek, H5'e spesifik 351-bp ile N1'e spesifik 164-bp'lik bantlar belirlediğini, bildirmişlerdir.

Ülkemizdeki AI tip A virüs infeksiyonlarının gerek kanatlı hayvan (COVEN, 2006) gerekse insanlarda (ONCUL ve ark., 2006) oluşturdukları infeksiyonlardan H5N1 alt tipinin izole edilmiş olması nedeniyle, bu proje kapsamında olmamasına rağmen, RT-PCR ile AI M2 pozitif bulunan 51 örnek, H5N1 yönünden RT-PCR ile de incelendi. Kaşıkgaga türü ördekten alınan 4 örnek (%7.8) H5N1 yönünden pozitif bulundu. RT-PCR ürünleri aynı zamanda agaroz jelde yürütüldü, H5 ve N1'e özgü bantlar gözlemlendi. Bu sonuçla; ülkemizde kaşıkgaga türü ördeklerde H5N1 alt tipinin varlığı RT-PCR ile ilk defa ortaya konuldu. H5N1 saptanan örneklerin hepsinin kaşıkgaga türü ördeklere ait olması, influenza A virüslerinin taşınmasında ördeklerin önemini gösteren araştırmacıların sonuçlarıyla (CHEN ve ark., 2006; LEBARBENCHON ve ark. 2007; PARMLEY ve ark., 2008) uyumlu bulundu.

Kanatlı türlerinde AI tip A virüslerini ve bunların alt tiplerini belirlemeye yönelik olarak izolasyon ve PCR yöntemleri tek başına kullanıldığı gibi (SUSS ve ark., 1994; OKAZAKI ve ark., 2000; DE MARCO ve ark., 2003; DE MARCO ve ark., 2005; WALLENSTEN ve ark., 2006; PARMLEY ve ark., 2008) her iki yöntemin birlikte uygulandığı çalışmalar da (CATTOLI ve ark., 2004; MUNSTER ve ark., 2007; RUNSTADLER ve ark., 2007) bulunmaktadır.

AI tip A virüslerinin üretilmesinde embriyolu yumurtalar uzun yıllardır kullanılmakta ve bu yöntemin etkenin HA titresinin saptanmasına da yardımcı olduğu bildirilmektedir. Bu metot, PCR esasına dayanan metotlara göre zaman alıcı olarak görülmekte ve bu süreçte etkenin orijinal formundan uzaklaşabileceğine dikkat çekilmektedir. Bununla birlikte, yumurtalarda veya hücre kültürlerinde virüsün üretilmesi suş koleksiyonlarının oluşturulması bakımından önem arz etmektedir (MUNCH ve ark., 2001). İnfluenza A virüslerinin doku, svap ve dışkı örneklerinden virüs izolasyonu genellikle standart metotlara göre gerçekleştirilmektedir. Ancak kullanılan tekniklerde küçük modifikasyonlar yapılmaktadır. Virüs replikasyonu için yararlanılan embriyolu tavuk yumurtaları 8 (PLAKOKEFALOS ve ark., 2000), 9 (KWON ve ark., 2005), 10 (ALFONSO ve ark., 1995; SEO ve KIM, 2004) ve 11 (FOUCHIER ve ark., 2005) günlük yaşlarda tercih edilmektedir. Embriyolu tavuk yumurtalarının amniyotik ve allantoik boşluklarına 150-200 µl miktarında materyale ait supernatant inoküle edilmekte ve yumurtalar 35-37°C’de, 24-72 saat inkübe edilmektedir (CHEN ve ark., 2006).

Bu çalışmada, dışkı örneklerinden influenza A virüslerinin izolasyonu amacıyla 9-11 günlük embriyolu tavuk yumurtaları kullanıldı. Supernatantlar embriyolu tavuk yumurtalarının allantoik boşluğuna 150 µl miktarında inokule edilerek, 37°C’de 3-5 gün inkübe edildi. Araştırmada, RT-PCR ile pozitif oldukları saptanan materyallerden virüs izolasyonu, allantoik sıvıların toplanması, lam ve mikro hemaglutinasyon testleri, WHO ve OIE’nin (WHO, 2002; OIE, 2008) bildirdikleri metotlara göre gerçekleştirildi.

Okazaki ve ark. (2000), 1996-1998 yılları arasında Sibirya’da kuşların göç yolları üzerinde bulunan 11 farklı noktadan topladıkları materyallerle, embriyolu yumurtada izolasyon ve izolatların HI ve NI testleriyle alt tiplerinin belirlenmesini amaçladıkları çalışmada, 3897 fekal örneği test etmişlerdir. Bu örneklerden 3349’u ördek (*Anas platyrhynchos*, *Anas crecca* ve *Anas acuta*), 349’u *Cygnus sp.*, 131’i *Anser sp.*, 44’ü *Larus canus* ve 24’ü de sahil kuşlarından toplanmıştır. Araştırmacılar, ördeklerin 48’inden (%1.4) AI tip A virüsü izole ettiklerini, diğer kuş türlerinden ise izolasyon olmadığını bildirmişlerdir.

Başka bir çalışma (DE MARCO ve ark., 2003) ise serbest olarak yaşayan su kuşlarında yapılmıştır. Çalışmada 469 adeti ördeklerden ve 333 adeti ise su tavuklarından olmak üzere toplam 802 adet kloakal svap, virüs izolasyonu açısından incelenmiştir. Ördeklerin 18'inden (%3.8), su tavuklarının ise 4'ünden (%1.2) AI tip A virüsleri izole edilmiştir. Campitelli ve ark. (2004), İtalya'da, 1999-2000 yılları arasında 311 yabancı ördekten aldıkları kloakal svap örneklerini embriyolu tavuk yumurtasına ekerek, hayvanların 20'sinden (%6.4) influenza A virüsü izole ettiklerini bildirmişlerdir. Yine İtalya'da yapılan bir çalışmada (DE MARCO ve ark., 2005), sulak alanlarda barınan 150 martı, 162 su tavuğu ve 326 ördekten alınan 638 kloakal svap örneği, embriyolu kanatlı yumurtalarına inokule edilerek, AI tip A virüslerinin yaygınlığının belirlenmesi amaçlamıştır. Çalışmada, sadece ördeklerin 5'inden (%1.5) AI tip A virüslerinin izole edildiği ifade edilmiştir. Khawaja ve ark. (2005), Kasım 2003-Mayıs 2004 arasındaki AI tip A virüs salgını döneminde, Pakistan'daki belirli bölgelerden seçilen kuş türlerinde AI virüs varlığının araştırılması amacıyla yaptıkları çalışmada, serolojik inceleme ve virüs izolasyonu için 7 yabancı kuş türünden kan, kloakal svap ve doku örnekleri topladıklarını ve materyallerden %6.7 oranında virüs izole ettiklerini bildirmişlerdir. Embriyolu tavuk yumurtasında yapılan izolasyon sonrasında yapılan HA testinde, 84 örneğin 8'inin (%9.5) HA pozitif bulunduğunu, aynı zamanda tüm örneklerin AI virüs polivalan antiserum kullanılarak AGP testi ile analiz edildiğini ve 4'ünde (%4.8) pozitiflik belirlendiğini ifade etmişlerdir. Araştırmacılar, referans antiserumlar kullanılarak gerçekleştirilen VN testi sonucunda 84 örneğin 8'ini (%9.5) H9N2 açısından pozitif, tüm örneklerin ise H7N3 negatif bulunduğunu belirtmişlerdir. H9N2 taşıyıcılık oranının türlere göre değerlendirildiğinde kartallarda %50, kargalarda %17, ördeklerde %10, kazlarda %30 ve kümes hayvanlarında %33 olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar aynı zamanda, H9N2 alt tipini de yukarıda belirtilen kuşların kloakal svaplarında araştırdıklarını; kaz, kümes hayvanları ve kartallarda %50, kargalarda ise %75 oranında pozitiflik saptandıklarını bildirmiştir. Araştırmacılar sonuç olarak, AI tip A virüs infeksiyonlarının yayılmasında yabancı kuşların önemli oranda taşıyıcı olabileceği kanısına vardıklarını belirtmişlerdir. Douglas ve ark. (2006), 2003 ve 2004 yıllarının Mayıs ve Ekim ayları boyunca Barbados'ta kışı geçiren farklı göçmen kuş türlerinden aldıkları 168 kloakal svabı, 9-10 günlük embriyolu tavuk yumurtasına ettiklerini, 2 adet influenza A virüsü ve 1 adet de newcastle virüsü izole ettiklerini bildirmişlerdir. Ördeklerde influenza A virüsü izolasyon oranını %2.7 olarak saptandıklarını belirtmişlerdir. Araştırmacılar çalışma sonucunda, kışı bu bölgede geçiren su kuşlarında influenza A virüsünün varlığını, ördeklerde kıyı kuşlarından daha çok virüs izolasyonu

gerçekleştirildiğini ve bu virüslerin lokal ve bölgesel kanatlılar, domuz ve yaban hayatına bulaştırılma riski olduğunu ifade etmişlerdir. Krauss ve ark. (2007), 5 yıl devam eden ve kloakal svapları kullandıkları çalışmalarında; 590 yabani ördeğin 98'inden (%16.6), martıların da içinde bulunduğu 1970 sahil kuşunun 114'ünden (%5.8) AI tip A virüsü izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Alaska'da yaşayan yabani ördeklerdeki influenza A virüslerini ortaya koymak amacıyla virüs izolasyonu ve RT-PCR metotlarının kullanıldığı bir çalışmada (RUNSTADLER ve ark., 2007), her ördekten ikişer adet olmak üzere toplam 500 kloakal svap alınarak test edilmiştir. Ördeklerin 74'ü (%14.8) RT-PCR, 42'si (%8.4) ise embriyolu yumurtada yapılan izolasyonla pozitif bulunmuştur. RT-PCR ile 72 yeşilbaş ördeğin 19'unda (%26.4), 417 adet kılkuşuğun 54'ünde (%12.9), 11 adet çamurcunun ise 1'inde (%9); embriyolu tavuk yumurtasında izolasyon ile yeşilbaş ördeklerin 8'inde (%11.1), kılkuşukların 34'ünde (%8.1) izolasyon gerçekleştirilmiş, çamurcundan ise AI tip A virüsü izole edilmediği belirtilmiştir. Avrupa kıtasının farklı bölgelerindeki göçmen kuşlarda influenza A virüslerinin prevalansını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada (MUNSTER ve ark., 2007), 65 familyaya ait 323 kanatlı türünden alınan 24269 adet kloakal örnek, çalışma kapsamında incelenmiştir. Ördekler toplu olarak değerlendirildiğinde, RRT-PCR ile 13751 hayvanın 817'si (%5.9) AI tip A yönünden pozitif bulunmuştur. Ördek türleri dikkate alındığında; 8938 yeşilbaş ördekten 649'u (%7.2), 2538 fiyudan 76'sı (%3), 940 çamurcundan 60'ı (%6.4), 448 kılkuşuktan 13'ü (%2.9), 298 boz ördekten 8'i (%2.7), 135 kaşık gagadan 5'i (%3.7), 355 sunadan 2'si (%0.6) ve 62 tepeli patkadan 2'si (%3.2) pozitif bulunmuştur. Toplam 6 kaz türüne ait 6428 örnekten 113'ü (%1.8), 2 kuğu türüne ait 200 örnekten 4'ü (%2), 4 martı türüne ait 2602 örnekten 22'si (%0.8), 2 sahil kuşu türüne ait 234 örnekten 2'si (%0.9), 1 deniz kuşu türüne ait 817 örnekten 3'ü (%0.4) ve 237 sakarmekeden 1'i (%0.4) RRT-PCR ile pozitif bulunmuştur. RRT-PCR ile pozitif bulunan toplam 962 örnek, 9-11 günlük embriyolu tavuk yumurtalarına ekilmiş ve 332'sinden (%34.5) influenza A virüsü izole edilmiştir.

Bu çalışmada, RT-PCR ile incelen 1910 dışkı materyalinin 51'i (%2.7) AI M2 yönünden bulunmuştur. RT-PCR pozitif bulunan 51 örnek, embriyolu tavuk yumurtasına ekilmiş ve bunların 11'inden (%21.6) AI tip A virüsü izole edilmiştir. İzolasyon oranına göre RT-PCR ile daha fazla sayıdaki materyalde pozitiflik saptanmış olması, diğer araştırma sonuçlarıyla (FOUCHIER ve ark., 2005; MUNSTER ve ark., 2007; NAGY ve ark., 2007; RUNSTADLER ve ark., 2007) benzer bulunmuştur.

İnsanlardaki influenza A virüs antijenlerini hızlı saptamaya yönelik olarak geliştirilen antigen capture immunoassay test kitleri, son yıllarda kanatlılarda da kullanılmaktadır. Bu kitler, influenza A virüslerinin nükleoproteinleri ile reaksiyon veren monoklonal antikorları içermektedir. Bunların en önemli avantajları arasında; yaklaşık 15 dk içinde örneklerin değerlendirilebilmesi, komplike olmaması ve kolay uygulanabilmesi, özel ve pahalı cihazlara ihtiyaç duymaması, hastalıkla mücadeleye daha erken başlanılmasına olanak vermesi ve bu nedenle ekonomik kaybın daha az olması nedeniyle infeksiyonun kısa sürede kontrol altına alınmasına imkan vermesi sayılabilir (KODİHALLI ve ark., 1993; DAVISON ve ark., 1998; CATTOLI ve ark., 2004; ALEXANDER, 2008; CATTOLI ve TERREGINO, 2008).

Bu çalışmada, AI tip A virüsü şüpheli allantoik sıvılar, öncelikle HA özellikleri bakımından %1'lik yıkanmış tavuk eritrositi ile lamda HA testinde analiz edildi. Pozitif sonuç verenler, aynı eritrosit sulandırması kullanılarak mikro HA testi ile incelendi. Araştırmada, allantoik sıvılar hızlı test kiti (Avian influenza virus type A antigen test kiti, Symbiotic Cor., USA) ile de test edildi ve lam HA testinde pozitif bulunan izolatların tamamı bu kitle de pozitif sonuç verdi.

Göçmen ya da yerli hayvanlarda, gerek izolasyon gerekse PCR yöntemlerinden elde edilen pozitiflik oranları, hayvan türlerine göre karşılaştırıldığında, araştırma sonuçlarının birbirinden farklı olduğu görülmektedir. (ALFANSO ve ark., 1995; OKAZAKI ve ark., 2000; ELLIS ve ark., 2004; CHEN ve ark., 2005; HANSON ve ark., 2005; KHAWAJA ve ark., 2005; DOUGLAS ve ark., 2006; MUNSTER ve ark., 2007; RUNSTADLER ve ark., 2007). Bununla birlikte, *Anseriformes* ve *Charadriiformes* takımlarına ait su kuşlarının virüsün barındırılması ve taşınmasında önemli rolleri bulunmaktadır (HINSHAW ve ark., 1982; WEBSTER ve ark., 1992; MUNSTER ve ark., 2005; OLSEN ve ark., 2006). Stallknecht ve ark. (1990), AI tip A virüslerini *Anseriformes*'lerin önemli üyeleri olan yerli Kuzey Amerika ördeği, kaz ve kuğularının 42 türünün 20'sinde saptamışlardır. Munster ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada, bütün AI virüs izolatlarının Doğu Atlantik Göç Yolu boyunca göç eden *Anseriformes* ve *Charadriiformes* takımlarına ait kuşlardan elde edildiğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, RT-PCR ile pozitif olarak değerlendirilen 14 kanatlı türünden 9'unun (%64.3) *Anseriformes* takımına ait ördek türlerinden, 4'ünün (%28.6) *Charadriiformes* takımına ait sahil kuşu ile martılardan ve 1'inin de (%7.1) *Phoenicopteriformes* takımına ait flamingolardan olması, embriyolu tavuk yumurtasında izole edilen 11 izolatın tamamının da *Anseriformes* takımına ait ördek türlerinden elde edilmesi, bulaşmada su kuşlarının rollerini ve önemini gösteren literatürlerle (ALFONSO ve ark., 1995; (SHARP ve ark., 1997; DE

MARCO ve ark., 2003; WALLENSTEN ve ark., 2004; HANSON ve ark., 2005; DE MARCO ve ark., 2005; KRAUSS ve ark., 2007, LEBARBENCHON ve ark., 2007; MUNSTER ve ark., 2007) uyumlu bulundu. Yine bu çalışmayla; yerli 4 kanatlı hayvan türünde [suna, yeşilbaş ördek, karabaş (gülen) martı ve Van martısı] RT-PCR ile pozitiflik saptanmış olması, ülkemizde influenza tip A virüslerinin neden olduğu ilk ve tek insan ölüm vakalarının görüldüğü bölgemizde, bu hayvanlarla içiçe yaşayan insanlar için ciddi bir risk oluşturması açısından da kayda değer ve önemli bulundu.

İnfluenza A virüslerin alt tiplerin belirlenmesine yönelik çalışmaların daha çok materyallerin embriyolu yumurtalara ekim yapılması ve sonrasında toplanan allantoik sıvılara uygulanan HI ve NI testleriyle yapıldığı görülmektedir (HALVARSON ve ark., 1985; SUSS ve ark., 1994; ALFONSO ve ark., 1995; OKAZAKI ve ark., 2000; TUMPEY ve ark., 2002; CHEN ve ark., 2006; MUNSTER ve ark., 2007; RUNSTADLER ve ark., 2007). Çeşitli kanatlı türlerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde, çok farklı alt tipte influenza A virüslerinin izole edildiği bildirilmektedir (ALFONSO ve ark., 1995; OKAZAKI ve ark., 2000; CAMPITELLI ve ark., 2004; DE MARCO ve ark., 2005; KRAUSS ve ark., 2007; MUNSTER ve ark., 2007; RUNSTADLER ve ark., 2007). Bu çeşitliliğin en önemli nedenlerinden biri, influenza A virüslerinin sahip oldukları yüksek mutasyon yeteneğidir (TOLLIS ve DI TIRANI, 2002; KNOSSOW ve SKEHEL, 2006; ALEXANDER, 2008). HA gösteren virüslerin antijenik karakterleri, referans influenza A virüslerinin yüzey antijenlerine karşı hazırlanan mono spesifik antiserumlar veya tam virüs antijenlerine karşı tavuk ya da tavşanlardan elde edilen hiperimmün antiserumlar kullanılarak HI (WIDJAJE ve ark., 2004) veya AGP (DOUGLAS ve ark., 2006) testleriyle de saptanabilmektedir. İzolatların neuraminidaz alt tipleri ise genellikle NI testi ile belirlenmektedir. Ayrıca, spesifik primerler kullanılarak daha çok hemaglutinin alt tiplerine yönelik olmak üzere neuraminidaz alt tiplerinin belirlenmesi amacıyla RT-PCR yöntemi de uygulanmaktadır (LEE ve ark., 2001; ELLIS ve ark., 2004).

Alfonso ve ark. (1995), su kuşlarından izole ettikleri 27 AI tip A virüsünün HI ve NI testleriyle tiplendirilmesinde, virüslerden 24'ünü (%88.8) tiplendirdiklerini, 3'ünü (%11.1) ise tiplendiremediklerini ifade etmişlerdir. Çalışmada, tiplendirilen izolatların 13'ü (%48.1) H6N8, 6'sı (%22.2) H4N8, 2'si (%7.4) H4N2 ve 1'er (%3.7) adeti de H2N3, H4N6 ve H7N10 olarak identifiye edilmiştir. Okazaki ve ark. (2000), 3897 ördeğe ait fekal materyallerden izole ettikleri 48 AI tip A virüsünü HI ve NI testleriyle tiplendirmişlerdir.

Araştırmacılar, izolatlardan 20'sinin (%41.6) H4N6, 9'unun (%18.7) H11N9, 5'inin (%10.4) H3N8, 2'ser (%4.1) adetinin H11N6 ve H9N2, 1'er (%2) adetinin ise H1N1, H4N9, H5N3, H5N4, H6N2, H6N7, H8N1, H8N3, H11N1 ve H13N6 alt tipinden olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışma (DE MARCO ve ark., 2003) ise serbest yaşayan su kuşlarında yapılmıştır. Çalışmada 469'u ördeklerden ve 333'ü de su tavuklarından olmak üzere toplam 802 adet kloakal svap, virüs izolasyonu amacıyla test edilmiştir. Ördeklerin 18'inden (%3.9), su tavuklarının ise 4'ünden (%1.2) AI tip A virüsü izole edilmiştir. Sakarmeke orijinli izolatlardan 2'si H10N8, 1'er adeti H3N8 ve H1N1; yeşilbaş ördeğe ait izolatlardan 16'sı H1N1, 1 adeti H5N2; sunaya ait 1 izolat ise H1N1 olarak tiplendirilmiştir. Campitelli ve ark. (2004), ördek orijinli 20 AI tip A virüsünün HI ve NI testleriyle yapılan tiplendirmesinde; izolatlardan 6'sının (%30) H1, 4'ünün (%20) H11, 2'ser adetinin (%10) H2, H3, H6 ve H7, 1'er adetini ise H4 ve H5 olduğunu bildirmişlerdir. De Marco ve ark. (2005), 638 kloakal svap örneğinden izole ettikleri 5 izolatın tiplendirilmesinde; 2'sinin H2N3, 2'sinin H11N6 ve 1'inin de H1N1 olduğunu bildirmişlerdir. Sahil kuşları ve yabani ördeklerden sağlanan 2560 materyalden izole edilen 212 influenza A virüsünün HI ve NI ile tiplendirmesinde, sahil kuşlarında en çok saptanan hemaglütinin alt tipleri H1 (%19.5), H10 (%17.5), H9 (%13.5) H3 (%12.4) ve H7 (%11.6); ördeklerde ise H1 (%24), H4 (%24), H10 (%17.7) ve H3 (%16.7) olduğu bildirilmiştir. En çok belirlenen neuraminidaz alt tipleri sahil kuşlarında N7 (%24.7) ve N9 (%24.3); ördeklerde ise N4 (%25) ve N6 (%25) olduğu ifade edilmiştir. Alt tipler birlikte değerlendirildiğinde; sahil kuşlarında en yüksek oranda H7N3 (%19.8), H10N7 (%17.5) ve H1N9 (%15.1); ördeklerde ise H4N6 (%21.9), H1N4 (%18.8) ve H10N7 (%16.7) saptandığı bildirilmiştir (KRAUSS ve ark., 2007). Munster ve ark. (2007), *Anseriformes* ve *Charadriiformes* takımlarına ait kuşlardan izole ettikleri 332 AI tip A virüsünü, HI ve NI testleriyle tiplendirmişlerdir. Hemaglütinin ve neuraminidaz alt tipleri birlikte değerlendirildiğinde 55 farklı alt tipin belirlendiği çalışmada, en yüksek oranda H4N6 (%13.6), H7N7 (%10.5) ve H6N2 (%9.9) saptanmıştır. Alt tipler ayrı ayrı değerlendirildiğinde, hemaglütinin alt tipine ait en yüksek pozitiflik %17.8 ile H6'da, neuraminidaz alt tipinde ise %19.9 ile N2'de belirlenmiştir. Diğer alt tiplerin dağılımlarının ise hemaglütinin yönünden H7 (%11.1), H3 (%9.6), H11 (%8.7), H1 (%8.1), H2 (%7.8), H5 (%7.5), H10 (%4.8), H12 (%2.1), H8 (%1.8), H13 (%1.8), H9 (%1.5), H16 (%1.2); neuraminidaz yönünden N6 (%17.8), N8 (%14.8), N7 (%13), N9 (%10.8), N3 (%10.2), N1 (%8.7), N5 (%2.7), ve N4 (%2.1) olduğu bildirilmiştir. Çalışmada, H13 ve H16 tiplerinin daha çok *Charadriiformes*'lerden, H6 alt tipinin ise yeşilbaş ördek hariç diğer yabani

kuşlardan daha fazla izole edildiği bildirilmiştir. N5 ve N7 alt tipleri sadece yeşilbaş ördeklerden, N3, N6 ve N8'in sadece *Charadriiformes*'lerden, N1, N2 ve N8'in ise sadece kaz ve kuğulardan izole edildiği ifade edilmiştir. Alaska'daki yabani ördeklerde yapılan bir çalışmada (RUNSTADLER ve ark., 2007), izole edilen toplam 42 izolatın HI ve NI testleriyle yapılan tiplendirmesinde, izolatların 38'inin (%90.4) tiplendirildiği, 4'ünün (%9.5) ise tiplendirilemediği bildirilmiştir. Tiplendirilen izolatların ördek türlerine göre dağılımları dikkate alındığında, yeşilbaş ördeklerden 2'ser adet H3N8, H4N6, H8N4, H12N5; kılkuysuktan ise 10 adet H3N8, 9 adet H4N6, 7 adet H12N5, 3 adet H3N6 ve 1 adet de H8N4 alt tipinin belirlendiği rapor edilmiştir.

Bu çalışmada, izolatların hemaglütinin tiplerini belirlemek amacıyla Veterinary Laboratories Agency, VLA (Weybridge, İngiltere)'den ve Avian Influenza OIE/FAO Reference Laboratory, IZSV (Padova, İtalya)'dan sağlanan antiserumlar birlikte kullanıldı. İzolatların 3'ü H1, 2'si H7 ve yine 2 tanesi H11 olarak tiplendirildi. Bu izolatlardan çamurcun türü ördeklere ait olan 5 izolatın 3'ü H1, 2'si H7 idi. Bu sonuç, çamurcunlardan en fazla H1, H2, H5 ve H7 alt tiplerinin izole edildiğini belirten çalışmanın bulgularıyla (KRAUSS ve ark., 2004) uyumlu bulundu. 29, 36, 37 ve 39 nolu izolatlar hem H1 ve hem de H5 antiserumlarıyla pozitif reaksiyon verdi. 36 ve 37 nolu izolatlar HI testinde, aynı zamanda newcastle antiserumu ile de pozitif reaksiyon oluşturdu. Hemaglütinin alt tipine göre net bir şekilde tiplendirilemeyen bu izolatlar; aynı hayvandan 2 farklı alt tipin (H1 ve H5) birlikte izole edilmesiyle açıklanabileceği gibi (SCHIMADA ve ark., 2006; GRONESOVA ve ark., 2008), H1 ve H5 alt tipleri arasındaki muhtemel kros reaksiyonlarla da ilgili olabilir. Slovakya'da aynı hayvanlardan kloakal ve orofarengeal svaplar alınarak nested-PCR ile analiz edildiği bir çalışmada (GRONESOVA ve ark., 2008), bazı hayvanlardan 2 farklı alt tipin birlikte saptandığına dikkat çekilmiştir. Çalışmada; bir *Prunella modularis*'in orofarengeal svabında H10N6, kloakal svabında H7N6; *Emberiza schoeniclus*'un orofarengeal svabında H9N2, kloakal svabında H3N5 ve bir *Phylloscopus collybita*'nın orofarengeal svabında H9N5, kloakal svabında ise H6N5 alt tiplerinin saptandığı bildirilmiştir. Su kuşlarında yapılan bir çalışmada, hayvanlardan izole edilen 27 AI tip A virüsünün HI ve NI ile tiplendirilmesinde, 3 izolatın tiplendirilemediği bildirilmiştir (ALFONSO ve ark., 1995). Fouchier ve ark. (2005) ise sadece HI testini kullanarak, karabaş martılardan izole ettikleri 6 adet AI tip A virüsünden 4'ünü tiplendiremediklerini ifade etmişlerdir.

İzolatların neuraminidaz tiplerini belirlemek amacıyla Veterinary Laboratories Agency, VLA (Weybridge, İngiltere)'den temin edilen antiserumlar kullanıldı. Test

sonucunda; izolatlardan 4'ünün N9, 3'ünün N7 ve 2'sinin N1 olduğu tespit edildi. 36 ve 37 nolu izolatlar RT-PCR'da H5N1 analizinde N1 olarak tiplendirildi ve agaroz jel elektroforezde de N1'e spesifik 198-bp'de bant oluşturdu. Bununla birlikte bu 2 izolat, NI testiyle yapılan tiplendirmede antiserumlarla (N1-N9) reaksiyon vermedi ve dolayısıyla NI testinde tiplendirilemedi. AI tip A ve newcastele virüslerinin kullanılarak yapılan bir deneysel çalışmada, bu etkenler arasında %40 oranında çapraz korumanın olduğu rapor edilmektedir (SWAYNE ve ark., 2003). Bu çalışmada; HI testinde newcastle pozitif olan 2 izolatın, NI testinde antiserumların hiç biriyle tiplendirilememiş olması, Swayne ve ark. (2003)'nın verileri de dikkate alındığında, newcastle virüsünün bu reaksiyonu perdeleyebileceği ihtimalini düşündürdü.

RT-PCR ve agaroz jel elektroforez sonuçları da birlikte değerlendirildiğinde; aynı tür hayvanlardan elde edilen 4 izolatta 2 farklı hemagglütinin alt tipi (H1 ve H5) birlikte tespit edilmiş ve 2 izolatın da NI tiplendirilmesi yapılamamıştır. Bu izolatlar hakkında kesin bir kanaate varabilmek için sekans analizlerinin yapılması gerekmektedir.

AI tip A virüslerinin neden olduğu salgınların etiyolojisini ve salgınlar arasındaki ilişkiyi ortaya koymada, kuş hareketleri, karışık populasyonların artması ve göçmen su kuşları ile temas gibi avian influenza için iyi bilinen risk faktörlerinin belirlenmesi son derece önemlidir (CAPUA ve ark., 1999; ELLIS ve ark., 2004). Hurt ve ark. (2006), Avustralya'da yaptıkları survey çalışmasında, göçmen kuşların kısa sürede uzun mesafelere uçabilmelerinden dolayı, HPAI virüslerinin infeksiyon görülmeyen diğer ülkelere transferinde potansiyel risk taşıdıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, coğrafik olarak uzak olan ülkelere elde edilen izolatların birbirleri ile direkt ilişkili olması nedeniyle, etkenlerin ülkeler ve hatta kıtalar arası taşınmanın önemini vurgulamaktadırlar. Türkiye, göçmen kuşların büyük göç yollarının üzerinde bulunmaktadır. Göç yolları üzerinde göçmen kuşların konaklaması için uygun geniş sulak alanlar yer almaktadır. Her yıl 500000'den fazla göçmen kuş bu göç yollarını kullanmaktadır. Türkiye, hem göçmen kuşların göç yolları üzerinde bulunması hem de dünya kanatlı endüstrisi ile yakın iş ilişkisinden dolayı AI tip A virüsleri tarafından tehdit edilen büyük bir risk altındadır (COVEN, 2006). Ülkemizde ilk avian influenza vakası Ekim 2005'te Manyas-Balıkesir'de görülmüş, hastalığın yabani kuşlardan bulaştığı ve HPAI H5N1 virüsü tarafından oluşturulduğu tespit edilmiştir. İkinci vaka Aralık 2005'te Iğdır'da, üçüncüsü Şubat 2007'de Gercüş-Batman'da ve dördüncüsü ise Şubat 2008'de Çaycuma-Zonguldak'ta görülmüştür. Türkiye'de görülen ilk influenza A virüs salgınından sonra Manyas Kuş Cenneti ve Uluabat Kuş Cennetindeki değişik yabani kuş türleri olan boz ve kara

ördek, su çulluğu, karabatak, su tavuğu, sakarmeke, balıkçıl, kaşıkga, çamurcun, ak pelikan, martı ve kumrudan 49 örnek alınmıştır. Kloakal svaplar ve organ örneklerinde virüs izolasyon çalışmaları yapılmış ancak tüm örnekler AI tip virüs yönünden negatif bulunmuştur (ÇÖVEN, 2009). FAO, 19 Mayıs Üniversitesi ve Sivil Toplum Örgütleri (Kuş Araştırmaları Derneği, Doğa Derneği) işbirliği ile yürütülen ve yabani kuşlarda yapılan bir çalışmada; Yumurtalık Lagünleri-Adana, Kızılırmak Deltası, Bafra-Samsun ve Nallıhan Kuş Cenneti-Ankara'da 22 türe ait 329 yabani kuştan, 692 örnek (trakheal ve kloakal svap) toplanarak, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü (Ulusal Referans Laboratuvarı, Bornova-İzmir) ve French Agricultural Research Centre for International Development'da incelenmiştir. Örneklerde H5N1 ve diğer HPAI alt tiplerinin tespit edilemediği, ancak LPAI virüslerinin saptandığı bildirilmiştir. Materyaller toplam olarak değerlendirildiğinde, RRT-PCR ile örneklerin %13.7'si AI tip A virüsü bakımından pozitif, %8.1'i ise şüpheli olarak tespit edilmiştir. RRT-PCR ile Kızılırmak Deltasından alınan 372 örneğin 71'i (%19) pozitif, 38'i (%4.8) şüpheli, Yumurtalık Lagünlerinden alınan 308 örneğin 24'ü (%7.7) pozitif, 18'i (%5.8) şüpheli ve Nallıhan Kuş Cennetinden alınan 16 örneğin 1'i (%6.2) pozitif, 1'i (%6.2) ise şüpheli bulunmuştur. RRT-PCR pozitif örneklerin 1'inden (%1) (Yeşilbaş ördek, Kızılırmak Deltası) virüs izole edildiği ve izolatin H12N2 olarak tiplendirildiği belirtilmiştir (ÇÖVEN, 2009).

Şubat 2006 yılında başlayan ve 28 ay süreyle Van Gölü Havzasındaki rastlantısal, transit göçer, kış ziyaretçisi, göçmen ve yerli 47 kanatlı türüne ait toplam 1910 dışkı örneğinin, avian influenza tip A M2 geni yönünden RT-PCR ile incelendiği bu çalışmada, örneklerden 51'i (%2.7) pozitif bulundu. AI M2 yönünden pozitif bulunan materyallerin RT-PCR ile analizinde, 4 (%7.8) örneğin H5N1 olduğu saptandı. Embriyolu tavuk yumurtasında yapılan izolasyonda RT-PCR pozitif 51 örneğin 11'inden (%21.6) influenza A virüsü izole edildi. İzolatların 3'ü H1N7, 2'si H7N9 ve 2'si H11N9 olarak tiplendirildi. 4 izolat hem H1 hem de H5 alt tipine ait antiserumlarla reaksiyon oluşturdu. Bu 4 izolatin ikisi N1 olarak tiplendirilirken, 2 tanesi RT-PCR ve agaroz jel elektroforez yöntemleriyle N1 olarak tiplendirilmesine rağmen NI testinde tiplendirilemedi.

4.1. Projeden çıkarılan sonuçlar

1. Proje önerisinde 20 aylık çalışma periyodunda 36 kanatlı türünden 1500-2000 dışkı örneği toplanması hedeflenen bu araştırma, 28 aylık çalışma periyodunda 47 kanatlı türünden 1910 dışkı örneği incelenerek tamamlandı. Ayrıca, araştırma süresince laboratuvarımıza hastalık şüphesiyle getirilen hayvan ve insanlara ait materyaller proje kapsamında incelendi. Yazılı kaynaklar incelendiğinde bu araştırmanın; çalışma süresi, örnek alınan hayvan türleri ve incelenen hayvanlara ait dışkı sayıları açısından ülkemizde bu kapsamda yapılan ilk çalışma olduğu görüldü.

2. Literatür incelemelerimizde, materyallerin laboratuvara taşınmasında kullanılan transport mediumların farklı solüsyonlar ve değişik antibiyotiklerle hazırlandığı görüldü. Projede hazırladığımız ve kullandığımız transport mediumun materyallerin taşınmasında hazırlanması kolay, ucuz, uygun bir ortam olduğu sonucuna varıldı.

3. Bu çalışmada, göçmen kuşların önemli bir konaklama yeri olan Van Gölü Havzasında bulunan rastlantısal, transit göçer, kış ziyaretçisi, göçmen ve yerli toplam 47 kanatlı türünden toplanan 1910 dışkı örneğinin 51'i (%2.7) RT-PCR ile AI tip A virüs M2 geni yönünden pozitif bulundu.

4. Avian influenza tip A virüs M2 geni yönünden pozitif bulunan örnekler, RT-PCR ile H5N1 yönünden incelendi; 51 pozitif örneğin 4'ünde (%7.8) H5N1 alt tipi saptandı. RT-PCR H5N1 pozitif örnekler 15 Eylül 2006 tarihinde Erçek Gölü, Karagündüz Köyünde kaşıkgaga türü ördeklerden toplanan dışkı materyallerinden elde edildi.

5. RT-PCR ile pozitiflik saptanan 51 dışkı örneğinin toplandığı 14 kanatlı türünün 9'u (%64.3) *Anseriformes* takımına ait ördek türleri, 4'ü (%28.6) *Charadriiformes* takımına ait sahil kuşu ve martılar, biri de (%7.1) *Phoenicopteriformes* takımına ait flamingodan oluştu.

6. RT-PCR ile pozitif bulunan 51 örnekten 38'i (%74.6) 2006, 2007 ve 2008 yılları kış-bahar dönemine denk gelen zaman diliminde toplanan örneklerde tespit edildi.

7. RT-PCR ile pozitif bulunan örneklerin 35'i (%68.6) beş adet kış ziyaretçisi türden, 8'i (%15.7) dört adet yerli kanatlı türünden, 4'ü (%7.8) üç adet göçmen kuş türünden, 3'ü (%5.9) bir adet hem kış ziyaretçisi hem de göçmen olarak tanımlanan bir türden ve 1 tanesi de (%2) transit göçer bir türden alınan dışkılarda saptandı. Hayvanların statüleri dikkate alındığında, en yüksek pozitiflik kış ziyaretçisi olan iki ördek türünde görüldü.

8. Aynı tarihlerde aynı mekanı paylaşan farklı kanatlı türlerinden alınan dışkı örneklerinde de RT-PCR ile pozitiflik saptandı (Tablo 13).

9. RT-PCR ile pozitif bulunan örnekler embriyolu tavuk yumurtalarına ekildi. 51 pozitif örneğin 11'inden (%21.6) avian influenza tip A virüsü izole edildi. RT-PCR yönteminin izolasyon yöntemine göre pozitiflikleri saptamada daha başarılı olduğu bu çalışma sonuçlarıyla da teyid edildi. İzolatların tamamı *Anseriformes* takımına ait kış ziyaretçisi ile kış ziyaretçisi/göçmen olarak statülendirilen kaşıkgaga, elmabaş patka ve çamurcun türü ördeklerden elde edildi. Türkiye'de ilk defa bu çalışma ile influenza A virüslerinin bulaştırılmasında önemli rezervuar hayvanlar oldukları bildirilen bu ördek türlerinden AI tip A virüsünün izolasyonu gerçekleştirilmiş oldu.

10. İzole edilen bu virüslerin hemagglütinasyon inhibisyon ve neuraminidaz inhibisyon testleriyle tiplendirmeleri yapıldı. İzolatlardan 3'ü H1N7, 2'si H7N9 ve 2'si de H11N9 olarak tiplendirildi. H7 olarak tiplendirilen izolatlar, 12 Mart 2008 tarihinde Çakırbey yerleşim yerinde, çamurcun türü ördeklerden elde edildi. Kaşıkgaga türü ördeklerden izole edilen 4 izolat hem H1 ve hem de H5 antiserumlarıyla pozitif reaksiyon verdi. Bu izolatların 2 tanesi NI testiyle N1 olarak tiplendirilirken, 2 tanesi NI testinde antiserumların hiç biriyle pozitif reaksiyon oluşturmadi ve NI testi ile tiplendirilemedi. Bu izolatların RT-PCR H5N1 analiz ile agaroz jel elektroforez sonuçları birlikte değerlendirildi ve sekans analizlerinin yaptırılmasına karar verildi. Yazılı kaynaklar incelendiğinde, ülkemizde bu alt tiplerin ördek türlerinden ilk defa bu çalışma ile izole edildiği görüldü.

11. Proje devam ederken, 07-09 Ekim 2008 tarihleri arasında Anabilim Dalımızın ev sahipliğinde Van'da VIII. Ulusal (Uluslararası Katılımlı) Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi yapıldı. Kongre kapsamında, devam eden bu projemiz de dikkate alınarak, çağrılı tebliğ sunmak üzere AI tip A virüs infeksiyonları konusunda çok sayıda araştırması bulunan Prof.

Dr. Hiroshi KIDA (Hokkaido Üniversitesi, OIE Dünya HPAI Referans Laboratuvarı Direktörü, Japonya) davet edildi. Prof. Dr. Hiroshi KIDA ile bu proje ve influenza A virüsleriyle ilgili olarak bilgi alış-verişinde bulunuldu ve birlikte saha gözlemleri yapıldı (Fotoğraf 4c).

12. Projenin I ve II. verileri, biri uluslararası diğeri uluslararası katılımlı olmak üzere 2 kongrede sunuldu. Projenin III. verileri, uluslararası bir kongrede sunulmak üzere kabul edildi.

13. Proje hazırlanırken Van Gölü Havzasında hastalığın hızlı teşhisine yönelik bir laboratuvar alt yapısının oluşturulması hedeflenmişti. Proje kapsamında alınan cihaz ve eğitimlerle bu hedef gerçekleştirildi ve amaca yönelik olarak bir laboratuvar alt yapısı oluşturularak hizmete sunuldu. Elde edilen izolatlar, ülkemiz referans laboratuvarı koleksiyonuna (Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü AI Ulusal Referans Laboratuvarına, İzmir) kazandırıldı.

14. Yerel, ulusal, yazılı ve görsel basında proje ve kuş gribi hastalığı ile ilgili bilgiler verildi.

Sonuç olarak, yukarıda sayılan başlıklar değerlendirildiğinde bu çalışmanın; Türkiye’de konuya ilişkin bu kapsamda yapılan ilk araştırma olduğu ve ülkemizde bundan sonra yapılacak diğer çalışmalara temel nitelikte, global düzeyde yapılacak kimi çalışmalara ise epidemiyolojik olarak, önemli katkılar sağlayacağı kanaatine varıldı.

4.2. Hedef ve öneriler

1. 2009 yılı kış-bahar döneminde de sahadan örnek toplanmaya devam edilmekte olup, toplanan bu örneklerle ait analizler yapılacak ve havza 2009 yılının ilk 3 ayında da takip edilecektir.

2. RT-PCR’da pozitif bulunan örnekler ile tüm izolatların sekans analizleri yaptırılacaktır.

3. RT-PCR ile AI tip A M2 pozitif olan örneklerin tamamı H7 ve H9N2 yönünden primer ve probler temin edilerek, RT-PCR’da analiz edilmesi düşünülmektedir.

4. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü ile ortak bir proje hazırlanması düşünülmektedir.

5. Yapılan bu çalışma neticesinde, Van Gölü Havzasında hastalık riskinin kış-bahar döneminde daha yüksek olduğu belirlendi. Koruyucu önlemler alınması ve yöre halkının bilinçlendirilmesi amacıyla, bu dönemlerde gerekli uyarıların yazılı ve görsel basının desteğiyle tarafımızca düzenli olarak yapılmasına karar verildi.

6. Projede kullanılan transport medium, dışkı materyallerinin taşınmasında yeterli ve uygun bir taşıma ortamı olması nedeniyle, konuyla ilgili çalışacak araştırmacılara tavsiye edilebilir nitelikte bulundu.

7. Ülkemizin göç yolları ve sulak alanlarında benzer saha taramaları düzenli olarak yapılmalı ve Türkiye’nin kuş gripi risk haritaları çıkartılmalıdır. Bu çalışmalardan elde edilecek izolatlar, Ulusal Referans Laboratuvarımızda toplanmalı, aşı hazırlama ve/veya ulusal stratejik menfaatlerimize yönelik araştırmalarda kullanılmak üzere Türkiye koleksiyonu oluşturulmalıdır.

Bilgi Notu: Projenin öneri formunda “Başarı Ölçütleri” başlığı altında belirtilen aşamaların tamamı gerçekleştirilmiştir.

REFERANSLAR

- ADIZEL, Ö., *Van Karasu (Mermit) Deltası Kuşları*, (Yüksek Lisans Tezi), Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, (1993).
- ADIZEL, Ö., *Van Gölü Havzası Ornitofaunası Üzerine Araştırmalar*, (Doktora Tezi), Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, (1998).
- ADIZEL, Ö., Durmuş, A., Sulak Alan Tahribatının Dönemeç (Engil) Deltası-Van Örneğinde İrdelenmesi, Göller Yöresi, İç Anadolu Gölleri ve Sorunları, Isparta-Türkiye, (2007) s: 353.
- ADIZEL, Ö., Durmuş, A., Ögün, E., Türkiye'nin ve Van Gölü Havzasının Göçmen Kuşların Taşıdığı Hastalıklar Bakımından Değerlendirilmesi, VIII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Van-Türkiye, (2008) s: 254-5.
- AKPINAR E., Saatci E., Avian Influenza in Turkey-Will It Influence Health in All Europe?, *Croatian Medical Journal*, 47, 7-15, (2006).
- AKYILDIZ, A., *Bahçesaray (Van) Ornitofaunası Üzerine Bir Araştırma*, (Yüksek Lisans Tezi), Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, (2004).
- ALEXANDER D.J., A Review of Avian Influenza in Different Bird Species. Proceedings of The ESVV Symposium on Animal Influenza Viruses, Gent 1999, *Veterinary Microbiology*, 74, 3-13, (2000).
- ALEXANDER D.J., An Overview of the Epidemiology of Avian Influenza, *Vaccine*, 25, 5637-44, (2007).
- ALEXANDER D.J., Avian Influenza Diagnosis, *Zoonoses and Public Health*, 55, 6-23, (2008).
- ALFONSO C.P., Cowen B.S., Van Campen H., Influenza A Viruses Isolated from Waterfowl in Two Wildlife Management Areas of Pennsylvania, *Journal of Wildlife Diseases*, 31(2), 179-85, (1995).
- ANONIM., *Türkiye'nin Kuş Cennetleri*, Çevre Bakanlığı, Çevre Koruma Genel Müdürlüğü, Yeşil Seri: 5, Ankara, (1995).
- ANONIM., *Türkiye Çevre Atlası 96*, ÇED, Planlama Genel Müdürlüğü Çevre Envanteri Dairesi 4, Milli Eğitim Basımevi, İstanbul, (1997) s: 424.
- ANONIM., *Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria*, <http://www.iucn.Org/Webfiles/Doc/SSC/Redlist/Redlistguidelines.Pdf>. Erişim Tarihi: 01 Aralık 2006, (2006a).

ANONİM., LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe Kit (Roche®, Cat No: 03 003 248 001), Version January 2006, <https://www.roche-applied-science.com/pack-insert/3003248a.pdf>, Erişim Tarihi: 14 Ekim 2007, (2006b).

ANONİM., LightMix® 480HT for the detection of Avian Influenza A Virus (*Subtype Asia*) H5N1 (TIB Molbiol, Cat No: 40-0311-96), Version 061130© 2006 TIBMOLBIOL, (2006c).

ANONİM., *Sulak Alan Yönetim Planlaması Rehberi*, Çevre ve Orman Bakanlığı, Ankara, (2007a) s: 176.

ANONİM., *Documentation of Species*. <http://www.iucnredlist.org/2007IUCNRedList>. IUCN. Erişim tarihi: 11 Eylül 2007, (2007b).

ANONİM., *Bird Ringing* <http://www.bto.org/ringing/ringinfo/index.htm>. BTO, Erişim Tarihi: 05 Ekim 2007, (2007c).

ANONİM., *Wetlands for Water and Life*. http://www.wetlands.org/pubs/pub_online, Erişim Tarihi: 05 Ağustos 2007, (2007d).

ANONİM., Light Cycler Real Time PCR (Roche®, LC480), https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/htc/htc_docs/LC480_0608_LR_final.pdf, Erişim Tarihi: 14 Ekim 2007, (2007e).

ANONİM., High Pure Viral RNA Isolation Kit (Roche®, Cat No: 11 858 882 001), Version January 2007, <https://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1858882a.pdf>, Erişim Tarihi: 14.10.2007, (2007f).

ANONİM., Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche®, Cat No: 04 896 866 001), Version April 2007. <https://www.roche-applied-science.com/pack-insert/4379012a.pdf>, Erişim Tarihi: 14 Ekim 2007, (2007g).

ANONİM., LightMix® 480HT for the detection of influenza A virus M2 (TIB Molbiol, Cat No: 40-0277-96), Version 080317© 2008 TIBMOLBIOL, (2008a).

ANONİM., Avian Influenza Virus Type A Antigen Test Kit, Synbiotics Corporation, Family of Avian Influenza detection products, www.synbiotics.com/AIV/PDF/AIVTestkitinsert.pdf, Erişim Tarihi: 12 Kasım 2008, (2008b).

ARDA, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M., Yardımcı, H., Esendal, Ö.M., Erdeğer, J., Akan, M., *Kanatlı Hayvan Hastalıkları*, I. Baskı, Medisan Yayınları, Yayın Serisi: 50, Ankara, (2002) s: 147-53.

BARUN K., Shaw M.W., Rota P.A., Harmon M.W., Esposito J.J., Rott R., Cox N.J., Kendal A.P., De-Barun K., Protection Against Virulent H5 Avian Influenza Virus Infection in

- Chickens by an Inactivated Vaccine Produced with Recombinant Vaccinia Virus, *Vaccine*, 6, 257-61, (1988).
- BERG M., Englund L., Abusugra I.A., Klingeborn A., Linet T., Close Relationship Between Mink Influenza (H10N4) and Concomitantly Circulating Avian Influenza Viruses, *Archives of Virology*, 113, 61-71, (1990).
- BOOTH S., Baleriola C., Rawlinson W.D., Comparison of Two Rapid Influenza A/B Test Kits With Reference Methods Showing High Specificity and Sensitivity for Influenza A Infection, *Journal of Medical Virology*, 78, 619-22, (2006).
- BOYNUKARA B., Adızel Ö., İlhan Z., Ekin İ.H., Aksakal A., Çöven F., Solmaz H., Gülhan T., Öğün E., Durmuş A., Gürtürk K., The First Data Obtained Concerning the Determination of Avian Influenza A Viruses in Some Avian Species in Van Lake Basin by Real-Time PCR, Their Isolation and Sub-Typing, 2nd International Eurasian Ornithology Congress, Antalya-Turkey, (2007) p: 35.
- BOYNUKARA B., Gülhan T., İlhan Z., Ekin İ.H., Aksakal A., Adızel Ö., Öğün E., Durmuş A., Çöven F., Solmaz H., Gürtürk K., Van Gölü Havzasında Bazı Kanatlı Türlerinde Avian İnfluenza A Viruslarının RT-PCR ile Tespiti, İzolasyonu ve Alt Tiplerinin Belirlenmesi (Verilerin II. Sunumu), VIII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Van-Türkiye, (2008) s: 184-5.
- BRUGH M., Beard C.W., Stone H.D., Immunization of Chickens and Turkeys against Avian Influenza with Monovalent and Polyvalent Oil Emulsion Vaccines, *American Journal of Veterinary Research*, 40, 165-9, (1979).
- CALLAN R.J., Early G., Kida H., Hinshaw V.S., The Appearance of H3 Influenza Viruses in Seals, *Journal of General Virology*, 76, 199-03, (1995).
- CAMPITELLI L., Mogavero E., De Marco M.A., Delogu M., Puzelli S., Frezza F., Facchini M., Chiapponi C., Foni E., Cordioli P., Webby R., Barigazzi G., Webster R.G., Donatelli I., Influenza Surveillance in Birds in Italy (1999-2002): Preliminary Molecular Characterization of Virus Isolates, *International Congress Series*, 1263, 766-70, (2004).
- CAPUA I., Alexander D.J., Avian Influenza: Recent Developments. *Avian Pathology*, 33, 393-04, (2004).
- CAPUA I., Alexander D.J., Avian Influenza Infectious in Birds-a Moving Target, *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 1(1), 11-8, (2007).

- CAPUA I., Alexander D.J., Ecology, Epidemiology and Human Health Implications of Avian Influenza Viruses: Why Do We Need to Share Genetic Data?, *Zoonosis and Public Health*, 55, 2-15, (2008).
- CAPUA I., Marangon S., The Avian Influenza Epidemic in Italy, 1999-2000: A Review, *Avian Pathology*, 29, 289-94, (2000).
- CAPUA I., Marangon S., Selli L., Alexander D.J., Swayne D.E., Pozza M.D., Parenti E., Cancellotti F.M., Outbreaks of Highly Pathogenic Avian Influenza (H5N2) in Italy During October 1997 to January 1998, *Avian Pathology*, 28, 455-60, (1999).
- CAPUA I., Multinelli F., Marangon S., Alexander D.J., H7N1 Avian Influenza in Italy (1999 to 2000) in Intensively Reared Chickens and Turkeys, *Avian Pathology*, 29, 537-43, (2000a).
- CAPUA I., Marangon S., Dalla Pozza M., Santucci U., Vaccination for Avian Influenza in Italy, *The Veterinary Record*, 147(26), 751, (2000b).
- CATTOLI G., Drago A., Maniero S., Toffan A., Bertoli E., Fassina S., Terregino C., Robbi C., Vicenzoni G., Capua I., Comparison of Three Rapid Detection Systems for Type A Influenza Virus on Tracheal Swabs of Experimentally and Naturally Infected Birds, *Avian Pathology*, 33, 432-7, (2004).
- CATTOLI G., TERREGINO C., New Perspective in Avian Influenza Diagnosis, *Zoonosis and Public Health*, 55, 24-8, (2008).
- CHAMBERS T.M., Yamnikova S., Kawaoka Y., Lvov D.K., Webster R.G., Antigenic and Molecular Characterization of Subtype H13 Haemagglutinin of Influenza Virus, *Virology*, 193, 503-6, (1989).
- CHEN H., Deng G., Li Z., Tian G., Li Y., Jiao P., Zhang L., Lui Z., Webster R.G., Yu K., The Evolution of H5N1 Influenza Viruses in Ducks in Southern China, *PNAS*, 101(28), 10452-7, (2004).
- CHEN H., Li Y., Li Z., Shi J., Shinya K., Deng G., Qi Q., Tian G., Fan S., Zhao H., Sun Y., Kawaoka Y., Properties and Dissemination of H5N1 Viruses Isolated During an Influenza Outbreaks in Migratory Waterfowl in Western China, *Journal of Virology*, 80, 5976-83, (2006).
- CHEN H., Smith G.J.D., Zhang S.Y., Qin K., Wang J., Li K.S., Webster R.G., Peiris J.S.M., Guan Y., H5N1 Virus Outbreak in Migratory Waterfowl, *Nature*, 436, 191-2, (2005).
- CHEN Y., Chen C., Wang C., H5 Antibody Detection by Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using a Monoclonal Antibody, *Avian Diseases*, 52, 124-9, (2008).

- CHERIAN T., Bobo L., Steinhoff M.C., Karron R.A., Yolken R.H., Use of PCR-Enzyme Immunoassay for Identification of Influenza A Virus Matrix RNA in Clinical Samples Negative for Cultivable Virus, *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 623-8, (1994).
- COVEN F., The Situation of Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) Outbreaks in Turkey, *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 53, 34, (2006).
- ÇÖVEN F., <http://bornova.vet.gov.tr/pdfveri/avian/surveylanscalisma.pdf>. Erişim Tarihi: 27 Ocak 2009.
- DAISY J.A., Lief F.S., Friedman H.M., Rapid Diagnosis of Influenza A Infection by Direct Immunofluorescence of Nasopharyngeal Aspirates in Adults, *Journal of Clinical Microbiology*, 9 (5), 688-92, (1979).
- DAVISON S., Ziegler A.F., Eckroade R.J., Comparison of an Antigen Capture Enzyme Immunoassay with Virus Isolation for Avian Influenza from Field Samples, *Avian Diseases*, 42, 791-5, (1998).
- DE BENEDICTIS P., Beato M.S., Capua I., Inactivation of Avian Influenza Viruses by Chemical Agents and Physical Conditions: A Review, *Zoonoses and Public Health*, 54, 51-68, (2007).
- DE LA BARRERA C.A., Reyes-Teran G., Influenza: Forecast for a Pandemic, *Archives of Medical Research*, 36, 628-36, (2005).
- DE MARCO M.A., Foni E., Campitelli L., Raffini E., Delogu M., Donatelli I., Long-Term Monitoring for Avian Influenza Viruses in Wild Bird Species in Italy, *Veterinary Research Communication*, 27, 107-14, (2003).
- DE MARCO M.A., Campitelli L., Foni E., Raffini E., Barigazzi G., Delugu M., Guberti V., Di Trani L., Tollis M., Donatelli I., Influenza Surveillance in Birds in Italian Wetlands (1992-1998): Is There a Host Restricted Circulation of Influenza Viruses in Sympatric Ducks and Coots?, *Veterinary Microbiology*, 98, 197-08, (2004).
- DE MARCO M.A., Foni E., Capitelli L., Delogu M., Raffini E., Chiapponi C., Barigazzi G., Cordioli P., Di Trani L., Donatelli I., Influenza Virus Circulation in Wild Aquatic Birds in Italy During H5N2 and H7N1 Poultry Epidemic Periods (1998 to 2000), *Avian Pathology*, 34, 480-5, (2005).
- DELOGU M., De Marco M.A., Donatelli I., Campitelli L., Catelli E., Ecological Aspects of Influenza A Virus Circulation in Wild Birds of the Western Palearctic, *Veterinary Research Communication*, 1, 101-6, (2003).

- DEMİRİSOY, A., *Yaşamın Temel Kuralları*, Meteksan Matbaacılık ve Teknik Sanayi Ticaret Ltd. Sti., Ankara, (1991), s: 560.
- DOUGLAS K.O., Saurez D.L., Lavoie M.C., Influenza A Virus Surveillance of Migratory Waterfowl in Barbados, West Indies, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081, 169-70, (2006).
- DUGAN V.G., Chen R., Spiro D.J., Sengamalay N., Zaborsky J., Ghedin E., Nolting J., Swayne D.E., Runstadler J.A., Happ G.M., Sene D.A., Wang R., Slemons R.D., Holmes E.C., Taubenberger J.K., The Evolutionary Genetics and Emergence of Avian Influenza Viruses in Wild Birds, *Plos Pathogens*, 4(5), 1-9, (2008).
- DURMUŞ, A., *Van Gölünde Yaşayan Gece Balıkçılı (Nycticorax nycticorax Linne, 1758)'nın Biyo-ekolojisi Üzerine Bir Araştırma*, (Doktora Tezi), Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, (2008).
- DURMUŞ, A., Adızel, Ö., A Study on Eco-Ornithofauna of the Balık Gölü and Its Surrounding (Doğu Beyazıt, Ağrı-Turkey), 2nd International Eurasian Ornithology Congress, Antalya-Turkey, (2007) p: 53
- ELLIS J.S., Fleming D.M., Zambon M.C., Multiplex Reverse Transcription PCR for Surveillance of Influenza A and B Viruses in England and Wales in 1995 and 1996, *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 2076-82, (1997).
- ELLIS J.S., Zambon M.C., Combined PCR-Heterodublex Mobility Assay for Detection and Differentiation of Influenza A Viruses from Different Animal Species, *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (11), 4097-02, (2001).
- ELLIS T.M., Bousfield R.B., Bissett L.A., Dyrting K.C., Luk G.S.M., Tsim S.T., Sturm-Ramirez K., Webster R.G., Guan Y., Peiris J.S.M., Investigation of Outbreaks of Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza in Waterfowl and Wild Birds in Hong Kong in Late 2002, *Avian Pathology*, 33(5), 492-505, (2004).
- FEARE C.J., Yasue M., Asymptomatic Infection with Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 in Wild Birds: How Sound is the Evidence?, *Virology Journal*, 3 (96), 1-4, (2006).
- FASINA F.O., Meseko A.C., Joannis T.M., Shitto, A.I., Ularamo H.G., Egbuji N.A., Sulaiman L.K., Onyekonwu N.O., Control Versun No Control: Options for Avian Influenza H5N1 in Nigeria, *Zoonoses and Public Health*, 54, 173-6, (2007).
- FOUCHIER R.A.M., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T.M., Herfst S., Smith D., Rimmelzwaan G.F., Olsen B., Osterhaus A.D.M.E., Characterization of Novel Influenza A

Virus Haemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls, *Journal of Virology*, 79, 2814-22, (2005).

FYAN E.F., Robinson H.L., Webster R.G., Use of DNA Encoding Influenza Haemagglutination as an Avian Influenza Vaccine, *DNA and Cell Biology*, 12, 785-9, (1993).

GAIDET N., Dodman T., Caron A., Balança G., Desvaux S., Goutard F., Cattoli G., Lamarque F., Hagemeijer W., Monicat F., Avian Influenza Viruses in Water Birds, Africa, *Emerging Infectious Diseases*, 13 (4), 626-9, (2007).

GARCIA A., Johnson H., Srivastava D.K., Jayawardene D.A., Wehr D.R., Webster R.G., Efficacy of Inactivated H5N2 Influenza Vaccines Against Lethal A/Chicken/Queretaro/19/95 Infection, *Avian Diseases*, 42, 248-56, (1998).

GARCIA M., Crawford J.M., Latimer J.W., Rivera-Cruz E., Perdeu M.L., Heterogeneity in the Haemagglutinin Gene and Emergence of the Highly Pathogenic Phenotype Among Recent H5N2 Avian Influenza Viruses from Mexico, *Journal of General Virology*, 77, 1493-04, (1996).

GHARAIBEH S., Pathogenicity of an Avian Influenza Virus Serotype H9N2 in Chickens, *Avian Diseases*, 52, 106-10, (2008).

GLASS S.E., Nagi S.E., Grumbles L.C., Isolation of Avian Influenza Virus in Texas, *Avian Diseases*, 25, 545-9, (1981).

GRONESOVA P., Ficova M., Mizakova A., Kabat P., Trnka A., Betakova T., Prevalence of Avian Influenza Viruses, *Borrelia garinii*, *Mycobacterium avium*, and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Waterfowl and Terrestrial Birds in Slovakia, 2006, *Avian Pathology*, 37, 537-43, (2008).

GUAN Y., Shortridge K.F., Krauss S., Li P.H., Kawaoka Y., Webster R.G., Emergence of Avian H1N1 Influenza Viruses in Pigs in China, *Journal of Virology*, 70, 8041-6, (1996).

GUO Y., Wang, M., Zheng G.S., Li W.K., Kawaoka Y., Webster R.G., Seroepidemiological and Molecular Evidence for the Presence of Two H3N8 Equine Influenza Viruses in China in 1993-94, *Journal of General Virology*, 76, 2009-11, (1995).

HALVORSON D.A., Karunakaran D., Newman J.A., Avian Influenza in Caged Laying Chickens, *Avian Diseases*, 47, 1022-36, (1980).

HALVORSON D.A., Kelleher C.J., Sene D.A., Epizootiology of Avian Influenza: Effect of Season on Incidence in Sentinel Ducks and Domestic Turkeys in Minnesota, *Applied and Environmental Microbiology*, 49(4), 914-9, (1984).

HALVORSON D.A., Kelleher C.J., Senne D.A., Epizootiology of Avian Influenza: Effect of Season on Incidence in Sentinel Ducks and Domestic Turkeys in Minnesota, *Applied and Environmental Microbiology*, 49(4), 914-9, (1985).

HAMPSON A.W., Avian Influenza: A Pandemic Waiting in the Wings?, *Emergency Medicine Australasia*, 18, 420-9, (2006).

HANSON B.A., Stallknecht D.E., Swayne D.E., Lewis L.A., Sene D.A., Avian Influenza Viruses in Minnesota Ducks During 1998-2000, *Avian Diseases* 47, 867-1, (2003).

HANSON B.A., Swayne D.E., Senne D.A., Lobpries D.S., Hurst J., Stallknecht D.E., Avian Influenza Viruses and Paramyxoviruses in Wintering and Resident Ducks in Texas, *Journal of Wildlife Diseases*, 41, 624-8, (2005).

HAPPOLD J.R., Brunhard I., Schwermer H., Stärk K.D.C., Surveillance of H5 Avian Influenza Virus in Wild Birds Found Dead, *Avian Diseases*, 52, 100-5, (2008).

HE F., Du Q., Ho Y., Kwang J., Immunohistochemical Detection of Influenza Virus Infection in Formalin-Fixed Tissues with Anti-H5 Monoclonal Antibody Recognizing FFWTILKP, *Journal of Virological Methods*, 155(1), 25-33, (2009).

HERMANN B., Larsson C., Zwegberg B.W., Simultaneous Detection and Typing of Influenza Viruses A and B by A Nested Reverse Transcription-PCR: Comparization to Virus Isolation and Antigen Detection by Immunofluorescence and Optical Immunoassays (FLU OIA). *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 134-8, (2001).

HINDIYEH M., Levy V., Azar R., Varsano N., Regev L., shalev Y., Grossman Z., Mendelson E., Evolution of a Multiplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection and Differentiation of Influenza Viruses A and B during the 2001-2002 Influenza Season in Israel, *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 589-95, (2005).

HINSHAW V.S., Air G.M., Gibbs A.J., Graves L., Prescott B., Karunakaran D., Antigenic and Genetic Characterization of A Novel Haemagglutinin Subtype of Influenza A Viruses from Gulls, *Journal of Virology*, 42, 865-72, (1982).

HOFFMANN B., Harder T., Starick E., Depner K., Werner O., Beer M., Rapid and Highly Sensitive Pathotyping of Avian Influenza A H5N1 Virus by Using Real-Time Reverse Transcription-PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 600-3, (2007).

HORNSLETH A., Jankowski M., Sensitive Immunoassay for the Rapid Diagnosis of Influenza A Virus Infections in Clinical Specimens, *Research in Virology*, 141, 373-84, (1990).

HUANG YT., Turchek BM., Mink Lung Cells and Mixed Mink Lung and A549 Cells for Rapid Detection Influenza Virus and Other Respiratory Viruses, *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 322-3, (2000).

HULSE-POST D.J., Sturm-Ramirez K.M., Humberd J., Seiler P., Govorkova E.A., Krauss S., Scholtissek C., Puthavathana P., Buranathai C., Nguyen T.D., Long H.T., Naipospos T.S.P., Chen H., Ellis T.M., Guan Y., Peiris J.S.M., Webster R.G., Role of Domestic Ducks in the Propagation and Biological Evolution of Highly Pathogenic H5N1 Influenza Viruses in Asia, *PNOS*, 102(30), 10682-7, (2005).

HURT A.C., Hansbro P.M., Selleck P., Olsen B., Minton C., Hampson A.W., Barr I.G., Isolation of Avian Influenza Viruses from Two Different Transhemispheric Migratory Shorebird Species in Australia, *Archives of Virology*, 151, 2301-9, (2006).

ICHINOHE T., Watanabe I., Tao E., Ito S., Kawaguchi A., Tamura S., Takahashi H., Sawa H., Moriyama M., Chiba J., Komase K., Suzuki Y., Kurata T., Sata T., Hasegawa H., Protection Against Influenza Virus Infection by Intranasal Vaccine with Surf Clam Microparticles (SMP) as an Adjuvant, *Journal of Medical Virology*, 78(7), 954-63, (2006).

ITO T., Couceiro J.N., Kelm S., Baum L.G., Krauss S., Castrucci M.R., Donatelli I., Kida H., Paulson J.C., Webster R.G., Kawaoka Y., Molecular Basis for the Generation in Pigs of Influenza A Viruses with Pandemic Potential, *Journal of Virology*, 72, 7367-73, (1998).

ITO T., Goto H., Yamamoto E., Tanaka H., Takeuchi M., Kuwayama M., Kawaoka Y., Otsiku K., Generation of a Highly Pathogenic Avian Influenza A Virus from an Avirulent Field Isolate by Passaging in Chickens, *Journal of Virology*, 75, 4439-43, (2001).

IVANOV Y., Bayraktar R., Ende M.V., Kuş Gribi Survey El Kitabı (Türkiye’de Kuş Gribine Karşı Hazırlık ve Müdahale İçin Teknik Projesi TR 06.AI/SV), Dumat Ofset, Ankara, (2008). s: 117-31.

JUCKETT G., Avian Influenza: Preparing for a Pandemic, *American Family Physician*, 74(5), 783-90, (2006).

KARLSSON M., Wallensten A., Lundkvist A., Olsen B., Brytting M., A Real-Time PCR Assay for the Monitoring of Influenza A Virus in Wild Birds, *Journal of Virological Methods*, 144, 27-31, (2007).

KAYE D., Pringle C.R., Avian Influenza Viruses and Their Implication for Human Health, *Clinical of Infectious Diseases*, 40(1), 108-12, (2005).

- KHAWAJA J.Z., Naeem K., Ahmed Z., Ahmad S., Surveillance of Avian Influenza Viruses in Wild Birds in Areas Adjacent to Epicenter of an Out Break Federal Capital Territory of Pakistan, *International Journal of Poultry Science*, 4(1), 39-43, (2005).
- KIDA H., Ecology of Influenza Viruses in Nature, Birds, and Mammals Including Humans, VIII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Van-Türkiye, (2008) s: 4-13.
- KIDA H., Yanagawa R., Matsuoka Y., Duck Influenza Lacking Evidence of Disease Signs and Immune Response, *Infection and Immunity*, 30(2), 547-53, (1980).
- KIDA H., Ito T., Yasuda J., Shimizu Y., Itakura C., Shortridge K.F., Kawaoka Y., Webster R.G., Potential for Transmission of Avian Influenza Viruses to Pigs, *Journal of General Virology*, 75, 2183-8, (1994).
- KILIÇ D.T., Eken, G., Türkiye'nin Önemli Kuş Alanları 2004 Güncellemesi, Doğa Derneği, Ankara, (2004). s: 232.
- KISHIDA N., Sakoda Y., Isoda N., Matsuda K., Eto M., Sunaga Y., Umemura T., Kida H., Pathogenicity of H5 Influenza Viruses for Ducks, *Archives of Virology*, 150(7), 1383-92, (2005).
- KİZİROĞLU İ., Türkiye Kuşları, Orman Genel Müdürlüğü Eğitim Dairesi Başkanlığı Yayın ve Tanıtma Şube Müdürlüğü Basım Tesisleri, Ankara, (1989). s: 312.
- KİZİROĞLU İ., Ekolojik Potpuri, TAKAV Mat.Yay. A.Ş., Ankara, (2001). s: 391.
- KİZİROĞLU İ., Türkiye Kuşları Tür Listesi ve Türkiye Kuşları Kırmızı Listesi (Baskıda), Hacettepe Üniversitesi, Çevre Eğitimi, Kuş Araştırmaları ve Halkalama Merkezi, Ankara, (2008). s: 86.
- KNOSSOW M., Skehel J.J., Variation and Infectivity Neutralization in Influenza, *Immunology*, 119, 1-7, (2006).
- KODIHALLI S., Sivanandan V., Halvarson D.A., Nagaraja K.V., Kumar, M.C., Antigen Capture ELISA for Rapid Diagnosis of Avian Influenza Virus in Commercial Turkey Flocks, *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, 5, 438-40, (1993).
- KODIHALLI S., Kobasa D.L., Webster R.G., Strategies for Inducing Protection Against Avian Influenza A Virus Subtypes with DNA Vaccines, *Vaccine*, 18, 2592-9, (2000).
- KOU Z., Lei F.M., Yu J., Fan Z.J., Yin Z.H., Jia C.X., Xiong K.J., Sun Y.H., Zhang X.W., Wu X.M., Gao X.B., Li T.X., New Genotype of Avian Influenza H5N1 Viruses Isolated from Tree Sparrows in China, *Journal of Virology*, 79, 15460-6, (2005).

- KRAUSS S., Walker D., Pryor S.P., Niles L., Chenghong L., Hinshaw V.S., Webster R.G., Influenza A Viruses of Migrating Wild Aquatic Birds in North America, *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 4, 177-89, (2004).
- KRAUSS S., Obert C.A., Franks J., Walker D., Jones K., Seiler P., Niles L., Pryor S.P., Obenauer J.C., Naeve C.W., Widjaje L., Webby R.J., Webster R.G., Influenza in Migratory Birds and Evidence of Limited Intercontinental Virus Exchange, *Plos Pathogens*, 3(11), 1684-93, (2007).
- KURU M., Omurgalı Hayvanlar, Gazi Üniversitesi Yayın No: 1865, Gazi Eğitim Fakültesi Yayın No: 22, Gazi Üniversitesi İletişim Matbaası, Ankara, (1994). s: 841.
- KWON Y., Joh S., Kim M., Sung H., Lee Y., Choi J., Lee E., Kim J., Highly Pathogenic Avian Influenza (H5N1) in The Commercial Domestic Ducks of South Korea, *Avian Pathology*, 34, 367-70, (2005).
- LAUDERT E., Sivanandan V., Halvorson D., Shaw D., Webster R.G., Biological and Molecular Characterization of H13N2 Influenza Type A Viruses Isolated from Turkeys and Surface Water, *Avian Diseases*, 37(3), 793-9, (1993).
- LEBARBENCHON C., Van der Werf S., Thomas F., Aubin J., Azebi S., Cuvelier F., Jeannin P., Roca V., Chang C., Kayser Y., Roche B., Guegan J., Renaud F., Gauthier- Clerc M., Absence of Detection of Highly Pathogenic H5N1 in Migratory Waterfowl in Southern France in 2005-2006, *Infection, Genetics and Evolution*, 7 (5), 604-8, (2007).
- LEE C.W., SUAREZ D.L., Application of Real-Time RT-PCR for the Quantitation and Competitive Replication Study of H5 and H7 Subtype Avian Influenza Virus, *Journal of Virology*, 119, 151-8, (2004).
- LEE M.S., Chang P., Shien J., Cheng M., Shieh H.K., Identification and Subtyping of Avian Influenza Viruses by Reverse Transcription-PCR, *Journal of Virological Methods*, 97, 13-22, (2001).
- LEI F., Tang S., Zhao D., Zhang X., Kou Z., Li Y., Zhang Z., Yin Z., Chen S., Li S., Zhang D., Yan B., and Li T., Characterization of H5N1 Influenza Viruses Isolated from Migratory Birds in Qinghai Province of China in 2006, *Avian Diseases*, 51, 568-72, (2007).
- LI J., Chen S., Evans D.H., Typing and Subtyping Influenza Virus Using DNA Microarrays and Multiplex Reverse Transcriptase PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 696-704, (2001).
- LI K.S., Xu K.M., Peiris J.S.M., Poon L.L.M., Yu K.Z., Yuen K.Y., Shortridge K.F., Webster R.G., Guan Y., Characterization of H9 Subtype Influenza Viruses from the Ducks of Southern

China: A Candidate for the Next Influenza Pandemic in Humans?, *Journal of Virology*, 77, 6988-94, (2003).

LI Y., Lin Z., Shi J., Qi Q., Deng G., Li Z., Wang X., Tian G., Chen H., Detection of Hong Kong 97-like H5N1 Influenza Viruses from Eggs of Vietnamese Waterfowl, *Archives of Virology*, 151(8), 1615-24, (2006).

LODES M.J., Suci D., Elliot M., Stover A.G., Ross M., Caraballo M., Dix K., Crye J., Webby R.J., Lyon W.J., Danley D.L., McShea A., Use of Semiconductor-Based Oligonucleotide Microarrays for Influenza A Viruses Subtype Identification and Sequencing, *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 1209-18, (2006).

LOMBARDI M.E., Ladman B.S., Alphin R.L., Benson E.R., Inactivation of Avian Influenza Virus Using Common Detergents and Chemicals, *Avian Diseases*, 52, 118-23, (2008).

MATROSOVICH M., Zhou N., Kawaoka Y., Webster R., The Surface Glycoproteins of H5 Influenza Viruses Isolated from Humans, Chickens, and Wild Aquatic Birds Have Distinguishable Properties, *Journal of Virology*, 73(2), 1146-55, (1999).

MO I.P., Brugh M., Fletcher O.J., Rowland G.N., Swayne D.E., Comparative Pathology of Chickens Experimentally Inoculated with Avian Influenza Viruses of Low and High Pathogenicity, *Avian Diseases*, 41, 125-36, (1997).

MORGAN O., Kuhne M., Nair P., Verlander N.O., Preece R., McDougal M., Zambon M., Reacher M., Personal Protective Equipment and Risk for Avian Influenza (H7N3), *Emerging Infectious Diseases*, 15(1), 59-62, (2009).

MUNCH M., Nielsen L., Handberg K., Jorgensen P., Detection and Subtyping (H5 and H7) of Avian Type A Influenza Virus by Reverse Transcription-PCR and PCR-ELISA, *Archives of Virology*, 146, 87-97, (2001).

MUNSTER V.J., Wallensten A., Baas C., Rimmelzwaan G.F., Schutten M., Olsen B., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M., Mallards and Highly Pathogenic Avian Influenza Ancestral Viruses, Northern Europe, *Emerging Infectious Diseases*, 11(10), 1545-51, (2005).

MUNSTER V.J., Veen J., Olsen B., Vogel R., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M., Towards Improved Influenza A Virus Surveillance in Migrating Birds, *Vaccine*, 24, 6729-33, (2006).

MUNSTER V.J., Wallensten A., Baas C., Rimmelzwaan G.F., Schutten M., Olsen B., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M., Spatial, Temporal, and Species Variation in Prevalence of Influenza A Viruses in Wild Migratory Birds. *Plos Pathogens*, 3, 630-8, (2007).

- MUZAFFAR S.B., Ydenberg R.C., Jones I.L., Avian Influenza: An Ecological and Evolutionary Perspective for Waterbird Scientists, *Journal of the Waterbird Society*, 29(3), 243-57, (2006).
- NAGARAJAN S., Rajukumar K., Tosh C., Ramaswamy V., Purohit K., Saxena G., Behera P., Pattnaik B., Pradhan H.K., Dubay S.C., Isolation and Pathotyping of H9N2 Avian Influenza Viruses in Indian Poultry, *Veterinary Microbiology*, 133, 154-63, (2009).
- NAGY A., Machova J., Hornickova J., Tomci M., Nagl I., Horyna B., Holko I., Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Subtype H5N1 in Mute Swans in the Czech Republic, *Veterinary Microbiology*, 127, 9-16, (2007).
- NILI H., Asasi K., Natural Cases and an Experimental Study of H9N2 Avian Influenza in Commercial Broiler Chickens of Iran, *Avian Pathology*, 31, 247-52, (2002).
- NORMILE D., Evidence Points to Migratory Birds in H5N1 Spread, *Science*, 311, 1225, (2006).
- NGUYEN D.C., Uyeki T.M., Jadhao S., Maines T., Shaw M., Matsuoka Y., Smith C., Rowe T., Lu X., Hall H., Xu X., Balish A., Klimov A., Tumpey T.M., Swayne D.E., Huynh L.P.T., Nghiem H.K., Nguyen H.H.T., Hoang L.T., Cox N.J., Katz J.M., Isolation and Characterization of Avian Influenza Viruses, Including Highly Pathogenic H5N1, from Poultry in Live Bird Markets in Hanoi, Vietnam, in 2001, *Journal of Virology*, 79(7), 4201–12, (2005).
- OIE, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008) chapter 2.3.4, http://www.oie.int/Eng/Normes/Mmanual/2008/pdf/2.03.04_AI.pdf, Erişim Tarihi: 10 Ekim 2008.
- OKAZAKI K., Takada A., Ito T., Imai M., Takakuwa H., Hatta M., Ozaki H., Tanizaki T., Nagano T., Ninomiya A., Demenev V.A., Tyaptirganov M.M., Karatayeva T.D., Yamnikova S.S., Lvov D.K., Kida H., Precursor Genes of Future Pandemic Influenza Viruses are Perpetuated in Ducks Nesting in Siberia, *Archives of Virology*, 145, 885-93, (2000).
- OLSEN B., Munster V.J., Wallensten A., Waldenström J., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M., Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds, *Science*, 312, 384–8, (2006).
- ONCUL O., Turhan V., Cavuşlu S., H5N1 Avian Influenza: The Turkish Dimension, *Lancet Infectious Diseases*, 6(4), 186-7, (2006).
- ONER A.F., Bay A., Arslan S., Akdeniz A., Sahin H.A., Cesur Y., Epcacan S., Yilmaz N., Deger I., Kizilyildiz B., Karsen H., Ceyhan M., Avian Influenza A (H5N1) Infection in Eastern Turkey in 2006, *New England Journal of Medicine*, 335(21), 2179-85, (2006).

- ÖĞÜN E., Boynukara B., Van Gölü Çevresinde Yaşayan Gümüşi Martıların (*Larus argentatus*) Dışkılarından *Salmonella* ve *Shigella* 'ların İzolasyonu, *Van Tıp Dergisi*, 6(2), 8-12, (1999).
- ÖĞÜN, E., Adızel, Ö., Durmuş, A., Van Gölü Havzasında Kuşların Yoğun Olarak Yaşadıkları Alanlardan Alınan Su Örneklerindeki İndikatör Bakterilerin Sayımı, VIII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Van-Türkiye, (2008) s: 138-9.
- PALESE P., Young J.F., Variation of Influenza A, B and C Viruses, *Science*, 215, 1468-74, (1982).
- PARMLEY E.J., Bastien N., Booth T.F., Bowes V., Buck P.A., Breault A., Caswell D., Daoust P.Y., Davies J.C., Elahi S.M., Fortin M., Kibenge F., King R., Li Y., North N., Ojic D., Pasick J., Pryor S.P., Robinson J., Rodrigue J., Whitney H., Zimmer P., Leighton F.A., Wild Bird Influenza Survey, Canada, 2005, *Emerging Infectious Diseases*, 14(1), 84-7, (2008).
- PERELMAN B., Using Inactivated Vaccines to Control Low Pathogenic AI, *World Poultry*, 2(25), 30-1, (2009).
- PLAKOKEFALOS E., Markoulatos P., Ktenas E., Spyrou N., Vamvakopoulos N.C., A Comparative Study of Immunocapture ELISA and RT-PCR for Screening Clinical Samples from Southern Greece for Human Influenza Virus Types A and B, *Journal of Medical Microbiology*, 49, 1037-41, (2000).
- PLAYFORD E.G., Dwyer D.E., Laboratory Diagnosis of Influenza Virus Infection, *Pathology*, 34, 115-25, (2002).
- PODDAR S.K., Influenza Virus Typed and Subtypes Detection by Single Step Single Tube Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Agarose Gel Electrophoresis, *Journal of Virological Methods*, 99, 63-70, (2002).
- POTTER C.W., A History of Influenza, *Journal of Applied Microbiology*, 91, 572-9, (2001).
- PROMKUNTOD N., Antarasena C., Prommuang P., Prommuang P., Isolation of Avian Influenza Virus A Subtype H5N1 from Internal Contents (Albumen and Allantoic Fluid) of Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) Eggs and Oviduct During a Natural Outbreak, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081, 171-3, (2006).
- QIAO C., Tian G., Jiang Y., Li Y., Shi J., Yu K., Chen H., Vaccines Developed for H5 Highly Pathogenic Avian Influenza in China, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081, 182-92, (2006).

RAMEIX-WELTI M.A, Tomoiu A., Dos Santos Afonso E., van der Werf S., Naffakh N., Avian Influenza A Virus Polymerase Association with Nucleoprotein, but Not Polymerase Assembly, Is Impaired in Human Cells during the Course of Infection, *Journal of Virology*, 83, 1320-31, (2009).

ROTT R., The Pathogenic Determinant of Influenza Virus, *Veterinary Microbiology*, 33, 303-10, (1992).

RUNSTADLER J.A., Happ G.M., Slemons R.D., Sheng Z.M., Gundlach N., Petrula M., Senne D., Nolting J., Evers D.L., Modrell A., Huson H., Hills S., Rothe T., Marr T., Taubenberger J.K., Using RRT-PCR Analysis and Virus Isolation to Determine the Prevalence of Avian Influenza Virus Infections in Ducks at Minto Flats State Game Refuge, Alaska, During August 2005, *Archives of Virology*, 152, 1901-10, (2007).

SAITO R., Lim V., Suzuki T., Suzuki Y., Kida H., Nishimura S., Tashiro M., Characterization of a Human H9N2 Influenza Virus Isolated in Hong Kong, *Vaccine*, 20, 125-33, (2002).

SAITO T., Watanabe C., Takemae N., Chaisingh A., Uchido Y., Buranathai C., Suzuki H., Okamatsu M., Imade T., Parhariyanon S., Traiwanatam N., Yamaguchi S., Pathogenicity of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses of H5N1 Subtype Isolated in Thailand for Different Poultry Species, *Veterinary Microbiology*, 133, 65-74, (2009).

SAMBROOK J., Russel D.W., *Molecular Cloning*, Vol: 3, Gold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Third Ed, Chapter, 5, 5.4-5.13, (2001).

SCHIMADA S., Sadamasu K., Shinkai T., Kakuta O., Kikuchi Y., Shinohara M., Uchida K., Doi R., Kohmoto K., Shimizu M., Nakajima S., Virological Analysis of a Case of Dual Infection by Influenza A (H3N2) and B Viruses, *Japan Journal of Infectious Diseases*, 59, 67-8, (2006).

SCHNEBEL B., Dierschke V., Rautenschlein S., Ryll M., No Detection of Avian Influenza A Viruses of the Subtypes H5 and H7 and Isolation of Lentogenic Avian Paramyxovirus Serotype 1 in Passerine Birds During Stopover in the Year 2001 on the Island Hegoand (North Sea), *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 112, 456-60, (2005).

SCHOLTISSEK C., Burger H., Backmann P.A., Hannoun C., Genetic Relatedness of Haemagglutinin of the H1 Subtype of Influenza A Viruses Isolated from Swine and Birds, *Virology*, 129, 521-3, (1983).

SEO S.H., Kim H.S., Epidemiology of Influenza Virus in Korean Poultry, *International Congress Series*, 1263, 758-61, (2004).

- SERPEN A., Kuş Gribi (Avian Influenza) Virüsünde Mutasyon, *Veteriner Hekimleri Derneği Dergisi*, 78(1), 7-11, (2007).
- SHARP G.B., Kawaoka Y., Wright S.M., Turner B., Hinshaw V.S., Webster R.G., Wild Ducks are the Reservoir for Only a Limited Number of Influenza A Subtypes, *Epidemiology and Infection*, 110, 161-76, (1993).
- SHARP G.B., Kawaoka Y., Jones D.J., Bean W.J., Pryor S.P., Hinshaw V., Webster R.G., Coinfection of Wild Ducks by Influenza A Viruses: Distribution Patterns and Biological Significance, *Journal of Virology*, 71 (8), 6128-35, (1997).
- SHORTRIDGE K.F., Zhou N.N., Guan Y., Gao P., Ito T., Kawaoka Y., Kodihalli S., Krauss S., Markwell D., Murti K.G., Norwood M., Sene D., Sims L., Takada A., Webster R.G., Characterization of Avian H5N1 Influenza Viruses from Poultry in Hong Kong, *Virology*, 252, 331-42, (1998).
- SLEMONS R., Brugh M., Rapid Detection as an Aid in Early Diagnosis and Control of Avian Influenza, Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, U.S. Animal Health Association Kennett Sg. PA, Athens, Georgia, (1998) pp: 313-7.
- SOE S.H., Webster R.G., Cross-reactivity, Cell Mediated Immunity and Protection of Chickens from Lethal H5N1 Influenza Virus Infection in Hong Kong Poultry Markets, *Journal of Virology*, 75, 2516-25, (2001).
- SONG D., Lee C., Kang B., Jung K., Oh T., Kim H., Park B., Oh J., Experimental Infection of Dogs with Avian Origin Canine Influenza Virus (H3N2), *Emerging Infectious Diseases*, 15, 56-8, (2009).
- SPACKMAN E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue L.M., Lohman K., Daum L.T., Suarez D.L., Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 H7 Hemagglutinin Subtypes, *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 3256-60, (2002).
- SPACKMAN E., McCracken K.G., Winker K., Swayne D.E., H7N3 Avian Influenza Virus Found in a South American Wild Duck is Related to the Chilean 2002 Poultry Outbreaks, Contains Genes from Equine and North American Wild Bird Lineages and is Adopted to Domestic Turkeys, *Journal of Virology*, 80, 7760-4, (2006).
- STALLKNECHT D.E., Shane S.M., Host Range of Avian Influenza Virus in Free-living Birds, *Veterinary Research Communication*, 12, 125-41, (1988).

- STALLKNECHT D.E., Kearney M.T., Shane S.M., Zwank P.J., Effects of pH, Temperature and Salinity on Persistence of Avian Influenza Viruses in Water, *Avian Diseases*, 34, 412-8, (1990).
- STARICK E., Römer-Oberdörfer A., Werner O., Type and Subtype Specific RT-PCR Assays for Avian Influenza A Viruses (AIV), *Journal of Veterinary Medicine B*, 47, 295-301, (2000).
- STONE H.D., Efficacy of Avian Influenza Oil-Emulsion Vaccines in Chickens of Various Ages, *Avian Diseases*, 31, 483-90, (1987).
- STURM-RAMIREZ K.M., Ellis T., Bousfield B., Bissett L., Dyrting K., Rehg J.E., Re-emerging H5N1 Influenza Viruses in Hong Kong in 2002 are Highly Pathogenic to Ducks, *Journal of Virology*, 78, 4892-5901, (2004).
- STURM-RAMIREZ K.M., Hulse-Post D.J., Govorkova E.A., Humberd J., Seiler P., Puthavathana P., Buranathai C., Nguyen T.D., Chaisingh A., Long H.T., Naipospos T.S.P., Chen H., Ellis T.M., Guan Y., Peiris J.S.M., Webster R.G., Are Ducks Contributing to the Endemicity of Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus in Asia, *Journal of Virology*, 79, 11269-79, (2005).
- SUSS J., Schafer J., Sinnecker H., Webster G.R., Influenza Virus Subtypes in Aquatic Birds of Eastern Germany, *Archives of Virology*, 135, 101-14, (1994).
- SWAYNE D.E., Alexander D.J., Confirmation of Nephrotropism and Nephropathogenicity of Three Low Pathogenic Chicken Origin Influenza Viruses for Chickens, *Avian Pathology*, 23, 345-52, (1994).
- SWAYNE D.E., Suarez D.L; Schultz-Cherry S., Tumpey T.M., King D.J., Nakaya T., Palese P., Garcia-Sastre A., Recombinant Paramyxovirus Type 1-Avian Influenza-H7 Virus as a Vaccine for Protection of Chickens Against Influenza and Newcastle Disease, *Avian Diseases*, 47(3), 1047-50, (2003).
- SWAYNE D.E., Understanding the Complex Pathobiology of High Pathogenity Avian Influenza Viruses in Birds, *Avian Diseases*, 51, 242-9, (2007).
- SZÉCSI J., Boson B., Johnson P., Dupeyrot L., Matrosovich M., Klenk H.D., Klatzmann D., Volchkov V., Cosset F.L., Induction of Neutralizing Antibodies by Virus-like Particles Harboring Surface Proteins from Highly Pathogenic H5N1 and H7N1 Influenza Virus, *Virology Journal*, 3(70), 1-7, (2006).
- ŞANLIDAĞ T., Akçalı S., Akduman E., Avian Influenza, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 36(4), 229-40, (2006).

- TANAKA H., Park C., Ninomiy A., Ozaki H., Takada A., Umemura T., Kida H., Neurotropism of the 1997 Hong Kong H5N1 Influenza Virus in Mice, *Veterinary Microbiology*, 95, 1-13, (2003).
- THOMAS M.E., Bouma A., Eker H.M., Fonken A.J.M., Stegeman J.A., Nielen M., Risk Factors for the Introduction of High Pathogenicity Avian Influenza Virus into Poultry Farms During the Epidemic in the Netherlands in 2003, *Preventive Veterinary Medicine*, 69, 1-11, (2005).
- TOLLIS M., Di Trani L.D., Recent Development in Avian Influenza Research: Epidemiology and Immunoprophylaxis, *The Veterinary Journal*, 164, 202–15, (2002).
- TUMPEY T.M., Suarez D.L., Perkins L.E.L., Senne D.A., Lee J., Lee Y., Mo I., Sung H., Swayne D.E., Characterization of A Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza A Virus Isolated from Duck Meat, *Journal of Virology*, 76, 6344-55, (2002).
- TUMPEY T.M., Alvarez R., Swayne D.E., Suarez D.L., Diagnostic Approach for Differentiating Infected from Vaccinated Poultry on the Basis of Antibodies to NS1, the Nonstructural Protein of Influenza A Virus, *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), 676–83, (2005).
- VAN DEN BERG T., Houdart P., Avian Influenza Outbreak Management: Action at Time of Confirmation, Depopulation and Disposal Methods; the “Belgian Experience” During the H7N7 Highly Pathogenic Avian Influenza Epidemic in 2003, *Zoonosis and Public Health*, 55, 54-64, (2008).
- VARICH N.L., Gitelman A.K., Shilov A.A., Smirnov Y.A., Kaverin N.V., Deviation from the Random Distribution Pattern of Influenza Gene Segments in Reassortants Produced Under Non-selective Conditions, *Archives of Virology*, 153, 1149-54, (2008).
- WALLENSTEN A., Munster V.J., Fouchier R.A.M., Olsen B., Avian Influenza A Virus in Ducks Migrating Through Sweden, *International Congress Series*, 1263, 771-2, (2004).
- WALLENSTEN A., Munster V.J., Karlsson M., Lundkvist A., Brytting M., Stervander M., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M., Olsen B., High Prevalence of Influenza A Virus in Ducks Caught During Spring Migration Through Sweden, *Vaccine*, 24, 6734-35, (2006).
- WEBSTER R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y., Evolution and Ecology of Influenza A Viruses, *Microbiological Reviews*, 56, 152-79, (1992).
- WEBSTER R.G., Guan Y., Peiris M., Walker D., Krauss S., Zhou N.N., Govorkova E.A., Ellis T.M., Dyrting K.C., Sit T., Perez D.R., Shortridge F., Characterization of H5N1

Influenza Viruses that Continue to Circulate in Geese in Southeastern China, *Journal of Virology*, 76, 118-26, (2002).

WEBSTER R.G., Peiris M., Chen H., Guan Y., H5N1 Outbreaks and Enzootic Influenza, *Emerging Infectious Diseases*, 12(1), 3-8, (2006).

WIDJAJA L., Krauss S., Webby R.J., Xie T., Webster R.G., Matrix Gene of Influenza A Viruses Isolated from Wild Aquatic Birds: Ecology and Emergency of Influenza A Viruses, *Journal of Virology*, 78, 8771-9, (2004).

WILEY D.C., Skehel J.J., The Structure and Function of the Haemagglutinin Membrane Glycoprotein of Influenza Virus, *Annual Review of Biochemistry*, 56, 365-94, (1987).

WOOD G.W., McCauley J.W., Bashiruddin J.B., Alexander D.J., Deduced Amino Acid Sequences at the Haemagglutinin Cleavage Site of Avian Influenza A Viruses of H5 and H7 Subtypes, *Archives of Virology*, 130, 209-17, (1993).

WOOD G.W., Banks J., Strong I., Parsons G., Alexander D.J., An Avian Influenza Virus of H10 Subtype that is Highly Pathogenic for Chickens but Lacks Multiple Basic Amino Acids at the Haemagglutinin Cleavage Site, *Avian Pathology*, 25, 799-06, (1996).

WOOD G.W., Banks J., Brown H., Strong I., Alexander D.J., The Nucleotide Sequence of the HAI of the Haemagglutinin of an H1 Avian Influenza Virus Isolate from Turkeys in Germany Provides Additional Evidence Suggesting Recent Transmission from Pigs, *Avian Pathology*, 26, 347-54, (1997).

WHO (2002): Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. WHO/CDS/CSR/NCS/ 2002.5 Rev.1. <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whocdscsrncs20025rev.pdf>, Erişim Tarihi: 15 Mart 2006.

WRIGHT K.E., Wilson G.A.R., Novosad D., Dimock C., Tan D., Weber J.M. Typing and Subtyping of Influenza Viruses in Clinical Samples by PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 1180-4, (1995).

WU G., Yan S., Mutation Trend of Haemagglutinin of Influenza A Virus: A Review from a Computational Mutation Viewpoint, *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(5), 513-26, (2006).

XU X., Jin M., Yu Z., Li H., Qiu D., Tan Y., Chen H., Latex Agglutination Test for Monitoring Antibodies to Avian Influenza Virus Subtype H5N1, *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1953-55, (2004).

YUEN K.Y., Chan P.K.S., Peiris M., Tsang D.N.C., Que T.L., Shortridge K.F., Cheung P.T., To W.K., Ho E.T.F., Sung R., Cheng A.F.B., Clinical Features and Rapid Viral Diagnosis of

Human Disease Associated with Avian Influenza A H5N1 Virus, *The Lancet*, 351, 447-71, (1998).

ZOHARI S., Gyarmati P., Thorén P., Czifra G., Bröjer C., Belák S., Berg M., Genetic Characterization of the NS Gene Indicates Co-circulation of Two Sub-lineages of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus of H5N1 Subtype in Northern Europe in 2006, *Virus Genes*, 36, 117-25, (2008).

Ek 1: Proje kapsamında dışkı örneklerinin toplandığı kanatlı hayvan türleri (152-164)*

Ördekler-1						
	<i>Tür adı (Bilimsel adı)</i>	Türkçe adı	İngilizce adı	Statüsü	Evcil kanatlı ile temas ihtimali**	Fotoğrafi
1	<i>Anas penelope</i>	Fiyu	Wigeon	Kış ziyaretçisi	Düşük	
2	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	Teal	Kış ziyaretçisi	Düşük	
3	<i>Anas platyrhynchos</i>	Yeşilbaş ördek	Mallard	Yerli	Yüksek	
4	<i>Anas acuta</i>	Kılkuyrak	Pintail	Kış ziyaretçisi	Düşük	

*Fotoğraflar proje kapsamında çekilmiş olup izinsiz çoğaltılamaz.

**Proje süresince yaptığımız saha gözlemlerinde sulak alan ve göl kıyısına yakın yerleşim yerlerinin tümünde evcil kanatlıların diğer kanatlılarla teması olduğu görüldü.

Ördekler-2						
	Tür adı (Bilimsel adı)	Türkçe adı	İngilizce adı	Statüsü	Evcil kanatlı ile temas ihtimali	Fotoğrafi
5	<i>Anas querquedula</i>	Çıkırıkçın	Garganey	Göçmen	Orta	
6	<i>Anas cylypeata</i>	Kaşıkgağa	Shoveler	Kış ziyaretçisi	Yüksek	
7	<i>Tadorna ferruginea</i>	Angıt	Ruddy shelduck	Yerli	Yüksek	
8	<i>Tadorna tadorna</i>	Suna	Shelduck	Yerli	Yüksek	

Ördekler						
	Tür adı (Bilimsel adı)	Türkçe adı	İngilizce adı	Statüsü	Evcil kanatlı ile temas ihtimali	Fotoğrafı
9	<i>Aythya ferina</i>	Elmabaş patka	Pochard	Kış ziyaretçisi +Göçmen	Yüksek	
10	<i>Aythya fuligula</i>	Tepeli pakta	Tufted duck	Kış ziyaretçisi	Düşük	
11	<i>Oxyura leucocephala</i>	Dikkuyruk	White-headed duck	Göçmen	Düşük	
Kuğular						
12	<i>Cygnus cygnus</i>	Ötücü kuğu	Whooper swan	Kış ziyaretçisi	Düşük	

Kazlar						
	Tür adı (Bilimsel adı)	Türkçe adı	İngilizce adı	Statüsü	Evcil kanath ile temas ihtimali	Fotoğrafi
13	<i>Anser albifrons</i>	Akalınlı büyük sakarca kazı	Greater white-fronted goose	Kış ziyaretçisi	Düşük	
Flamingolar						
14	<i>Phoenicopterus ruber</i>	Flamingo	Greater flamingo	Transit göçer	Yüksek	
Su kuşları-1						
15	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Bahri (küçük batağan)	Little grebe	Yerli	Yüksek	
16	<i>Podiceps nigricollis</i>	Karaboyun batağan	Black necked grebe	Yerli	Yüksek	

Su kuşları-2						
	<i>Tür adı (Bilimsel adı)</i>	Türkçe adı	İngilizce adı	Statüsü	Evcil kanatlı ile temas ihtimali	Fotoğrafı
17	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Karabatak	Cormorant	Rastlantısal tür	Düşük	
18	<i>Fulica atra</i>	Sakarmeke	Coot	Yerli	Yüksek	
Balıkçılar						
19	<i>Nycticorax nycticorax</i>	Gece balıkçılı	Night heron	Göçmen	Düşük	
Leylekler						
20	<i>Ciconia ciconia</i>	Akleylek	White stork	Göçmen	Düşük	

Kıyı kuşları-1

	<i>Tür adı (Bilimsel adı)</i>	Türkçe adı	İngilizce adı	Statüsü	Evcil kanatlı ile temas ihtimali	Fotoğrafı
21	<i>Himantopus himantopus</i>	Uzunbacak	Black-winged stilt	Göçmen	Düşük	
22	<i>Vanellus vanellus</i>	Kızkuşu	Lapwing	Göçmen	Orta	
23	<i>Tringa totanus</i>	Kızılback	Redshank	Göçmen	Orta	
24	<i>Philomachus pugnax</i>	Döğüşken kuş	Ruff	Transit göçer	Düşük	

Kıyı kuşları-2

	<i>Tür adı (Bilimsel adı)</i>	Türkçe adı	İngilizce adı	Statüsü	Evcil kanatlı ile temas ihtimali	Fotoğrafı
25	<i>Motacilla alba</i>	Ak kuyruk sallayan	White wagtails	Yerli	Orta	
26	<i>Motacilla flava feldegg</i>	Maskeli kuyruk sallayan	Black-headed wagtail	Göçmen	Orta	

Martılar ve sumrular						
	Tür adı (Bilimsel adı)	Türkçe adı	İngilizce adı	Statüsü	Evcil kanatlı ile temas ihtimali	Fotoğrafı
27	<i>Larus ridibundus</i>	Karabaş martı	Black-headed gull	Yerli	Yüksek	
28	<i>Larus michahellis</i>	Van martısı	Van gull	Yerli	Yüksek	
29	<i>Sterna hirundo</i>	Irmak sumrusu	Common tern	Göçmen	Düşük	
30	<i>Chlidonias leucopterus</i>	Akkanat sumru	White-winged black tern	Göçmen	Orta	

Kara kuşları-1						
	Tür adı (Bilimsel adı)	Türkçe adı	İngilizce adı	Statüsü	Evcil kanatlı ile temas ihtimali	Fotoğrafı
31	<i>Columba livia</i>	Kaya güvercini	Rock dove	Yerli	Yüksek	
32	<i>Merops apiaster</i>	Arıkuşu	Bee-eater	Göçmen	Düşük	
33	<i>Coracias garrulus</i>	Kuzgun	Roller	Göçmen	Düşük	
34	<i>Galerida cristata</i>	Tepeli toygaz	Crested lark	Yerli	Düşük	

Kara kuşları-2						
	Tür adı (Bilimsel adı)	Türkçe adı	İngilizce adı	Statüsü	Evcil kanatlı ile temas ihtimali	Fotoğrafi
35	<i>Alauda arvensis</i>	Tarlakuşu	Skylark	Yerli	Orta	
36	<i>Riparia riparia</i>	Kıyı (kum) kırlangıcı	Sand martin	Göçmen	Düşük	
37	<i>Hirundo rustica</i>	İs (Kır) kırlangıcı	Swallow	Göçmen	Yüksek	
38	<i>Sturnus vulgaris</i>	Sığırcık	Starling	Yerli	Yüksek	

Kara kuşları-3						
	Tür adı (Bilimsel adı)	Türkçe adı	İngilizce adı	Statüsü	Evci kanatlı ile temas ihtimali	Fotoğrafi
39	<i>Alectoris chukar</i>	Kıvalı keklik	Chukar partridge	Yerli	Orta	
40	<i>Sturnus roseus</i>	Pembe sığırcık	Rose-coloured starling	Göçmen	Düşük	
41	<i>Passer domesticus</i>	Ev serçesi	House sparrow	Yerli	Yüksek	
42	<i>Pica pica</i>	Saksağan	Magpie	Yerli	Yüksek	

Kara kuşları-4						
	<i>Tür adı (Bilimsel adı)</i>	<i>Türkçe adı</i>	<i>İngilizce adı</i>	<i>Statüsü</i>	<i>Evcil kanatlı ile temas ihtimali</i>	<i>Fotoğrafi</i>
43	<i>Corvus monedula</i>	Cüce karga	Jackdaw	Yerli	Yüksek	
44	<i>Corvus frugilegus</i>	Ekin kargası	Rook	Yerli	Yüksek	

Evcil kanatlılar						
	<i>Tür adı (Bilimsel adı)</i>	Türkçe adı	İngilizce adı	Statüsü	Evcil kanatlı ile temas ihtimali	Fotoğrafi
45	<i>Anser domesticus</i>	Evcil kaz	Domestic goose	Yerli	Yüksek	
46	<i>Gallus domesticus</i>	Evcil tavuk	Hen	Yerli	Yüksek	
47	<i>Meleagris sp.</i>	Evcil hindi	Domestic turkey	Yerli	Yüksek	

EK 2: RT-PCR ile avian influenza tip A M2 geni yönünden pozitiflik saptanan türler ve statüleri (165-178)*

Ordo : **PHOENICOPTERIFORMES**
Familya : *Phoenicopteridae*
Cins : *Phoenicopterus*
Tür : *Phoenicopterus ruber* (Flamingo)
Statü : Transit göçer



*Fotoğraflar proje kapsamında çekilmiş olup izinsiz çoğaltılamaz.

Ordo : ANSERIFORMES
Familya : Anatidea
Cins : *Anas*
Tür : *Anas clypeata* (Kaşıkğaga)
Statü : Kış ziyaretçisi



Ordo : ANSERIFORMES
Familiya : Anatidea
Cins : *Anas*
Tür : *Anas crecca* (Çamurcun)
Statü : Kış ziyaretçisi



Ordo : ANSERIFORMES
Familya : Anatidea
Cins : *Anas*
Tür : *Anas penelope* (Fiyu)
Statü : Kış ziyaretçisi



Ordo : ANSERIFORMES
Familiya : Anatidea
Cins : *Aythya*
Tür : *Aythya fuligula* (Tepeli patka)
Statü : Kış ziyaretçisi



Ordo : ANSERIFORMES
Famİlya : Anatidea
Cins : *Anas*
Tür : *Anas acuta* (KılkuYruk)
Statü : Kış ziyaretçisi



Ordo : ANSERIFORMES
Familya : Anatidea
Cins : Aythya
Tür : *Aythya ferina* (Elmabaş patka)
Statü : Kış ziyaretçisi+Göçmen



Ordo : CHARADRIIFORMES
Familya : *Recurvirostridae*
Cins : *Himantopus*
Tür : *Himantopus himantopus* (Uzunbacak)
Statü : Göçmen



Ordo : CHARADRIIFORMES
Familya : Scolopacidae
Cins : *Tringa*
Tür : *Tringa totanus* (Kızılbacak)
Statü : Göçmen



Ordo : ANSERIFORMES
Famİlya : Anatidea
Cins : Anas
Tür : *Anas querquedula* (Çıkrikçın)
Statü : Göçmen



Ordo : ANSERIFORMES
Familya : *Anatidea*
Cins : *Tadorna*
Tür : *Tadorna tadorna* (Suna)
Statü : Yerli



Ordo : ANSERIFORMES
Familya : Anatidea
Cins : *Anas*
Tür : *Anas platyrhynchos* (Yeşilbaş ördek)
Statü : Yerli



Ordo : CHARADRIIFORMES
Familya : *Laridae*
Cins : *Larus*
Tür : *Larus ridibundus* (Karabaş (Gülen) martı)
Statü : Yerli



Ordo : CHARADRIIFORMES
Familya : *Laridae*
Cins : *Larus*
Tür : *Larus michahellis* (Van martısı)
Statü : Yerli



TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 106O571
Proje Başlığı: Van Gölü Havzasında Bazı Kanatlı Türlerinde Avian İnfluenza A virüslerinin Real-Time PCR ile Tespiti, İzolasyonu ve Alt Tiplerinin Belirlenmesi
Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Banur BOYNUKARA Araştırmacılar: Doç. Dr. Ziya İLHAN, Yrd. Doç. Dr. Timur GÜLHAN, Yrd. Doç. Dr. İsmail Hakkı EKİN, Yrd. Doç. Dr. Abdülbaki AKSAKAL, Yrd. Doç. Dr. Özdemir ADİZEL, Dr. Fethiye ÇÖVEN, Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN, Dr. Atilla DURMUŞ, Doç. Dr. Hasan SOLMAZ
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, 65080, Kampus / Van
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: 1-TÜBİTAK, Atatürk Bulvarı, No: 221, Kavaklıdere, 06100 / Ankara, 2-Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı, 65080, Kampus / Van
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.01.2007-15.01.2009
Öz: Araştırmada, Van Gölü Havzasındaki çeşitli kanatlı türlerine ait 1910 dışkı örneğinin 51'i (%2.7), RT-PCR ile AI tip A M2 yönünden pozitif bulundu. RT-PCR pozitif olan örnekler aynı yöntemle H5N1 yönünden incelendi ve 4 örnek (%7.8) pozitif bulundu. İzolasyon amacıyla RT-PCR pozitif 51 örnek embriyolu tavuk yumurtasına ekildi ve 11'inden (%21.6) AI tip A virüsü izole edildi. HI ve NI testleriyle izolatların 3'ü H1N7, 2'si H7N9 ve 2'si H11N9 olarak tiplendirildi.
Anahtar Kelimeler: Avian influenza, kanatlı hayvan (rastlantısal, göçmen, yerli, transit göçer, kış ziyaretçisi, rastlantısal tür), dışkı, real-time PCR, M2 geni, H5N1, izolasyon, tiplendirme
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet ☐ Gerekli Değil ☒ Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar 1) Boynukara B, Adızel Ö, İlhan Z, Ekin İH, Aksakal A, Çöven F, Solmaz H, Gülhan T, Ögün E, Durmuş A, Gürtürk K, (2007), The first data obtained concerning the determination of avian influenza A viruses in some avian species in Van Lake basin by real-time PCR, their isolation and sub-typing. 2 nd International Eurasian Ornithology Congress 26-29 October, p: 35, Antalya / Turkey. 2) Boynukara B, Gülhan T, İlhan Z, Ekin İH, Aksakal A, Adızel Ö, Ögün E, Durmuş A, Çöven F, Solmaz H, Gürtürk K, (2008). Van Gölü Havzasında bazı kanatlı türlerinde avian influenza A virüslerinin RT-PCR ile tespiti, izolasyonu ve alt tiplerinin belirlenmesi (Verilerin II. Sunumu). VIII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 7-9 Ekim, s: 184-185, Van / Türkiye. 3) Boynukara B, Aksakal A, Gülhan T, İlhan Z, Ekin İH, Adızel Ö, Ögün E, Durmuş A, Çöven F, Solmaz H, (2009), Determination of avian influenza A viruses in some avian species in Van Lake basin by RT-PCR, their isolation and sub-typing (Third presenting of data). 3 rd Epizone Annual Meeting, Crossing Borders, 12-15 May 2009, Antalya, Turkey. 4) Boynukara B, İlhan Z., Aksakal A, Ekin İH, Gülhan T, Solmaz H, Avian influenza tip A virüsleri: etiyoloji, teşhis ve korunma. YYÜ Vet. Fak. Derg. (Haziran 2009 sayısında yayınlanmak üzere kabul edildi.)