

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YEREL MAVİDİL VİRUSU İZOLATLARININ PLAK
REDÜKSİYON NÖTRALİZASYON (PRN) VE REVERZ
TRANSKRİPTAZ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU
(RT-PZR) TEKNİKLERİ İLE SEROTİPİK
İDENTİFİKASYONU**

Volkan YILMAZ

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Aykut ÖZKUL**

2009-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Viroloji Doktora Programı

çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 08 / 07/ 2009

Prof. Dr. İbrahim BURGU

Ankara Üniversitesi

Veteriner Faköltesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Yılmaz AKÇA

Ankara Üniversitesi

Veteriner Faköltesi

Prof. Dr. Hakan YARDIMCI

Ankara Üniversitesi

Veteriner Faköltesi

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Ankara Üniversitesi

Veteriner Faköltesi

Doç. Dr. Mehmet ÇABALAR

Harran Üniversitesi

Veteriner Faköltesi

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Etiyoloji	2
1.2. Epidemiyoloji	8
1.2.1. Bulaşma	8
1.2.2. Konakçı Duyarlılığı	11
1.2.3. Enfeksiyonun Coğrafi Dağılımı	12
1.3. Patogenez	16
1.4. Klinik Semptomlar	20
1.5. Nekropsi Bulguları	21
1.6. Histopatolojik Bulgular	22
1.7. Teşhis	22
1.7.1. Virus İzolasyonu	23
1.7.2. Viral Antijenlerin Tespiti	24
1.7.3. Viral RNA Tespiti	27
1.7.4. Antikorların Tespiti	28
1.7.4.1. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT)	28
1.7.4.2. Diğer Serolojik Testler	28
1.8. Bağışıklık	29
1.9. Koruma ve Kontrol	31
1.10. Amaç	34
2. MATERYAL VE METOD	35
2.1. Materyal	35
2.1.1. Hücre Kültürü	35
2.1.2. Referans Viruslar	35
2.1.3. BTV Saha İzolatları	35
2.1.4. Dana Serumu	37
2.1.5. Deney Hayvanı	37
2.2. Metot	37
2.2.1. BTV Saha İzolatlarının Üretilmesi ve Klonlanması	37
2.2.2. BTV Saha İzolatlarının Plak Titrasyon Yöntemi ile Enfeksiyözite Güçlerinin Belirlenmesi	38
2.2.3. BTV Saha İzolatlarının İdentifikasyonu	38
2.2.3.1. Moleküler Genetik İdentifikasyon	39
2.2.3.1.1. Jenerik Primerler ile Moleküler İdentifikasyon	39
2.2.3.1.1.1. BTV Genomik RNA İzolasyonu	39
2.2.3.1.1.2. Jenerik Reverz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (jRT-PZR)	39

2.2.3.1.1.3. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi İle Görüntülenmesi	41
2.2.3.1.2. Serotip Spesik Primerler ile Moleküler İdentifikasyon (sRT-PZR)	42
2.2.3.2. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT) ile Serotiplendirme	43
2.2.3.2.1. Hiperimmunizasyon İçin Virusların Üretilmesi ve Konsantrasyonu	43
2.2.3.2.2. Hiperimmunizasyon	43
2.2.3.2.3. Serum Nötralizasyon Testi (SNT)	44
2.2.3.2.4. Hiperimmun Serumların Serum Nötralizasyon 50 (SN ₅₀) Değerinin Mikronötralizasyon Yöntemi İle Saptanması	45
2.2.3.2.5. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT)	45
3. BULGULAR	47
3.1. Virolojik Çalışma	47
3.1.1. Hücre Kültürü İnokulasyonu	47
3.1.2. Virusların Enfeksiyözite Gücü	47
3.2. Moleküler Virolojik Tekniklerle Serotipik Karakterizasyon	48
3.2.1. Jenerik Reverz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (jRT-PZR)	48
3.2.2. Serotip Spesifik Reverz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (sRT-PZR)	49
3.3. Serolojik Çalışma	52
3.3.1. Serum Nötralizasyon Testi	52
3.3.2. Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon (SN ₅₀) Değeri	52
3.3.3. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT)	52
4. TARTIŞMA	54
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
ÖZET	64
SUMMARY	65
KAYNAKLAR	66
EKLER	82
EK-1 Araştırmaya ait etik kurul raporu	82
ÖZGEÇMİŞ	83

ÖNSÖZ

Mavidil (BT) hastalığı, sokucu sineklerle nakledilen, koyunlarda klinik enfeksiyona bağlı olarak ekonomik kayıplara yol açan önemli bir viral hastalıktır. Hastalık, özellikle ekonomisi hayvancılık temeline dayanan ülkelerde, çok büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

İlk olarak 1905 yılında Güney Afrika'da tanımlanan hastalık, buradan subtropikal Afrika'ya, Arap Yarımadası'na, Ortadoğu ve Güneydoğu Asya'ya, Güney Avrupa'ya ve Amerika'ya yayılmıştır. Yayıldığı her coğrafyada salgınlar oluşturarak ülkelerin hayvansal verimliliğine ciddi ölçüde zararlar vermiştir. Hastalık son olarak Kıta Avrupa'sının daha önce hiç etkilenmemiş kuzey bölgelerinde görülmüştür. Ülkemizde ise BT enfeksiyonu ile ilgili ilk veriler 1944 yılına dayanmaktadır. Hatay ve çevresinde klinik olarak tespit edilen mavidil enfeksiyonunun sınır komşusu olan Suriye' den kaynaklandığı bildirilmiştir. Müteakip yıllarda da görülen enfeksiyon, klinik enfekte hayvanların kesilmesi ve diğer sürülerin ise ovalık bölgeden yüksek rakımlı dağlık bölgelere götürülmesi suretiyle kontrol altına alınmıştır. Enfeksiyonla ilgili yakın zamanda yapılan izolasyon çalışmaları, etkenin tip-4 dışındaki bazı serotiplerinin de mevcut olduğunu ortaya koymuştur. BTV'nin 1998 yılından beri Güney ve Batı Anadolu'da aktif olduğu bildirilmiştir. Kan emen vektör arthropodlarla naklediliyor olması yanında, ülkemizde belirlenen en az 3 serotipinin bulunması sebebiyle diğer virus enfeksiyonlarından farklı epidemiyolojik özelliklere sahiptir. Bu durum enfeksiyonun varlığı ve seyrinin serotip düzeyinde sürekli ve çok süratli takibini gerekli kılmaktadır. Uygulamada virusların izole edilebilmesine rağmen serotipik identifikasyonun gerçekleştirilememesi ve hatta bu konuda uluslararası referenz laboratuvarlara bağımlı olunması, söz konusu takibin sağlıklı bir şekilde yapılmasını engelleyen en önemli olumsuzluk olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu çalışmanın her aşamasında özveri, olumlu yönlendiriciliği, sabır ve yapıcı eleştirilerinden dolayı, Danışman Hocam Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nın tüm olanaklarından faydalanmamı sağlayan ve tez izleme komitesi çalışmalarında olumlu yönlendirmeleri ile katkıda bulunan Prof. Dr. İbrahim BURGU'ya, yardım ve desteklerini gördüğüm Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Yılmaz AKÇA, Prof. Dr. Feray ALKAN, Doç. Dr. Seval BİLGE DAĞALP, Doç. Dr. M. Taner KARAOĞLU ve Doç. Dr. T. Çiğdem OĞUZÖĞLU ile tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. Hakan YARDIMCI'ya, doktora tez çalışmam boyunca birlikte görev yaptığım Araştırma Görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma ve tez çalışmama katkıda bulunan herkese teşekkür ederim.

Her zaman gösterdikleri fedakarlık, sabır ve teşviklerinden dolayı sevgili aileme ve tez çalışmamın yazımında desteği için Ferhat AYKOL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGID	: Agar Gel İmmuno Diffüzyon
AH	: Arthrogryposis-Hydranencephaly
Bç	: Baz çifti
B-ELİSA	: Blocking ELİSA
BHK	: Baby Hamster Kidney
BT	: Bluetongue (Mavidil)
BTV	: Bluetongue virus (Mavidil virusu)
°C	: Santigrat derece
cDNA	: Komplementer deoksiribonükleik asit
C-ELISA	: Competitive-enzyme linked immunosorbent assay
CF	: Complement Fixation
CIEF	: Counter immun electrophoresis
cm ³	: Santimetre küp
CO ₂	: Karbondioksit
CPE	: Cytopathic effect
dNTP	: Deoksi nukleotid tri phosphate
DKID ₅₀	: Doku kültürü enfeksiyon doz % 50
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
FDS	: Fötal dana serumu
HI	: Hemaglutinasyon İnhibisyon
I-ELİSA	: İmmuncapture enzyme linked immunosorbent assay
IF	: İmmunfloresan
IFAT	: İndirekt Floresan Antikor Tekniği
IP	: İmmun Peroksidaz
jRT-PZR	: Jenerik Reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
Kb	: Kilobase
Kd	: Kilodalton
MAb	: Monoklonal antikor
MDBK	: Madin-Darby bovine kidney
MDCK	: Madin-Darby canine kidney
µl	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
OIE	: Office International des Epizooties (Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü)
PRN	: Plak Redüksiyon Nötralizasyon
RNA	: Ribonükleik asit
RT-PZR	: Reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
SN	: Serum Nötralizasyon
sRT-PZR	: Serotip spesifik Reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
Taq	: Thermus aquaticus
Vero	: African green monkey kidney
VP	: Viral protein

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1.1. Mavidil virion organizasyonu.	3
Şekil 1.2. BTV serotiplerinin kıta Avrupa'sına erişim yolları.	14
Şekil 1.3. 2009 Mart ayı itibariyle BTV serotiplerinin AB topluluğu üye ülkelerindeki dağılımı.	16
Şekil 1.4. BTV serotipleri arasındaki serolojik ilişki ve derecesi.	25
Şekil 1.5. BTV serotipleri arasındaki serolojik ilişki temelinde oluşturulan filogenetik gruplandırma.	26
Şekil 2.1. PRN testinin uygulamasına ilişkin ana basamaklar.	46
Şekil 3.1. CPE ve hücre kontrol.	47
Şekil 3.2. Jenerik RT-PZR sonuçları.	49
Şekil 3.3. Tip spesifik RT-PZR sonuçları.	50
Şekil 3.4. PRNT ile serotipik identifikasyonu yapılan iki izolata ilişkin plak görünüşleri	53

ÇİZELGELER

Sayfa No

Çizelge 1.1. BTV serotiplerinin coğrafi dağılımı ve başlıca Culicoides vektör türleri.	8
Çizelge 2.1. Araştırmada kullanılan virus izolatlarına ait bilgiler.	36
Çizelge 2.2. RT-PZR karışımları ve bileşenleri.	40
Çizelge 2.3. PZR' de kullanılan primer dizinleri, yerleşimleri ve elde edilen ürün büyüklüğü.	41
Çizelge 2.4. Jenerik primerlerle yapılan PZR'nun karışım bileşimi.	41
Çizelge 2.5. Tip spesifik PZR için kullanılan primer dizinleri ve özellikleri.	42
Çizelge 2.6. BT virusu tip spesifik hiperimmün serum üretimi amacıyla oluşturulan tavşan grupları ve inokulasyon şeması.	44
Çizelge 3.1. BTV izolatlarının yapılan plak titrasyon sonrası elde edilen enfektivite değerleri.	48
Çizelge 3.2. Araştırmada kullanılan BT virus izolatlarının jRT-PZR ile sRT- PZR/PRNT'nin karşılaştırmalı sonuçları.	51

1. GİRİŞ

Mavdil (Bluetongue, BT), sokucu sinekler ile nakledilen, evcil ve bazı yabani ruminantların konjesyon, ödem ve hemoraji ile karakterize, özellikle dişi ve erkeklerin üreme organlarına yerleşerek döl veriminde azalma, abort ve konjenital anomaliler nedeniyle önemli ekonomik kayıplara neden olan, mortalite ve morbidite oranı yüksek viral bir hastalıktır (Murphy ve ark.,1999). BT, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE)'nün düzenlediği İhbarı Mecburi hastalıklar listesinde yer almaktadır (OIE, 2000).

BT ilk defa 1905 yılında Güney Afrika'da Theiler tarafından bildirilmiştir. Yirminci yüzyılın başlarına kadar hastalık bilimsel çalışmalarda “Malarial Catarrhal Fever” olarak tanımlanmıştır. BT ismi ise ilk kez 1905 yılında Spreull tarafından önerilmiştir (Mertens, 1999). Afrika'ya özgün bir hastalık olduğu düşünülen BT enfeksiyonunun, 1943 yılında Kıbrıs'ta görülen ve koyunlarda ekonomik kayıpla seyreden enfeksiyonunun etkeninin Bluetongue virus tip 3 (BTV-3) olarak identifiye edilmesi sonrasında Afrika'nın dışındaki ülkelerde de varlığı belirlenmiştir (Gibbs, 1992). Kaliforniya'da 1952 yılında Mc Gawan tarafından klinik olarak teşhis edilmiş ve daha sonraki yıllarda etken Mc Kercher ve ark. (1953) tarafından izole edilmiştir. “Soremuzzle” olarak isimlendirilen enfeksiyonun BT olduğu anlaşılmıştır. Büyük ekonomik kayıplara yol açan bu enfeksiyon sıklıkla görülmüş ve 1953'te daha önce enfeksiyon geçirmemiş sürülerde %100'e varan bir morbidite oranına ulaştığı bildirilmiştir (Hourrigan ve Klingsporn, 1975a; Mertens, 1999). Enfeksiyon, 1940'da Filistin, 1956'da Portekiz ve İspanya, 1958'de Pakistan, 1977'de Avustralya, Yunanistan, İsrail ve diğer bazı ülkelerde bildirilmiştir (Hassan, 1992; Mertens, 1999). Bundan başka, 1998 yılından bu yana Bulgaristan, Yunanistan, İtalya, Portekiz, Ege adalarını etkileyen BT enfeksiyonu epizootisi seyretmektedir (Mellor ve Wittmann, 2002). Son dönemlerde Hollanda, Belçika, Lüksemburg, Fransa ve Almanya gibi kuzey Avrupa ülkelerinde ilk defa görülen BTV-8' in sığırlarda da hastalığa neden olduğu bildirilmektedir (Thiry ve ark., 2006; Toussaint ve ark., 2007; Hoffmann ve ark., 2008).

BTV' nin 24 serotipinin varlığı ve serotipler arasında çok düşük çapraz bağışıklığın olması aşılama stratejilerinde problemlere yol açmaktadır. Fertilité problemleri, ölüm, hayvan hareketlerinin ve ticari tohum ithalinin kısıtlanması gibi ekonomik kayıplara yol açması sebebiyle ihbarı mecburi hastalıklar arasında yer almıştır.

1.1. Etiyoloji

BTV'nin, biyolojik ve antijenik özellikleri yönünden Orbivirus genusuna dahil diğer viruslar ile [African Horse Sickness virus (AHSV), geyiklerin Epizootic Haemorrhagic Disease virusu (EHDV) ve Palyam virus] yakınlığı olduğu belirlenmiştir (Roy, 1996).

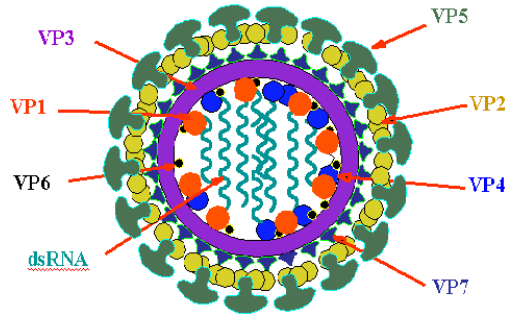
BTV, Reoviridae ailesinin orbivirus cinsinde Bluetongue virus grup içerisinde sınıflandırılmış olup, 24 serotipi vardır. Serotipler arasında virulans farklılıkları ve çok düşük çapraz bağışıklık tespit edilmiştir (Roy, 2002).

BTV genomu linear yapıda, çift iplikçikli 10 RNA segmentinden oluşur ve büyüklüğü yaklaşık 19,2 kb'dır (Roy, 2002). BT virusunun dansitesi 1.337 g/cm^3 dür. Genomunun %57'si AU, %43'ü GC'dir. RNA segmentlerinin 5' ve 3' terminalleri korunmuştur. Bu terminallerin pozitif iplikçikteki dizinleri 5' ucunda GUUAAA ve 3' ucunda ACUUAC'dir (Mertens ve Sangar, 1985).

Virion 4 büyük (VP2, VP3, VP5 ve VP7) ve 3 küçük (VP1, VP4 ve VP6) yapısal proteinden meydana gelmiştir. Kübik simetrik nükleokapsit 2 katmanlı ve ortalama 85 nm çapındadır. Çift tabakalı partikül virusun tam infeksiyöz şeklidir. Dış kapsit düzenli yayılmış VP2 ve VP5 yapısal proteinlerden meydana gelmiştir. Dış kapsitin altında "Kor" (Core) adı verilen iç kapsit ve genom bulunur. Virion kor bölgesi, transkripsiyon ve viral RNA ları paketlemek için gerekli bir kaç enzimi içerir. İç kapsit düzenli yayılmış VP1, VP3, VP4, VP6 ve VP7 yapısal proteinleri ile NS1, NS2 ve NS3 olarak adlandırılan yapısal olmayan proteinlerden meydana gelmektedir. Her iki katman da ikozahedral simetri sergilemekte olup, elektron mikroskop preparatlarında iç kapsiti oluşturan proteinlerin görüntüsü yüzük şeklini andırdığından dolayı bu cinse orbi

(yüzük) virus ismi verilmiştir (Knudson ve Monath, 1990; Mertens, 1999). Şekil 1.1’de BT virionunun şematik görüntüsü sunulmuştur.

Çoğu ssRNA virusunun aksine Orbiviruslar enfeksiyon sırasında genetik ve antijenik olarak stabildirler. Nokta mutasyonları invivo ortamda ssRNA viruslarındaki kadar artış göstermez (De Mattos ve ark., 1994).



Şekil 1.1: BT virion organizasyonu (Knudson ve Monath, 1990; Mertens, 1999).

Dış Kapsit Yapısal Proteinleri;

Viral protein 2 (VP2): L2 genom segmenti tarafından kodlanan VP2, virusun hücreye adsorbsiyon ve penetrasyonunda önemli rol oynamaktadır. Nötralize edici aktivitede önemli epitoplar içeren VP2 serotip spesifik antijendir ve serotipin belirlenmesinde etkili olmaktadır. Nötralizasyon ve hemaglutinasyon aktivitelerine sahiptir (Van der Walt, 1980; Huismans ve Erasmus, 1983; Cowley ve Gorman, 1987). Proteolitik enzimlerle birlikte virulensin ortaya çıkmasında görev almaktadır (Roy, 1989a; Roy, 1989b). VP2 proteini çok değişken olup yer yer glikozillenmiştir. Sekans analizleri sonucunda VP2’yi meydana getiren aminoasitlerin bazı serotipler arasında (BTV-1, 2, 10, 11, 13, 17) benzerlik gösterdikleri görülmüştür (Hirasawa ve Roy, 1990; Oldfield ve ark., 1991; Yang ve Li, 1992). Serotipler arası VP2 proteinin aminoasit sekans farklılığı %22.4 ile %73 arasında değişmektedir. VP2 proteini antiviral bağışıklığın oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Baculovirus ekspresyon sistemiyle elde edilen VP2 proteininin, fare fibroblast L929 hücre yüzeyi reseptörlerine yarışmalı bağlanarak vahşi

virusun duyarlı hücreyi enfekte etmesini engellediği indirekt immunfloresan tekniği ile gösterilmiştir (Hassan ve Roy, 1999).

Viral protein 5 (VP5): M5 genom segmentinin kodladığı viral protein 5, dış kapsit tabakasında yer almasına rağmen kısmi nötralizasyon aktivitesine sahiptir (Marshall ve Roy, 1990). Bu protein, enfeksiyonun başlangıç safhalarında virusun hücreye tutunmasında ve hücreye girişinde önemlidir. Dış kapsitin iç yüzeyinde yer alan ve oldukça değişken bir protein olan VP5'in sekans analizleri sonucunda aminoasit yapısının bazı serotipler arasında (BTV-1, 2, 10, 11, 13, 17) benzerlik gösterdiği ortaya konulmuştur (Hirasawa ve Roy, 1990; Oldfield ve ark., 1991; Yang ve Li, 1992). VP5 de glikozile bir proteindir.

Yüzey glikoproteini olan VP2 ve VP5 proteinleri konakta bağışıklığın devamını sağlayan nötralizan antikorların oluşmasından sorumludur. Bu özelliklerinden dolayı söz konusu proteinlerinin aşı üretiminde kullanılması mümkündür. VP2 proteinine karşı oluşan antikorların, VP5 proteinine göre daha yüksek düzeyde bağışıklık sağladığı öne sürülmektedir (Marshall ve Roy, 1990).

İç Kapsit Yapısal Proteinleri;

Viral protein 1 (VP1): L1 segmenti tarafından kodlanan ve virionda az miktarda bulunan VP1 yaklaşık 150 Kd ağırlığındadır (Huismans ve Van Dijk, 1990). Yapısal proteinler içinde en büyük olan VP1 proteini, RNA polimeraz aktivitesine sahiptir (Roy, 1989b).

Viral protein 3 (VP3): İç kapsidin genoma yakın iç yüzeyinde yerleşmiştir. L3 segmenti tarafından kodlanmakta ve 100 Kd ağırlığındadır. Virion morfogenezinde çok önemli göreve sahiptir. İnternal proteinlerle karşılıklı etkileşerek transkripsiyon ve replikasyonda görev alır. Hem virion hem de enfekte hücrede en çok bulunan viral proteindir. Hidrofobik yapıya sahiptir (Roy, 1989b).

Viral protein 4 (VP4): M4 segmentinin kodladığı bir proteindir. Capping enzim ve guanil transferaz aktivitesi gibi pek çok görevi bulunmaktadır (Le Blois ve ark., 1992).

Viral protein 6 (VP6): Viral replikasyon ve transkripsiyonun enzimatik komponentidir. Segmet 9 tarafından kodlanmaktadır ve yaklaşık 35 Kd ağırlığındadır (Roy,1989b). Helikaz ve NTPase aktivitesi gibi önemli görevleri bulunmaktadır.

Viral protein 7 (VP7): Segment 7 tarafından kodlanan trimer yapıda bir proteindir. Dış kapsidin hemen altında T=13 ikozahedral şeklindedir. Transkripsiyonel olarak aktif virus korunu sarmaktadır. İmmun dominant serogrup spesifik antijendir. Yaklaşık olarak 38 Kd ağırlığındadır. Virusun enfekte hücre içerisinde olgunlaşmasında ve hücreden ayrılmasında görev almaktadır. Nötralizan antikorlarla etkileşerek konakta antiviral bağışıklığın oluşmasında önemli rol oynar. Hidrofobik yapılı olan BTV virusu VP 7'si AHSV-4 virusuyla benzer şekilde tek bir lizin kısmı içerir (Yu ve ark., 1988; Kowalik ve Li, 1991).

Yapısal olmayan proteinler;

En küçük genom segmenti olan Segment 10, NS3 ve NS3a'yı kodlamaktadır. M6 segmenti NS1 yapısal olmayan proteinini kodlamaktadır. Segment 8 ise NS2 proteinini kodlar. NS3 proteini 229 aminoasitten; NS3A proteini ise 216 aminoasitten oluşmuştur. NS1 proteini 552 aminoasitten; NS2 proteini ise 357 aminoasitten oluşmuştur. NS3/NS3a yapısal olarak glikoprotein yapısındadır. Her iki protein de hücre membranında lokalize olmuşlardır. NS2 proteini ise sitoplazmada ve viral inklüzyon cisimciklerinde bulunmaktadır. NS1 proteini, sitoplazmada bulunan ve virusun replikasyonunda önemli aktivitesi olan tubüler yapılarla (mikrotübüller ve intermediate filamentler) yakın ilişkilidir. Yapısal olmayan proteinler virülensin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Sitotoksiktirler ve hücre membranlarında hasar oluşturabilirler (Martin ve ark., 1998; Niekerk ark., 2001). NS2 proteini NS1 ve NS2 enfekte memeli hücrelerinde tespit edilirken, NS3/NS3a insekt hücrelerinde fazla oranda bulunmaktadır (Guirakhoo ve ark., 1995). NS3 ve NS3a proline'den zengin bir amino ucu, iki glikoprotein bölgesi ve iki hidrofobik bölgeden meydana gelmiştir. İki

hidrofobik kısım (HI ve HII) sitotoksiteyi sağlamaktadır. NS3/NS3a proteinleri, progeni virionların hücre lizisi ile salınmasında ve virusun yayılmasında rol oynamaktadır. Konak hücre protein kompleksleriyle (annexin II, p11, Tsg101, MVB) karşılıklı etkileşerek virulensin ortaya çıkmasında etkili olmaktadır (Hyatt ve ark., 1993; Beaton ve ark., 2002). NS2 proteini transkripsiyonda görev alır. Proteolitik enzimlerle birlikte fosforilasyon aşamasında önemli rol oynar.

İmmunolojik olarak pluralite özelliği gösteren etkenin bütün serotipleri komplementi bağlayan ortak antijene sahiptir (Erasmus, 1990).

Virus çevre şartlarına kısmen direnç gösterir (Erasmus, 1990) ve zarsız olmasına rağmen sığır, kobay, insan, tavuk ve kaz eritrositlerini hemaglutine eder (Coakley ve ark., 1980). Virus sitratlı kanda yıllarca aktivitesini korur. Virus ısıya oldukça dayanıklıdır. Enfeksiyözitesini -70°C ve daha düşük ısılarda yıllarca koruyan virus, 20°C ve 4°C de dayanıklı ancak -20°C ve 60°C de hızla inaktif olur. Dondurma-çözünme, ultraviyole, gamma irradyasyona nisbeten direnç gösterir. pH 6,5-8,0 arasında ve eter, kloroform gibi yağ solventlere dayanıklıdır (Erasmus, 1990). Virusun infektivitesi pH 3' de kaybolur. MgCl₂ ve CsCl gibi katyonlar ve 6,5' den düşük pH dış kapsit proteinlerinin uzaklaşmasını sağlar. Purifiye virus, 4°C, pH 8' de 0,1 M tris/HCl içinde muhafaza edildiğinde bir yıl sonra infektivitesinde önemli bir azalma görülmemiştir. Proteolitik enzimlerle sınırlı muamele infektiviteyi artırır. Yüzde 95 lik etanol, fenol ve klor dezenfektan olarak kullanılabilir. Sodyum karbonat, etil alkol ve yüzde 3'lük sodyum hidroksit gibi çok kullanılan antiseptiklere karşı virusun nispeten dirençli olduğu tesbit edilmiştir (Erasmus, 1990).

Virus Kültivasyonu

BTV birçok primer ve devamlı hücre kültüründe üretilabilmektedir. Fakat en hassas hücre kültürünün Baby Hamster Kidney-21 (BHK-21) olduğu bildirilmektedir (Bando, 1975). Virusun üretilmesinde devamlı hücre kültürlerinden African Green Monkey Kidney (Vero) hücre kültürleri de kullanılmaktadır. Virus, Vero hücresi ile karşılaştırıldığında BHK-21 hücresinde daha kısa zamanda ve yüksek titrede

üremektedir. Ayrıca virusun sığır endotel hücresinde de (CPAE) yüksek titrede ürediği bildirilmiştir (Wechsler ve McHolland, 1988). Virus üretilirken ilk inokulasyon embriyolu tavuk yumurtasına (ETY) yapılır ve daha sonra doku kültürlerine adapte edilir (Erasmus, 1990). BTV'nin saha izolatlarının ilk izolasyon çalışmalarında ETY'na intravasküler yolla inokulasyonlar yapılmış olup, izolasyondaki başarının BHK-21 ve Vero hücrelerinde yapılan izolasyon denemelerine oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Goldsmith ve ark., 1975). Virus, ETY'nın yumurta sarısında 30-35°C de üretilmektedir. Embriyolu tavuk yumurtasına intravasküler yolla inokulasyonun sarı kesesine yapılan inokulasyona oranla 1000 kat daha hassas olduğu bildirilmiştir (Goldsmith ve ark., 1975; Clavijo ve ark., 2000). Virusun sürekli yapılan yumurta pasajları, virulensinin düşmesine neden olmaktadır.

BTV duyarlı hücre kültürlerinde sitopatik etki (CPE) oluşturarak ürer. Viral replikasyon sırasında intrastoplazmik (is) ve intranükleer (in) inklüzyon cisimcikleri tespit edilmektedir. Duyarlı hücre kültürlerinde CPE'nin oluşum süreci hücreden hücreye değişiklik göstermektedir. Çoğu hücre kültürlerinde 4 ila 5. günlerde ilk CPE oluşumu gözlenmiştir. Virusun Madin-Darby canine kidney (MDCK), Rainbow Trout Gonad (RTG) ve Gekko Lung (GL) hücrelerinde CPE oluşturmada ürediği bildirilmiştir (Wechsler, McHolland, 1988). BTV, BHK-21, Bighorn Sheep Fetal Tongue (BHFTE), Bovine Turbinate (BT) ve Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) hücrelerinde sayılması zor, çok fazla sayıda plak oluştururken (Wechsler ve McHolland, 1988) Vero ve L929 hücrelerinde sayılabilir nitelikte etrafı sınırlı belirgin plaklar meydana getirmektedir (Howell ve ark.; 1967; Thomas, Samagh, 1979). Deneme hayvanı olarak yeni doğmuş veya olgun farelere yapılan intraserebral enjeksiyonlar başarılı olmaktadır. Ancak yeni doğmuş fare yavrularının daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Inaba, 1975).

1.2. Epidemiyoloji

1.2.1. Bulaşma

BT enfeksiyonu *Culicoides* cinsine bağlı sokucu sinekler ile nakledilir. Yeryüzünde tropik ve subtropik bölgede yaşamları için gerekli olan ekolojik şartlara sahip olan vektörün 1000 den fazla türünün olduğu ancak bunlardan sadece 17'sinin BT enfeksiyonu ile ilgili olduğu ve bunun vektörün genetik karakterine bağlı olabileceği vurgulanmaktadır (Sellers, 1975; Inaba, 1975; Seller ve Pedgley, 1985; Parsonson, 1992; Hassan, 1992; Dik, 1997; Mertens, 1999). Hastalığın naklinde temel rolü oynayan sinek *C. imicola* olarak kabul edilse de, *C. obsoletus* ve *C. pulicaris* gibi diğer türler de duyarlı bireyler arasında virus naklini başarıyla gerçekleştirebilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı serotiplerin belirli *Culicoides* alt türleri tarafından nakledildiği ortaya konulmuştur (Mellor ve Witmann, 2002). Çizelge 1.1' de BTV serotiplerinin naklinde önemli rol oynayan bazı *Culicoides* türlerinin dünyadaki coğrafi dağılımları sunulmuştur.

Çizelge 1.1. : BTV serotiplerinin coğrafi dağılımı ve başlıca *Culicoides* vektör türleri

Coğrafya	BTV serotipleri	Vektör türleri
Afrika	1-16, 18, 19, 24	<i>C. imicola</i> , <i>C. bolitinos</i>
Asya	1-4, 7, 9, 10, 12,16, 17, 20, 21, 23	<i>C.imicola</i> , <i>C. schultze</i> grp., <i>C. fulvus</i> , <i>C. actoni</i> , <i>C. actoni</i> , <i>C. brevitarsis</i> , <i>C. orientalis</i>
Avustralya	1, 3, 9, 15, 16, 20, 21, 23	<i>C. fulvus</i> , <i>C. wadai</i> , <i>C. actoni</i> , <i>C. brevitarsis</i>
Avrupa	4, 10	<i>C. imicola</i> sensu stricto, <i>C. obsoletus</i> , <i>C. pulicaris</i>
K. Amerika	2, 10, 11, 13, 17	<i>C. sonorensis</i> ; <i>C. Insignis</i> , <i>C. variipennis</i>
G. ve O. Amerika, Karayipler	1, 3, 4, 6, 8, 12, 17	<i>C. insignis</i>

Türkiye’de Culicoides’ler üzerine yapılan çalışmalarda (Dik, 1989; Dik, 1993; Yılmaz, 1994; Dik, 1995; Mellor ve ark., 1995) 57 farklı tür saptanmıştır. Yine bu çalışmalarda BT virusunun naklinde önemli rol taşıdığı bildirilen *C. imicola* ve *C. obsoletus*’un varlığı (Dik, 1989; Dik, 1993; Yılmaz, 1994; Dik, 1995; Dik, 1997) ve muhtemelen Türkiye’de *C.imicola*’nın BT enfeksiyonunun ana vektörü olduğu bildirilmiştir (Mellor ve ark., 1995). Hastalığın dominant vektörü olan *C.imicola*’nın daha çok güney ve batı Anadolu bölgelerinde olduğu, Trakya’da ise bu sokucu sineğe sadece Gelibolu yarımadasında rastlandığı saptanmıştır (Tufan, 2006). Trakya’nın Gelibolu dışında kalan bölgelerinde ise en sıklıkla tespit edilen tür *C.obsoletus* olarak bildirilmiştir.

Culicoides’ler ekto parazit olmaları yanında, insan ve hayvanlarda enfeksiyon etkenlerinin naklinde rol oynamaları ile önem taşımaktadırlar. Ceratopogonidae ailesi içerisinde sınıflandırılan Culicoides cinsinde yer alan bazı türler protozoal, viral etkenlerin ve bazı helmintlerin naklinde biyolojik faktör olarak rol almaları yönünden önem kazanmaktadır (Dik, 1997). Culicoides’lerin hayvanlarda büyük ekonomik kayıplara neden olan viral enfeksiyonlardan BT, Akabane (AKA) ve Ibaraki (IBA)’nın etkenlerinin yanısıra at vebası, oropouche, epizootic heamorrhagic disease (EHD), equine encephalosis, aino, ephemeral fever (EF) ve palyam viruslarının biyolojik, fowlpox virusunun mekanik vektörü oldukları bildirilmektedir (Mellor, 2000).

Culicoides’lerin erkekleri bitki nektarlarıyla beslenirken, dişiler ise insan ve hayvanlardan kan emerler. Bunun yumurtaların gelişimi için gerekli olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle hastalığın naklinde dişiler rol oynamaktadırlar. Isı, ışık ve nem gibi faktörlerin yanısıra olgunların uçuş aktivitelerinin üzerinde rüzgâr ve yağmur da etkilidir (Dik, 1997). Culicoides’lerin varlığı iklime bağlıdır. Dolayısıyla özellikle Culicoides’lerin biyolojik vektör olduğu enfeksiyonlar vektörün yaşam siklusunu sürdürebileceği iklimik zonda görülmektedir. Yapılan araştırmalar Culicoides’lerin 18-29°C arasında aktif, ancak 10°C altı ve 30°C nin üzerinde inaktif olmalarına rağmen 0°C de iki saat kadar yaşamlarını sürdürebildiğini göstermiştir (Mertens, 1999). Olgun Culicoides’lerin yaşam süreleri yaklaşık 2 ay kadardır ve bu süre içinde 2-3 nesil verirler. Yumurtalarının gelişimleri için ısı ve nem önemli olup, kuru ortamda

canlılıklarını devam ettiremezler (Dik, 1997). Vertikal bulaşma olmamasına rağmen, viral RNA'nın olgunlaşmamış vektörlerden izole edilebildiği bildirilmiştir (White ve ark., 2005).

Viremik bir hayvandan beslenen vektörün kanla birlikte aldığı virus insektin mide boşluğuna gelir. İnsektin mide epitellerinde replike olan ve en yüksek titreye ulaşan virus haemocoel'e geçer. Daha sonra ya diğer organlarda ikinci bir replikasyon geçirir ve sonra insektin tükürük bezlerine geçer ya da direkt olarak tükürük bezine geçerek replike olur. Beslenme sırasında sağlıklı konakçıyı tükürük salgısı içinde bulunan virus ile enfekte eder. Kısa bir yaşam süresine sahip olan vektör bu süre boyunca enfektedir ve enfeksiyonun naklinde rol oynar (Mellor, 2000).

BT enfeksiyonunun epidemiyolojisinde rezervuar-vektör-iklim üçlü faktörü önemlidir. Hastalığının yayılışı vektörlere bağlı olduğundan, BT en çok, böcek popülasyonunun maksimum seviyeye eriştiği sıcak yaz aylarında ve genellikle yağışlı mevsimlerde görülür. Özellikle sonbahar sonlarında, soğuk ve nemli havanın etkisi ile BT' nin epizootik formu gelişir ve %80-90 morbiditeyi takiben %50-80 oranında mortalite gerçekleşir (Erasmus, 1990). Afrika'da BT salgınları genelde yağışlı mevsimde görülmesine rağmen, kurak dönemde de BT salgınlarına rastlanmıştır (Erasmus, 1975a; Hourrigan ve Klingsporn, 1975a). Işığın fazla veya az olduğu zaman dilimlerinde Culicoides' lerin uçuş aktivitesinde azalma olur. Rüzgarın şiddeti arttıkça uçuş aktivitesi düşer, ancak rüzgarın etkisi ile çok uzak mesafelere taşınan enfekte vektörler taşındıkları bölgelerde yeni enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu şekilde bir bölgeden diğerine hatta bir ülkeden başka bir ülkeye enfeksiyonun naklinin mümkün olduğu bildirilmektedir. Bundan başka, kontrolsüz enfekte hayvan hareketlerinin hastalığın görülmediği ülke veya bölgelere enfeksiyonun girişine neden olduğu bildirilmektedir (Sellers ve Pedgley, 1985).

Hastalık kontakt yolla bulaşmamaktadır. Boğalarda ender olarak viremi döneminde virus sperma ile nakledilebilmektedir. Culicoides' lerin yanında kenelerin de hastalığı bulaştırdığı bildirilmiştir. Virus, plasentayla da bulaşabilmektedir (Erasmus, 1990; Parsonson, 1990; Hourrigan ve Klingsporn, 1975b).

BTV ile ilk kez karşılaşan sürülerde enfeksiyonun yayılımı daha hızlıdır. Ekzotik bölgelerde enfeksiyon akut seyrederken, endemik bölgelerde subklinik seyir göstermektedir (Bowne, 1973).

1.2.2. Konakçı Duyarlılığı

Enfeksiyon spektrumunda sığır, koyun, keçi, deve, fil, antilop, bufalo, Kuzey Amerika Elk'i, ceylan ve beyaz kuyruklu geyik gibi evcil ve yabani ruminantlar bulunmaktadır. Bunların ayrıca virus rezervuarı oldukları da bildirilmiştir (Hourrigan, Klingsporn, 1975b; Hoff ve Hoff, 1976; Bender ve ark., 2003). Bazı karnivor türleri ile (Alexander ve ark., 1994) rodentlerde oluşturulan deneysel BT enfeksiyonu ile bu hayvanların da duyarlı olduğu gösterilmiştir (Cabasso ve ark., 1955; Venter ve ark., 1993). BT enfeksiyonuna karşı evcil gevişgetiren memeli hayvanlar arasında en duyarlı türler koyunlardır. Sürülerde %2-45,6 arasında bir mortalite gözlenir (Erasmus,1990; Parsonson, 1992). Seronegatif sürülerde bu oran daha yüksek olabilmektedir (Hourrigan ve Klingsporn, 1975a). Dünyadaki tüm koyun ırkları BT hastalığına duyarlılık gösterir. Bununla birlikte ırklara göre klinik belirtiler büyük farklılıklar oluşturabilmektedir. Merinos ırkı koyunlar hastalığa en duyarlı ırklardır. Diğer önemli faktör ise koyunun homolog veya antijenik yakınlık gösteren bir etkenle daha önce karşılaşıp karşılaşmadığıdır (Sellers, 1983; Erasmus, 1990).

Koyunlarda yaklaşık 30 gün (Goldsmith ve ark., 1975) süren vireminin sığırlarda 100 gün (Luedke ve ark., 1977) kadar sürmesi rezervuar olarak sığırları ön plana çıkartmaktadır. Sığırlardaki vireminin uzun olmasının hem enfeksiyonun nakli hem de vektörün aktif olmadığı kış aylarında etkenin bir sonraki sezona aktarılmasında önemli rol oynadığı belirtilmektedir (Goldsmith ve ark., 1975; Luedke ve ark.,1977). BTV, at ve domuzlarda enfeksiyon oluşturmamaktadır. Koyunlar sığır ve keçilere göre hastalığa karşı daha duyarlı olup, sığır ve keçilerde herhangi bir klinik bulgu tespit edilmemesine karşın, koyunlarda enfeksiyona bağlı klinik bulgu ve ölümler bildirilmiştir. Bu durumun her konakçı türüne ait mikrovasküler endotel hücrelerinin BT enfeksiyonuna karşı göstermiş oldukları spesifik yanıtta farklılıklardan ileri geldiği düşünülmektedir (DeMaula ve ark., 2002).

Koyunlardan farklı olarak sığırlarda klinik enfeksiyonun ortaya çıkmasındaki en önemli nedenin daha önceden vücuda girmiş olan BTV veya ilgili virusların neden olduğu IgE' lere bağlı hipersensitivite olduğu bildirilmektedir. Bu sığırlarda BT ile ilgili semptom ve lezyonların ortaya çıkması BTV spesifik serum IgE antikorlarının ani artışı ile paralellik göstermektedir. Bu durum histamin, prostaglandinler ve tromboxane A₂ gibi endojen mediyatörlerin salınımı ile ilişkilidir (Emau ve ark., 1984). Luedke ve ark. (1967), sığır ile koyunlar arasında virusun aynı vektörle (*C. variipennis*) nakledildiğini deneysel enfeksiyonlarda bildirmiştir. BTV hem doğal yaşam ortamında hem de deneysel olarak yabani hayvanlarda enfeksiyon oluşturmaktadır. Develerde BTV antikorlarının varlığı saptanmıştır (Chauhan ve ark.,2004). Yabani hayvanlardan antilop, geyik, yabani koyun ve keçilerde doğal BT enfeksiyonlarına rastlanmaktadır. Bu hayvan türlerinde şiddetli enfeksiyon oluşur ve %80-90 arasında değişen bir mortalite gözlenmektedir (Robinson ve ark., 1967; Stott ve ark.,1982; Dulac ve ark., 1988; Nettles ve ark., 1992). Beyaz kuyruklu geyiklerde (Vosdingh ve ark., 1968) ve siyah kuyruklu geyiklerde (Work ve ark., 1992) oluşturulan deneysel BTV enfeksiyonlarında bu hayvanların enfeksiyona duyarlı olduğu gösterilmiştir.

1.2.3. Enfeksiyonun Coğrafi Dağılımı

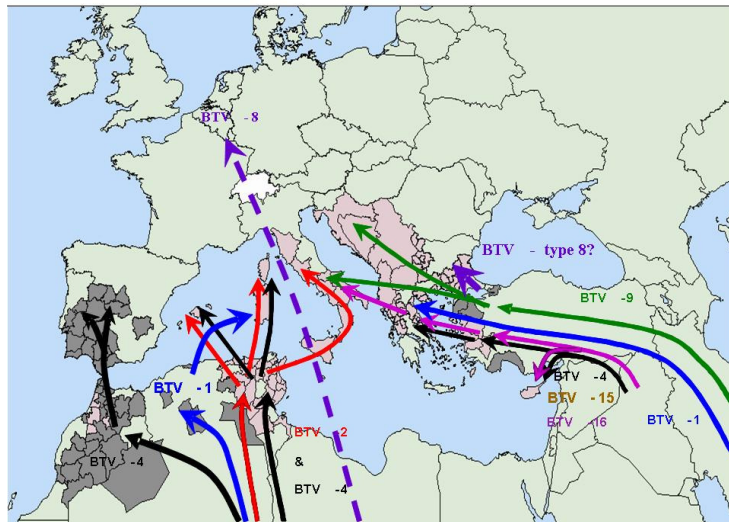
Çiftlik hayvanlarının önemli bir enfeksiyonu olan BT, Amerika (Hourrigan ve Klingsporn, 1975a), Afrika (Anon., 2004d; Parsonson, 1992), Güney Asya, Kuzey Avustralya (Erasmus, 1990) ve özellikle Güney Avrupa'da yaygındır (Anon., 2004b; Anon., 2004c; Breard ve ark 2004). Hastalık son olarak Avrupa kıtasının daha önce hiç etkilenmemiş kuzey bölgelerinde görülmüştür (Anon., 2004a; Mellor ve Witmann, 2002). Kuzeydoğu Amerika ve Kanada BT enfeksiyonundan aridir. Daha ılıman bir iklime sahip olan Arjantin, Brezilya ve Şili gibi Güney Amerika' nın bazı ülkelerinde görülen BTV salgınlarında BTV-12 izolasyonu yapılmıştır (Clavijo ve ark., 2002).

BT enfeksiyonu vektör biyolojisi için uygun iklimatik zon olan, Amerika kıtasında 30° güney, 50° kuzey enlemleri, dünyanın diğer kıtalarında ise 35° güney, 40° kuzey enlemleri arasındaki ılıman iklimli ülkelerde görülmektedir (Mellor ve Wittmann, 2002). Asya kıtasında bulunan Türkiye 35° güney, 42° kuzey enlemleri arasında yer almaktadır. Sadece Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinin bir kısmı bu alanın dışında

kalmaktadır. Bu kuşakta yer alan birçok ülkede sıklıkla enfeksiyon tekrarlanmış ve ciddi ekonomik kayıplara neden olduğu belirtilmiştir (Mellor ve Wittmann, 2002).

BTV'nin değişik coğrafyalardan tespit edilen izolatlarına yapılan sekans analizlerinde virusun 2 farklı genetik hattı belirlenmiştir. Doğu hattı, Avustralya ile birlikte Hindistan gibi orta ve uzak doğu ülkelerinden izole edilen virusları içerir. Batı hattı ise Afrika ve Amerika kıtalarında bulunan virusları içerir. Avrupa'da çıkan BTV salgınlarında doğu ve batı hattında bulunan viruslar izole edilmiştir (Maan ve ark., 2004).

BTV'nin mevcut izolatlarına yapılan sekans analizleri sonucunda, 6 serotipin (BTV-1, 2, 4, 8, 9 ve 16) dört farklı yolla Avrupa'ya girdiği ve 1998 yılından beri salgınlara neden olduğu ortaya konulmuştur. Birinci yol, Orta Asya'dan orijin almaktadır; Türkiye'nin doğusunu ve Kıbrıs'ı geçerek Balkanlar üzerinden Avrupa'nın iç kesimlerine doğru uzanmaktadır. İkinci yol, Kuzey Afrika'dan (Tunus ve Cezayir) başlayarak İtalya ve doğu Akdeniz adalarına ulaşmaktadır. Üçüncü yol ise Fas orjinlidir ve İspanya'nın güney bölgeleri ile Portekiz'e kadar devam etmektedir. Avrupa'nın kuzey bölgelerine ulaşan dördüncü yol hakkında kesin bir bilgi bulunmamakla beraber Güney Afrika orijinli olduğu düşünülmektedir. İsrail'de 2006 yılında identifiye edilen BTV-15'in gelecek yıllarda Avrupa'da hastalıklara yol açabileceği düşünülmektedir (Şekil 1.2) (Mertens, 2007).



Şekil 1.2: BTV serotiplerinin Avrupa kıtasına erişim yolları (Saegerman ve ark., 2008).

BTV' nin farklı sahalardan tespit edilen izolatlarının 2 nolu RNA segmentine ait nükleik asit dizi analizleri ortaya konulmuş ve filogenetik yakınlığın izolatların coğrafik orijinleri ve kendilerini nakleden Culicoides türleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Viruslar, Afrika/Avrupa, Asya/Avustralya, Amerika/Karayip adaları ve Kuzey Amerika olmak üzere dört grupta toplanmıştır. Yapılan bölgesel gruplandırma, belli bir bölgede daha önce hastalığı taşımayan farklı Culicoides türlerinin ortaya çıkmasıyla doğrudan ilişkilidir (Balasurya ve ark., 2003). Son yıllarda yapılan çalışmalar sonrasında ortaya atılan hipotez, belirli serotiplerin belirli Culicoides alt türleri tarafından nakledildiğidir. (Mellor ve Witmann, 2002).

Türkiye'de varlığı 1944 yılından beri bilinen bu enfeksiyonla ilgili olarak yakın zamanda yapılan çalışmalarda, Ege Bölgesi ve Trakya'da BTV izolasyonu yapılmıştır. Trakya Bölgesinde 1999 yılında sahadan BTV izolasyonu gerçekleştirilmiş ve BTV-9 olarak tanımlanmıştır. Mellor ve Witmann (2002), BTV' nin 1998 yılından beri Güney ve Batı Anadolu'da aktif olduğunu, 2000 yılındaki salgında BTV-16 izolasyonu ve tanımlanmasının yapıldığını bildirmektedir. Türkiye'de halen BTV'nin tip 2, 4, 9 ve 16 olmak üzere 4 farklı serotipinin varlığı bildirilmektedir (Ertürk, 1994; Mellor ve Witmann, 2002). Enfeksiyonun Türkiye'deki varlığının yanında, özellikle son 3 yıldır gerek Balkanlar (Anon., 1999; Anon., 2004a) ve gerekse Kuzey Afrika orijin kabul edilmek suretiyle İspanya, Fransa ve İtalya (Anon., 2004b; Anon., 2004c) üzerinden Avrupa kıtasının iç kısımlarına doğru tehditkar ilerleyişi gözlenmektedir (Mellor ve Witmann, 2002).

Gürtürk ve ark. (1980) Aydın bölgesinden topladıkları 21 adet sığır kan serumundan 19 adedinde, Türkiye'de ilk defa BTV'ye karşı nötralizan antikor saptamışlardır. Türkiye'de BT enfeksiyonu ile ilgili olarak yapılan birçok çalışmada (Bolat, 1986; Hazıroğlu, 1987; Girgin ve Yoncu, 1988; Öztürk ve ark., 1990; Burgu ve ark., 1992; Ertürk, 1994; Mellor ve ark., 1995; Özgünlük, 2003; Yıldırım, 2003) sığır, koyun ve keçi populasyonlarında enfeksiyonun yaygın olarak bulunduğu ortaya konulmuş olup; bu çalışmalarda Türkiye' nin değişik bölgelerinde BTV-4 seroprevalansı koyunlarda %0-100, keçilerde %2,8-50 ve sığırlarda da %0-75,21 oranları arasında bildirilmiştir.

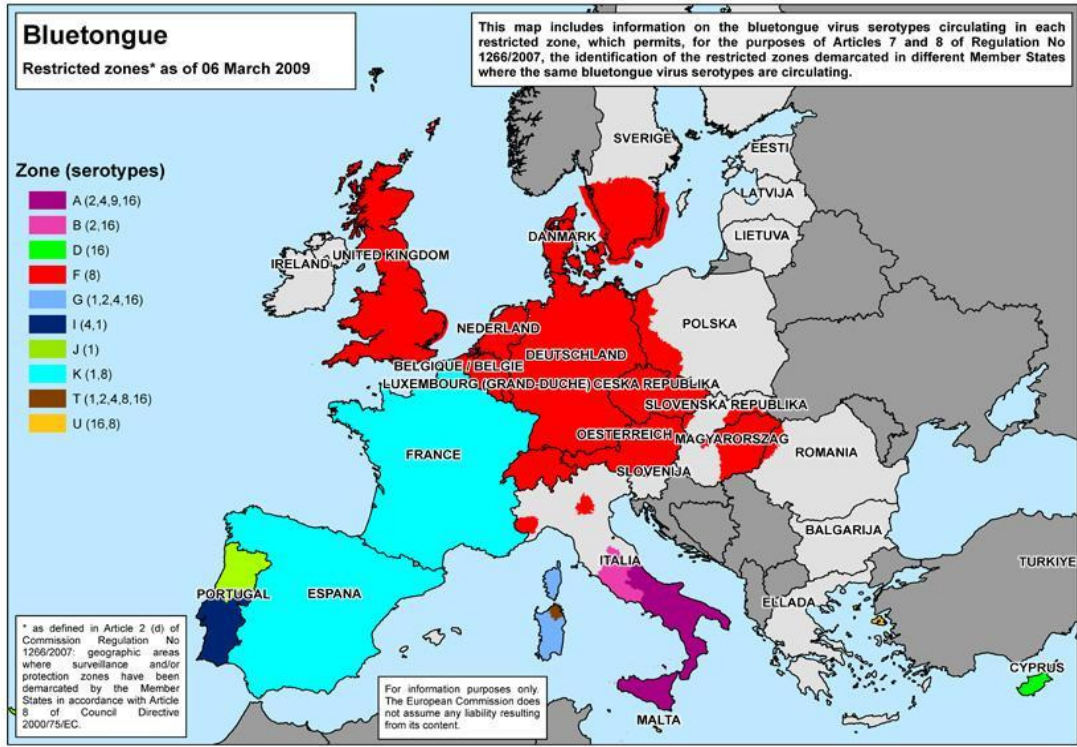
Karaoğlu ve ark. (2003) Trakya bölgesinde 5 ile bağlı 21 ilçe/köyden örneklenen 557 adet sığır serumunda BTV enfeksiyonunun seroprevalansını % 94.8- 97.5 olarak tespit etmiştir.

Bulut ve ark. (2006) Konya bölgesinden 562 adet koyun ve keçi kan serumu örneği toplamışlardır. Yapılan ELİSA testi sonucunda koyun ve keçilerde BT seropozitifliği sırasıyla %14.4 ve %60; SN testi ile de sırasıyla %13.9 ve %53.5 oranında bulmuşlardır.

Gür (2008) 82 adet kursaklı ceylan (*Gazella subgutturosa subgutturosa*), 684 adet koyun ve 100 adet sığır kan serumunda yaptığı competitive ELISA testi sonucunda kursaklı ceylan, koyun ve sığırlarda BT seropozitiflik oranları sırasıyla %40.2, %29.5 ve %88 olarak bulmuştur.

Yıllar bazında yapılan serolojik kontrollerde ise en belirgin bulgu, BTV-4'e karşı yapılan aşılamalara rağmen koyunlarda yeterli düzeyde bağışıklık oluşmadığı ve sığırlarda da önemli oranda serokonversiyon olduğu gözlenmiştir. Daha önce gerek Ege ve gerekse Trakya'da yapılan izolasyonlara paralel olarak yıllar bazında değişken BTV-9 ve BTV-16 serokonversiyonları tespit edilmiştir.

BTV enfeksiyonu Avustralya' nın kuzey ve doğusu, Güney ve orta Amerika ve Karayip Adalarında endemik seyretmektedir. Bu bölgelerdeki seropozitif sığır ve koyunların büyük çoğunluğu virusla enfekte değildir (MacLachlan ve Pearson, 2004).



Şekil 1.3. : 2009 Mart ayı itibariyle BTV serotiplerinin AB topluluğu üye ülkelerinde dağılımı

(http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/bluetongue_restrictedzones)

1.3. Patogenez

BTV diğer orbiviruslar gibi lenfotropik ve epiteliyotropik karakterdedir. Bu nedenle en şiddetli lezyonlar lenfoid ve epitel dokudan zengin organ sistemlerinde görülür. BTV'nin hemotopoetik, retikuloendotelial dokulara ve özellikle endotelial hücelere özel bir affinitesi vardır (Murphy ve ark., 1999). Özellikle bazı organ ve küçük kan damarları ile bunların dallarına affinite gösterir. Bu affinitenin sebebi tam olarak anlaşılamamakla birlikte, endotel hüceleri arasındaki fark ve virusun spesifitesine bağlanmaktadır (Erasmus, 1990).

Hasta hayvanlarda sikluslu bir enfeksiyon tablosu oluşur. Koyunlarda doğal enfeksiyon neticesinde, BTV'nin primer replikasyon yeri lokal lenf nodülleridir. Viremi 4-6 gün sürer. Etken viremiyi takiben diğer lenf nodüllerinde ve lenforetiküler dokularda olduğu kadar küçük kapillar ve arterler ile venüllerin endotelium, periendotelium ve perisitlerinde hızlı bir şekilde replike olur. Bu dönemde ateş ve

lenfopeni ortaya çıkar. Endotelyumda nekroz gelişir ve dokudaki rejeneratif reaksiyon ile hiperplazi ve atrofi şekillenir. Bu da damar tıkanması, sıvı akışının durması ve eksudasyona yol açar. Böylece beslenemeyen yüzeydeki dokularda oluşan hipoksiye bağlı olarak özellikle en dıştaki epitel katmanında şiddetli lezyonlar gelişir (Pini, 1976; Mahrt ve Osburn, 1986; Girgin ve Yonguç, 1988; Erasmus, 1990; Mertens, 1999; Murphy ve ark.,1999). Beyaz kuyruklu geyiklerde deneysel olarak oluşturulan enfeksiyonlarda da benzer bulgular gözlenmiştir (Karstad ve ark., 1961; Karstad ve Trainer, 1967; Vosdingh ve ark., 1968; Howerth ve ark., 1989).

Sığır ve koyunlarda deneysel enfeksiyonlar oluşturularak, her iki türün endotel hücrelerinde virusa karşı birbirinden farklı hücresel yanıtın şekillendiği tespit edilmiştir. Bu durumun koyunlardan farklı olarak sığırlarda hastalığın subklinik görülmesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Sığırlarda koyunlardan farklı olarak endotel hücrelerinin BTV ile enfeksiyonu, maksimal endotelial hücre aktivasyonu ile sonuçlanmıştır. Çeşitli vazoaktif ve inflamatuvar mediatörleri kodlayan genlerin transkripsiyonunda ve hücre yüzeyi adhezyon moleküllerinin ekspresyonunda artış şekillenmiştir. Koyunlarda ise enfekte endotel hücrelerinde minimal aktivasyon ve hücre ölümleri gözlenmiştir. Bundan başka, enfekte koyunlarda koagülasyon değeri (prostosiklin /tromboksan oranı) sığırlara oranla çok yüksektir (Barratt ve MacLachlan, 1995; Russell ve ark., 1996; DeMaula ve ark., 2002).

BTV, hastalığın vektörü olan *Culicoides* cinsine bağlı sokucu sineklerde persiste kalmaktadır. Ruminantlarda ise uzun bir viremi dönemi geçirmesine rağmen persiste kaldığına dair kesin bir kanıt yoktur (MacLachlan, 1994; Barratt ve MacLachlan, 1995; Singer ve ark., 2001; Bonneau ve ark., 2002). BTV, vireminin ilk dönemlerinde tüm kan hücrelerinde bulunmaktadır. Virusun titresi, özellikle eritrosit ve trombositlerde lökositlere oranla daha yüksektir. Bu durum, kanda eritrosit ve trombositlerin daha fazla sayıda bulunmalarıyla ilişkilidir. Trombositlerin kısa yaşam sürelerinin olmasından dolayı vireminin ilerleyen dönemlerinde virus sadece eritrositlerde bulunmaktadır. Virus, eritrositlerin yaşam süreleri boyunca eritrositlerde replike olmadan kalmaktadır. Böylelikle, eritrositlerin BTV ile enfeksiyonu, viremi döneminin uzun sürmesine olanak sağlamaktadır (Brewer ve MacLachlan, 1992, 1994). Enfekte koyun ve sığır kanlarında

BTV nükleik asidi, PZR ile 8 ay gibi uzun bir dönem içerisinde tespit edilebilmesine rağmen hücre kültürlerinden virus izolasyonu ile BTV nükleik asidinin tespiti daha kısa bir dönem içerisinde yapılabilmektedir. Sığır ve koyun kanlarında PZR ile BTV nükleik asidi tespitinin, eritrositlerin yaşam süreleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Tabachnick ve ark., 1996; Bonneau ve ark.,2002; MacLachlan, 2004). Yapılan deneysel çalışmalarda, PZR ile BTV nükleik asidinin tespit edildiği ancak virus izolasyonunun yapılamadığı ruminant kanı, vektöre thorax içi inokule edildiğinde enfeksiyonun şekillenmediği gözlemlenmiştir (MacLachlan, 1994; MacLachlan ve ark., 1994; Tabachnick ve ark., 1996; Bonneau ve ark., 2002). Benzer şekilde kan, ruminantlarda da enfeksiyon oluşturmamaktadır (MacLachlan ve ark., 1989; 1994). Gamma delta T hücrelerini içeren koyun ve sığır lenfosit hücre kültürleri BTV ile persiste enfekte olabilirler (Stott ve ark., 1990; 1992; Takamatsu ve ark., 2003). CPE görülmeyen bu persiste enfeksiyon, konak hücrenin lizisi ile sonuçlanmasa da virus partikülleri hücre zarından tomurcuklanma ile hücreyi terk edebilmektedir. BTV dış kapsit proteinleri olan VP2 ve VP5, bu zarf tarafından maskelenirler ve membran zarflı virus partiküllerinin antikorlar tarafından nötralize edilmesine kısmen engel olurlar.

BTV, vektörlerin bulunmadığı kış mevsiminde konakçıda 9-12 aya kadar canlı kalabilmektedir. Bu dönem içerisinde konakçı türlerinde viremi tespit edilmemiştir. Hastalığa ait klinik bulgu ve serokonversiyon yoktur. BTV' nin kış mevsimini konakçıda canlı olarak geçirebilmesinin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Ancak BTV'nin kış mevsimi boyunca konakçı gamma delta T hücrelerinde persiste enfekte kalabildiği bildirilmektedir (Stott ve ark., 1990, 1992; Takamatsu ve ark., 2003). Gamma delta T hücrelerinin enfeksiyonu konakçıda antikor üretiminden önce oluşmaktadır. Viremiden birkaç hafta sonra gamma delta T hücreleri tespit edilemezler. Antikor pozitif, antijenin negatif olduğu bu durumlarda hayvanlar saçıcı ya da enfekte olarak kabul edilmezler.

Culicoides türü sokucu sineklerin kan emmesi sonucunda konakçıda deri yangısı şekillenmektedir. Yangısal alana BTV ile persiste enfekte gamma delta T hücreleri göç ederek burada aktive olurlar. Bu hücrelerin yüzeyindeki WC-1 ligandı ile deri fibroblast hücrelerinin yüzeyindeki WC-1 ligandları arasında oluşan etkileşimler sonucunda

persistan enfeksiyonun litik enfeksiyona dönüşümü şekillenmektedir. BTV replikasyonu ve yangısal proteazların salınımı artmaktadır. Yangısal proteazlar virus dış kapsit proteini VP2'nin ayrılmasına neden olabilmektedirler. Yangısal proteazların etkileşimleri sonucu insekt hücrelerine BTV den 100 kez daha enfektif olan subviral partiküller şekillenmektedir. Sonuç olarak, sineklerin beslendiği deri yüzeylerinde virus saçılımıyla enfeksiyon meydana gelmektedir. Kış sezonunu atlatan konakçıdan yeni jenerasyon Culicoides'lerin beslenmesinin sonucunda, ısırık bölgesindeki yangısal alana enfekte gamma delta T hücreleri yeniden göç eder ve bunun sonucunda BT enfeksiyonu yeniden aktif hale gelir (Stott ve ark., 1990, 1992; Takamatsu ve ark., 1997, 2003).

BTV kolaylıkla plasentaya geçer ve fötusta intrauterin enfeksiyonlara neden olur. Koyunlarda gebeliğin 5-6. haftalarında alınan enfeksiyon hidranensefaliyle sonuçlanır. Buzağılarda gingiva hipertrofisi, makroglossi, maksillada anormal gelişim, yetersiz vücut gelişimi ve distal ekstremitelerde rotasyon ve bükülmeler ile karakterize konjenital malformasyonlar görülür. BT virusu ile intrauterin enfekte edilen sığırlardan doğan buzağılarda poreensefali, hidranensefali ve artrogripozis tanımlanmıştır (Osburn ve ark., 1971; MacLachlan ve Osburn, 1983; Fenner ve ark., 1987; Erasmus, 1990).

1.4. Klinik Semptomlar

BT enfeksiyonu hayvanın türü, ırkı, yaşı, beslenme ve immün durumu, alınan virüsün virulensi ve miktarı, virüsün suşu ve yüksek sıcaklık, UV gibi çevresel koşullara bağlı olarak değişken bir enfeksiyon tablosu göstermektedir. Deneysel çalışmalar sonucunda enfeksiyonun inkubasyon periyodu 2-15 gün olarak belirlenmiştir. Doğal enfeksiyonlarda ise 7 gündür. Beden ısı 42°C ye kadar yükselmekte ve yüksek ateş çoğunlukla 6 gün sürmektedir (Erasmus, 1975a; Tanya ve Gibbs, 1991).

Doğal enfeksiyonlarda beden ısısında artışı takiben 1-2 gün içerisinde merme ve dudak derisi ile ağız mukozası hiperemik bir duruma gelir. Dudak, yüz ve kulaklarda ödemler oluşur. Mermede, ağız içi mukozada ve gözde peteşiyel kanamalar görülebilir. Merme, burun delikleri, dil, yanak ve ağızda erozyonlar meydana gelir (Sellers, 1983). Ağrıdan dolayı dudaklarda şapırdatma ve dilin oynatılması sonucunda ağızda köpürmeler görülür. Hasta koyunlar yem almada güçlük çekerler (Erasmus, 1990).

Hastalık geliştikçe hayvan durgunlaşır, ruminasyon durur; zamanının çoğunu yere uzanmakla geçirir ve kondusyonda bir bozulma görölür.

Dilde başlangıçta peteşiyel kanamalar ile birlikte yaygın bir hiperemi oluşur. Daha sonra dil ödematöz bir hal alır ve ağızdan sarkar. Yaygın olmamasına rağmen dil siyanotik görölür ve hastalığa ismini veren 'Mavidil' görüntüsüne neden olur (Sellers, 1983).

Burunda önce mukoz daha sonra mukopulent bir akıntı vardır. Bu akıntı kurur, kabuk formuna dönüşüp şiddetli dispneye sebep olur (Erasmus, 1975a; Tanya ve Gibbs, 1991). Perakut vakalarda alveolar ödem sonucunda solunum güçlüğü meydana gelir. Morbidite % 100, mortalite ise % 90 kadardır (Sellers, 1983).

BT hastalığı sırasında çoğunlukla ayakta da lezyonlar oluşur. Koroner bölgede ağrı ile birlikte hiperemi ve peteşiyel kanamaları takiben düzensiz mavi veya kırmızı renkte çizgiler gözlenir. Ağrıdan dolayı hayvanlar yürümekte güçlük çekerler (Sellers, 1983). Arka ayaklarda lezyonlar daha sık görölür. Enfeksiyonu izleyen 7-14. günlerde tırnak canlı dokudan ayrılmaya başlar ve enfeksiyondan 3-4 ay sonra eski tırnak bütünüyle ayrılarak yerini yenisi alır. Sistemik hastalık tablosuna ek olarak gebe koyunlarda BT enfeksiyonu abortusa yol açar. Özellikle gebeliğin erken dönemlerinde alınan enfeksiyon fötüs için tehlike oluşturur ve hidranensefaliyle sonuçlanır (Erasmus, 1990).

Sığırlar BT enfeksiyonuna en az koyunlar kadar duyarlıdır. Sığırlarda klinik olarak topallık, yüksek ateş, süt veriminde ani düşüş, gözyaşı akıntısı, korneada kızarıklık, deride kuruluk, kabuklanma ve dökölme, kılların dökölmesi, meme başlarında kızarıklık ve kabuklanma, ağızda ağrılı yaralar, ülserler ve dilde şişme ile seyreder. Mortalite %1 oranındadır. Klinik enfeksiyonun yanısıra BT enfeksiyonu sığırlarda sıklıkla subklinik enfeksiyona neden olur. Fakat enfekte sığırlarda etken özellikle dişi ve erkeklerin üreme organlarına yerleşerek döl veriminde azalmaya, abort ve kongenital anomalili (AH sendromlu-arthrogryposis hydrancephaly) buzağı doğumları sonucunda önemli ekonomik kayıplara neden olur (Metcalf ve ark., 1980; Thomas ve ark., 1986; Erasmus, 1990; MacLachlan ve ark., 1992).

1.5. Nekropsi Bulguları

BTV enfeksiyonundan ölen hayvanlarda karkas genellikle çok zayıftır ve peteşiyel, ekimotik kanamalarla maskelenen solgun dejenerasyon alanları şekillenir. Lenf yumruları, özellikle mezenteriyel ve mediastinal lenf yumruları yumuşamış ve şiş görünümündedir. Göz kapakları ve konjunktivada hiperemi ve ödem vardır. Göz ve burunda kurumuş akıntılar mevcuttur. İskelet kaslarında nekrozlar görülür. Sindirim sisteminde, ağız boşluğu, özefagus, rumen, retikulum ve abomazum mukozalarında hiperemi, hemoraji, erozyon ve ülserler görülebilir. Rumen papilları arasında erozyon ve abomazum mukozasında kalınlaşma olabilir. İnce bağırsak mukozası konjesyonlu olup kanamalar şekillenebilir. Peteşiyel kanamalara safra kesesi mukozasında da rastlanır. Böbrekler konjesyonludur, idrar kesesi, uretra, vulva ya da prepusyumda peteşiyel kanamalar görülebilir. Kalpte sol ventrikulus'un papillar kısmında ve myokardın çeşitli bölgelerinde nekrozlar görülür. Ancak bu nekroz kas yığınlarının çok derin kısımlarında bulunduğundan görmek için kasları dikine kesmek gerekir. Arteria pulmonalis' in başlangıç kısmında media tabakasında fokal kanamalar ya da peteşiler ile karakterize patolojik lezyonlar bulunmaktadır. Benzeri kanamalara aortanın başlangıcında, subendokardial ve subepitelial bölgelerde de rastlanır. Perikardiyal kesede sıvı toplanmıştır. Solunum sisteminde, farinks ve larinkste ödem ve gözle görülebilen peteşiyel ya da ekimotik kanamalar vardır. Bu bölgelerde görülen myodejenerasyonlar disfaji ve regurgitasyona neden olur ve sonuçta aspirasyon pneumonisi şekillenebilir. Akut olgularda akciğerlerde interlobüler septal ödem, trachea ve bronşlar içinde köpüğe rastlanır (Spreull, 1905; Moulton, 1961; Erasmus, 1975a; Pini, 1976; Gard, 1984; Mahrt ve Osburn, 1986; Erasmus, 1990; Parsonson, 1990; MacLachlan ve ark., 1994).

1.6. Histopatolojik Bulgular

Virusun endotel hücrelerinde oluşturduğu yıkım sonucu lokal mikrovasküler trombozlar ve permeabilitede artış şekillenir. Endotel hücrelerinde şişme, küçük damarlarda fibrin ve trombosit trombüsleri ve çevre dokularda ödem ile kanama vardır. BTV kutan mukoza ve deride proprial ve dermal papilla kapillarlarında, eozinofilik intranükleer ve intrastoplazmik inklüzyon cisimcikleri ile karakterize epitelyal nekroza neden olur. Epitel tabakasında vakuolleşme şekillenir. Replikasyon esnasında hücrelerde stoplazmik

vezikulasyon, nuklear ve stoplazmik hipertofi, piknoz ve karyoreksis olur. Akut olgularda hafif, lokal nötrofil infiltrasyonları vardır. Komplike olmamış kronik olgularda ise lenfosit, plazmosit, histiyositlerden oluşan mononuklear hücre infiltrasyonuna rastlanır. Kaslarda fokal dejenerasyonlar, reparatif yangı ve mikrovasküler lezyonlar g r l r (Girgin ve Yonguç, 1988; Erasmus, 1990; Mertens, 1999; Murphy ve ark.,1999).

1.7. Teşhis

Akut hastalık formunda BT enfeksiyonundan şüphe duyulmasına karşın, perakut ve subklinik formlarda sekonder bakteriyel, viral, paraziter ve toksik etkenlerin de olaya karışması ile BTV enfeksiyonu şüphesi genellikle gölgelenmektedir. Hastalığın sindirim, dolaşım ve genital sistemi üzerinde etkili olması pek çok hastalık ile karışmasına neden olmaktadır. Özellikle şap, stomatitis vesicularis,   ek grubu enfeksiyonlar, bovine virus diarrhea (BVD-MD), küçük ruminant vebas , kontagi z ektima, salmonellosis, zehirlenmeler ve fotosensitizasyon ile karışabilmektedir. Sığırlarda BT'nin karıştığı hastalıklar arasında şap, veziküler stomatitis, BVD-MD, sığır vebas , akabane, ibaraki, sığırların gangrenli nezlesi ve fotosensitizasyon yer almaktadır. Bu nedenlerden dolayı, klinik bulgular göz önünde bulundurularak enfeksiyondan şüphelenilse de kesin teşhis için laboratuvar tanısı şarttır (Luedke, 1992).

Virolojik teşhis amacıyla; canlı ve beden ısısı yüksek hayvanlardan akut viremik fazda defibrine kan, oral, nazal, konjunktival swap örnekleri, lenf yumrusu biyopsi materyali, ölen ve/veya öldürülen hayvanlardan akciğer, dalak, lenf yumrusu alınabilir. Alınan  rnekler en kısa sürede, soğuk zincirde dondurulmadan laboratuvara ulaştırılmalıdır. Virus izolasyon şansının arttırılması için alınacak örnekler, özellikle canlı hayvanlardan viremi fazında ve sekonder etkenler olaya karışmadan alınmalıdır. Ölen hayvanlardan alınan örnekler virus izolasyonu için genellikle uygun olmamakla beraber, izolasyonun zorunlu olduğu durumlarda, ortam ısısına bağlı olarak en geç iki saat içinde alınmalıdır (Sellers, 1983).

Serolojik teşhis için 14 gün ara ile alınacak serum örneklerinin tercihen dondurularak, histopatolojik teşhis için %10 formol içinde akciğer, dalak, lenf yumrusu, dil, dudak parçalarının gönderilmesi uygundur (Sellers, 1983 ; Luedke, 1992). BTV enfeksiyonunun teşhisi; virus izolasyonu, antijen tespiti, nükleik asit tespiti ve sekansı ile serumda antikor saptanması olmak üzere 4 temel esasa dayanır.

1.7.1. Virus İzolasyonu

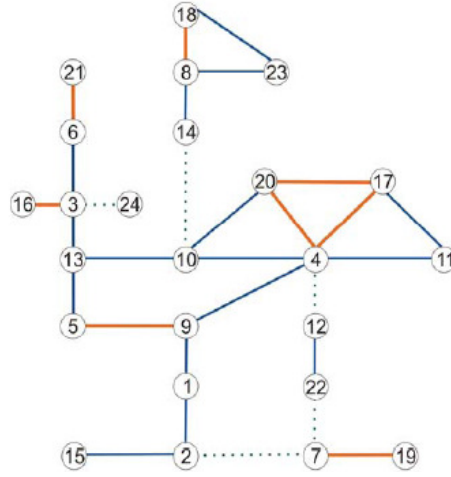
Virus izolasyonu, canlı hayvanlardan viremi döneminde alınan defibrine kan ve swap örneklerinden, ölen hayvanlarda ise dalak ve lenf düğümlerinden alınan örneklerle yapılmaktadır (Sellers, 1983). Virus izolasyonu, lezyonlu bölgelerden alınan örneklerden ve kandan embriyolu tavuk yumurtası ve hücre kültürlerine yapılan ekimlerinden yapılabilir (Goldsmith ve ark., 1975; Yonguç, 1981; Erasmus, 1990; Sellers, 1983). Primer kuzu böbrek, BHK ve Vero hücreleri izolasyon için çok yaygın kullanılmaktadır. Erasmus (1990) primer hücrelerin izolasyon şansını arttıracaklarını bildirmektedir. Buna karşın Vero hücresinin devamlı bir hücre kültürü olması, temininin kolaylığı ve kontaminasyon riskini azaltması nedeniyle bir çok laboratuvarında kullanımı tercih edilmektedir. Ayrıca sığır endotel hücreleri (CPAE) ve fare fibroblast hücreleri (L929) de izolasyonda kullanılmaktadır (Howell ve ark., 1967; 1970; Wechsler ve McHolland, 1988; Wechsler ve Leudke, 1991). *C. variipennis*'den elde edilen transforme lenfoblast hücrelerinde, diğer hücrelerden çok kısa sürede BTV'nin izole edilebileceği bildirilmiştir (Wechsler ve ark., 1989; 1991; White ve ark., 2005).

1.7.2. Viral Antijenlerin Tespiti

İzole edilen virusun ilk izolasyonu için Immun Floresan (IF) (Pini ve ark., 1966; Jochim ve ark., 1974; Blacksell ve Lunt, 1993), competitive Enzym Linked Immunosorbent Assay (c-ELISA) (Afshar ve ark., 1987; Afshar ve ark., 1989; House ve ark., 1990; Afshar ve ark., 1991; Reddington ve ark., 1991), Immunperoksidaz (IP) (Clavijo ve ark., 2000) ve Komplement Fikzasyon (CF) (Calisher, 1992; Pearson ve ark., 1992) testi gibi grup spesifik testler, serotip tayini için ise plak redüksiyon (Howell ve ark., 1967; 1970; Della-Porta ve ark., 1981) ve nötralizasyon testleri (OIE, 2000) kullanılmaktadır. Bu testlerde poliklonal serumlar kullanıldığından antijenik yakınlıklarından dolayı ancak grup spesifik antijenler tespit edilebilir. Agar gel immunodiffusion (AGID) testi

ile hem antijen hem de etkene özel antikorların varlığı saptanmakla birlikte ortalama 4-6 saatte sonuç alınmaktadır (Pearson ve ark., 1992). Counter immun electrophoresis (CIEF) testinin prensibi AGID testi ile aynı olmakla beraber, tek farkı testin hassasiyetini arttırmak için jel ve elektriksel alan kullanılmaktadır (Smriti, 2005). Antijen ELISA'nın gittikçe yaygınlaşarak kullanıldığı diğer bir metodu ise, immuncapture enzyme linked immunosorbent assay (I-ELISA) (Hawkes ve ark., 2000) ve spesifik monoklonal antikorların (MAb) kullanıldığı sandwich ELISA yöntemidir (Thevasagayam ve ark.; 1996). Nunamaker ve ark. (1997), *Culicoides variipennis* ve *Culicoides sonorensis*'de BTV'nin teşhisinde immunoelektronmikroskopi yöntemini kullanmışlardır. *Culicoides* hücre kültürlerinde viral antijenlerin tespitinde IF ve IP yöntemleri kullanılmaktadır (Wechsler ve McHolland, 1988; Wechsler ve ark., 1991). *Culicoides sonorensis*'den elde edilen KC hücre hattında (Wechsler ve ark., 1991) antigen-capture ELISA (Ag-Cap ELISA) tekniğiyle BTV' nin titresi belirlenmiştir (Mecham, 2006). Ag-Cap ELISA yöntemiyle viral antijenler sadece yüksek viremili hayvanların kanlarında tespit edilebildiklerinden BTV enfeksiyonun teşhisi için bu yöntemin yeterli derecede güvenilir olmadığı bildirilmiştir (Mecham, 1993; Stanislawek ve ark., 1996; Hawkes ve ark., 2000). Hamblin (2004) koyunlarda oluşturduğu deneysel enfeksiyonlarda, viral antijeni enfeksiyon sonrası 12. güne kadar c-ELISA yöntemiyle tespit etmesine rağmen, 12. günden sonra c- ELISA'da pozitif reaksiyon oluşmadığını bildirmiştir. Bu durumun kronik enfeksiyon sonrası ölen hayvandan viral antijenin saçılımıyla ilgili olduğu düşünülse de, özellikle VP7' ye karşı gelişen antikorların interferensi önemli rol oynamaktadır.

BTV' nin 24 serotipi antijenik olarak birbirlerinden farklılık göstermesine rağmen, aynı Orbivirus serogrubuna ait olduklarından yakın antijenik benzerlikleri bulunmaktadır. Erasmus (1990), plak redüksiyon testiyle BTV serotipleri arasındaki antijenik ilişkileri serolojik olarak saptamıştır. Ayıca serum nötralizasyon testi yardımıyla BTV serotipleri arasında yakın antijenik benzerlikler tespit edilmiştir. Antijenik olarak birbirleriyle çok yakın ilişkili olan serotipler arasında kuvvetli kros reaksiyonlar oluşmaktadır. Şekil 1.4.'de farklı BTV serotipleri arasındaki serolojik olarak ilişkiler gösterilmiştir.

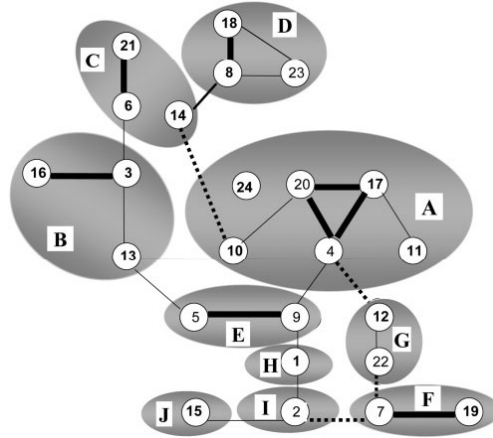


Şekil 1.4: BTV serotipleri arasındaki serolojik ilişki ve derecesi. (Turuncu çizgiler güçlü, mavi çizgiler daha zayıf kesikli çizgiler ise serotipler arasındaki en zayıf ilişkiyi ifade etmektedir) (Erasmus, 1990)

Maan ve ark. (2007) farklı BTV serotipleri arasındaki yakın antijenik ilişkileri, her bir serotipin segment 2 genomunun sekans analizlerini karşılaştırarak göstermişlerdir. Sekans analizleri sonunda, farklı BTV serotiplerinin segment 2 bölgelerine ait nükleotit dizinleri arasında %29-59 arasında değişen oranlarda farklılıklar saptanmıştır. Tüm BTV serotiplerinin VP2 bölgelerine ait aminoasit sekansları arasında %22.7-72.9 arasında değişen oranlarda farklılıklar tespit edilmiştir.

Serolojik olarak birbirleriyle yakın ilişkileri daha önceden tespit edilen 24 BTV serotipinin, segment 2 genom bölgelerine ait sekans analizleri yapılmıştır. Filogenetik analizler sonucunda, yakın sekans benzerlikleri olan serotiplerin kendilerine özgü bir küme oluşturdukları saptanmıştır. Bu değerlendirmeler sonrasında 10 adet küme (**nükleotip**) oluşmuştur. A nükleotipini, BTV-4, 10, 11, 17, 20 ve 24; B nükleotipini, BTV-3, 13 ve 16; C nükleotipini, BTV-6, 14 ve 21; D nükleotipini, BTV-8, 18 ve 23; E nükleotipini, BTV-5 ve 9; F nükleotipini BTV-7 ve 19; G nükleotipini, BTV-12 ve 22; H nükleotipini, BTV-1; I nükleotipini, BTV-2; J nükleotipini ise BTV-15 oluşturmaktadır. Farklı nükleotiplerin VP2 bölgelerine ait nükleotit sekansları arasında en az %40 oranında farklılıklar tespit edilirken, tek bir nükleotip içerisinde yer alan serotiplerin VP2 bölgelerine ait nükleotit dizinleri arasında ise en fazla %35 oranında farklılıklar tespit edilmiştir. Serotip 24, filogenetik olarak A kümesi içinde yer alan

serotip 4, 10, 11, 17 ve 20 ile ilişkili olmasına rağmen serolojik olarak bu serotipler ve diğer kümelerde bulunan serotiplerle ilişkili değildir (Maan ve ark., 2007). (Şekil 1.5)



Şekil 1.5: BTV serotipleri arasındaki serolojik ilişki temelinde oluşturulan filogenetik gruplandırma (Maan ve ark., 2007).

1.7.3. Viral RNA Tespiti

BTV nükleik asidinin tespiti için serotip spesifik PZR (Akita ve ark.,1992; Gard ve ark., 1992; Shad ve ark., 1997; Clavijo ve ark., 2002; Maan ve ark., 2003; Zientara ve ark.,2003; 2004; 2006), grup spesifik PZR (Dangler ve ark., 1990; McColl ve Gould, 1991; Katz ve ark., 1993; Harding ve ark., 1995; Aradaib ve ark., 1998; 2005), duplex RT-PZR (Anthony ve ark., 2003) ve RT-qPZR (Shaw ve ark., 2007) kullanılmaktadır.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) virus miktarı az ve bozulmaya başlayan izolasyon materyallerinde teşhis olanağı sunmasıyla virus izolasyon tekniklerine üstünlük sağlamaktadır. PZR'nin etkinliğinin artması, siklus sayısı, başlangıç materyalinin kalitesi, hedef DNA uzunluğu, bağlanma ve uzama ısılarının değişkenliği gibi pek çok faktöre bağlıdır. BTV bir RNA virusu olması sebebiyle, viral RNA'nın DNA'ya çevrilmesi için reverz transkripsiyon (RT) işlemine ihtiyaç vardır. Tasarlanan primerler ile orbiviruslar arasındaki ayrım kolaylıkla yapılmaktadır. Mertens ve ark., (2007) Avrupa orijinli BTV-1, BTV-2, BTV-4, BTV-9 ve BTV-16 BTV serotiplerinin segment 2 gen bölgelerine ait primerler tasarlamışlardır. RT-PCR' da kullanılan bu primerlerle farklı BTV serotiplerinin saha ve aşı suşlarının serotipik identifikasyonu hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılmaktadır. Aynı zamanda birbirleriyle çok yakın antijenik ilişkileri olan BTV serotipleri arasında çapraz amplifikasyonun oluşmaması

testin spesifite ve sensivitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Farklı genom segmentlerinin sekans analizleri yapılarak da söz konusu virusların serotip ayrımları yapılmaktadır (Dangler ve ark., 1990; Wade-Evans ve ark., 1990; McColl ve Gould, 1991; Akita ve ark., 1992; Shad ve ark., 1997; Anthony ve ark., 2003; Maan ve ark., 2003; Zientara ve ark., 2003). Segment 2 genomunun sekans analiz testleri (Savini ve ark., 2004; Potgieter ve ark., 2005; White ve ark., 2006; Maan ve ark., 2007) ise, saha suşlarını epidemiyolojik anlamda takibi ve topotiplerin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır.

1.7.4. Antikorların Tespiti

1.7.4.1. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT)

PRNT , BT antikor tespitinde en duyarlı metot kabul edilmiştir (Russel ve ark., 1967). Test serum ile değişen virus kombinasyonları yaygın olarak kullanılmıştır. PRNT, yüksek oranda duyarlı ve kantitatif bir testtir; izolatlar arası antijenik varyasyonlara bağlı kullanımı sınırlayan faktörler tam olarak bilinmemektedir. PRN testi güvenli, spesifik ve duyarlı olmasına karşın, zaman alıcıdır. PRN testi yoğun ve dikkatli çalışmayı gerektiren bir testtir. Bunun yanı sıra hücreye bağımlılık göstermesi ve virusun izolasyonuna gereksinim duyması PRNT'nin tanısız dezavantajı olarak değerlendirilmektedir.

PRNT, birçok viral enfeksiyonun teşhisinde altın standart olarak bilinmektedir (Word ve ark., 1999). Özellikle Bunya-, Flavi- ve Togavirus ailelerinde yeralan arbovirus enfeksiyonlarının tanısı amacıyla referans teknik olarak halen uygulanmaktadır (Gordon ve ark., 1992; Ulloa ve ark., 2003). Ortak grup antijenlerindeki yakın benzerlik nedeniyle ELISA ve SN testi gibi serolojik testlerle tür bazında tanısının konmasının mümkün olmadığı viral enfeksiyonlarda halen başarıyla kullanılmaktadır (Gordon ve ark., 1992; Özkul ve ark., 2006).

1.7.4.2. Diğer serolojik testler

BTV'nin serolojik teşhisinde AGID (Pearson ve Jochim, 1979), CF (Boulanger ve ark., 1967) ve C-ELISA (Afshar ve ark., 1992), dot immunoblotting (Gupta ve ark., 1990) yöntemleri grup spesifik antikorların tespiti; serum nötralizasyon (SN) (Herniman ve ark., 1983; Luedke, 1985), hemaglutinasyon inhibisyon (HI) (Van Der Walt, 1980), indirekt immunofloresan (IFAT) (Pini ve ark., 1968), blocking ELISA (B-ELISA) (Anderson, 1984; Jochim, 1985) ve plak redüksiyon nötralizasyon (PRN) (Luedke, 1992; Calisher, 1992; Pearson ve ark., 1992) testleri ise tip spesifik antikorların tespitine yönelik olarak sıklıkla kullanılmaktadır.

AGID testinin duyarlılığı azdır. Bu nedenle özellikle EHD virus başta olmak üzere Orbivirus grubundaki diğer viruslarla çapraz reaksiyonların oluştuğu bildirilmiştir (Gustafson ve ark., 1992; Pearson ve ark., 1992). SN testi, güvenli, spesifik ve duyarlı olmasına karşın, maliyetli ve zaman alıcıdır. AGID testinde oluşan çapraz reaksiyonlar bu testte görülmemektedir. I-ELISA (Jochim, 1985), C-ELISA (Afshar ve ark., 1992; Reddington ve ark., 1991; Gustafson, 1992), B-ELISA (Anderson, 1984; Lunt ve ark., 1988) ve IgM capture ELISA (Zhou ve ark., 2001) serogrup spesifik testlerdir ve BTV serotiplerinin VP7 bölgesini tanımlamaktadır. C-ELISA ve B-ELISA, VP3 ve VP7 proteinlerine (Afshar ve ark., 1992) spesifik MAb geliştirilerek serumlarda antikor tespitinde kullanılmaktadır. Hem C-ELISA hem de B-ELISA anti VP7 MAb antikorları ile serum antikorları arasındaki yarışma esasına dayanmaktadır. C-ELISA testi AGID, CF ve PRN testlerinden daha duyarlı ve spesiktir (Afshar ve ark., 1987; Afshar ve ark., 1989). Martyn ve ark. (1990) oluşturdukları deneysel enfeksiyonların serolojik teşhisinde diagnostik grup spesifik antijen olarak mayada eksprese edilen VP7 proteinin kullanıldığı B-ELISA yöntemini kullanmışlardır. Afshar ve ark. (1989) C-ELISA'nın sensitivitesini %99.9, I-ELISA'nın sensitivitesini ise %99.8 olarak bildirmişlerdir. C-ELISA ve AGID testi karşılaştırıldığında spesifitesi %99.2, sensitivitesi ise %98.4 olarak belirlenmiştir.

1.8. Başışıklık

BTV' nin VP2 ve VP5 yüzey glikoproteinleri çok immunojeniktir ve başışıklıktan sorumludur. BTV antijenik olarak Orbivirus genusuna dahil diğerk viruslar ile (AHSV, geyiklerin EHD virusu ve Palyam virus) yakın ilişkili olmasından dolayı BTV ve diğerk viruslar arasında hem çapraz nötralizasyon hem de çapraz koruma vardır (Roy, 1996). BTV-2'nin VP2, VP7, NS1 ve NS3 proteininin eksprese edilerek capripox virusa transferi ile elde edilen aşı, keçi ve koyunlarda BTV-2 enfeksiyonuna karşı başışıklık sağlamıştır. Her iki türde serokonversiyon gözlemlenmiştir. Keçilerde BTV-2 NS3, VP7 ve VP2 antijenlerine karşı lenfoproliferatif bir yanıt oluşmuştur (Perrin ve ark. 2007). Baculovirusun VP2 ve VP5 proteinlerini eksprese edecek şekilde tasarlanan rekombinant aşı ile yapılan immunizasyonda, koyunlarda BTV nötralizan antikorları oluşmuştur. VP5 geni rekombinant aşı, VP2 geni rekombinant aşı ile kombine edildiğinde, VP2 geni rekombinant aşıdan daha yüksek titrede nötralizan antikor oluşturmaktadır (Roy, 1989b). BTV-17' nin dış kapsit proteinleri VP2 ve VP5'in eksprese edecek şekilde tasarlanan canarypox virusa rekombinant aşının, koyunlarda koruyucu bir immunizasyon oluşturduğu ve canlı attenue aşı uygulamalarından sonra görülen embriyopatilere neden olmadığı belirtilmiştir (Boone ve ark., 2007). Hücre aracılı immun yanıt (T ve B lenfosit hücreleri) BTV enfeksiyonundan korunmada önemli bir rol oynamaktadır (Jeggo ve ark., 1984).

BT hastalığını geçiren hayvanlarda tip spesifik başışıklık oluşur (Fenner ve ark., 1987). BTV ile enfekte olan hayvanlarda grup spesifik, tip spesifik ve komplementi bağlayan antikorlar 7-21 günler arasında oluşmaktadır. Tip spesifik nötralizan antikorların 3 yıl, grup spesifik antikorların ise 6-18 ay arasında koruma sağladığı bildirilmiştir (Osburn, 1992).

BT enfeksiyonunu geçiren hayvanların devamlı bir spesifik başışıklık oluşturdıkları, buna karşın diğerk tiplerin bulunması halinde aynı hayvanlarda yeni hastalık oluşabileceği vurgulanmıştır. Fakat bu reenfeksiyonlar daha hafif seyirlidir (Fenner ve ark., 1987). Çünkü serotipler arasında kısmi bir başışıklık oluşmaktadır. Başışıklığın süresi tam belirgin değildir. Virusun çok sayıda serolojik tipinin bulunması

ve koyun popülasyonlarının farklı duyarlılığa sahip olmaları bağışıklık süresinin saptanmasını güçleştirmektedir (Bowne, 1971).

Bağışıklıktan asıl sorumlu olan nötralizan antikorlardır. Ancak nötralizan antikorların varlığının saptanamadığı bazı hayvanlar virulent BTV ile enfekte olduklarında hastalığa direnç göstermişlerdir. Bu koyunlarda tip spesifik humoral bağışıklığa oranla çok düşük düzeyde de olsa, hücresel bağışıklığın korunmada etkili olduğu bildirilmiştir (Kimberling, 1988; Erasmus, 1990; Osburn, 1992). Yeni doğmuş hayvanlara kolostrum yoluyla aktarılan maternal antikorlar yavruyu 2-6 ay kadar koruyabilir (Fenner ve ark., 1987; Erasmus, 1990; Murphy ve ark., 1999). Bu dönemde yapılan aşılamadan sonra oluşacak aktif bir immunité, kolostral antikorlar tarafından interfere edilir. Bu nedenle kolostral immunité süresi içinde aşı yapılmaması önerilmektedir.

Gaydos ve ark. (2002) beyaz kuyruklu geyiklerde oluşturdukları deneysel BTV enfeksiyonunda maternal antikorları AGID testi ile 23. haftaya, serum nötralizasyon testi ile 17-18. haftaya kadar tespit edebilmişlerdir.

Monovalent BTV-2 modifiye canlı aşısıyla yapılan aşılamada sığırlarda % 100 bağışıklık oluşmakta ve 7 ay süreyle devam etmektedir (Savini ve ark., 2004).

BTV' nin lenfotropik özelliğinden dolayı immun sistemi baskıladığı ve bundan dolayı latent enfeksiyonların oluşumunu tetiklediği de değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Erasmus, 1990; Murphy ve ark., 1999).

1.9. Koruma ve Kontrol

Bir ülkede BT hastalığı tespit edilmişse, onu eradike etmek imkansız ve hatta kontrol altına almak güç olabilir. Geniş bir konakçı spektrumu ve subklinik taşıyıcı hayvanların varlığı sebebiyle, virus kaynağının eliminasyonu mümkün değildir. Bu nedenlerle genel bir görüş olarak hastalığın eradikasyonu ve hatta insekt vektörlerin etkin şekilde azaltılması imkânsız olarak düşünülmektedir. İnsekt kontrollerinin önemi vurgulanmasına rağmen yine de insektler meteorolojik ve teknolojik faktörlerin

etkisiyle çok geniş bir ölçekte (bir şehirden diğerine hatta kıtalararası) nakledilebilirler. Genel bir görüş olarak duyarlı hayvan türlerinin hayvanların özellikle insekt aktivitesinin fazla olduğu akşam saatlerinde kapalı mekânlara alınması ve insekt kovucu (repellent) ilaçlarının uygun kullanımının enfeksiyonun yayılışını engelleyebileceği ve bu şekilde hastalığın prevalansını kısmen de olsa düşürmenin mümkün olabileceği ileri sürülmektedir (Sellers ve Pedgey, 1985; Erasmus, 1990).

Koruma ve kontrol amacıyla en etkili yol bireysel immunizasyondur. BT aşıları ülkede salgın yapan tiplere göre monovalan veya polivalan olarak hazırlanır (Bowne, 1971; Gillespie ve Timoney, 1981). Canlı attenuue BTV aşısı 40 yıldan beri kullanılmaktadır (Erasmus, 1990). Koyunlarda 3 hafta aralıklarla uygulanan canlı attenuue BTV aşılama çalışmalarında , son aşılamaadan 10 gün önce antikorların oluştuğu ve yaklaşık 4 hafta sonra maksimum seviyeye ulaştığı görülmüştür. Antikorların 1 yıldan daha fazla süre bağışıklık sağladıkları bilinmektedir. Canlı attenuue BTV aşıları tüm serotiplere karşı kullanılabilmektedir. Bolearic Adaları'nda 2001-2003 yılları arasında yapılan aşılamaalar başarılı sonuçlar vermiş ve eradikasyona katkıda bulunmuştur (Gerbier ve ark., 2004). Canlı attenuue BTV aşıları, insekt vektörlerin bulunduğu sezonlarda kullanılmamalıdır. Çünkü aşı virusunun insektlerle nakli ve replikasyonu sırasında tekrar olası re-assortmentlara bağlı olarak virulens kazanabileceği bildirilmiştir (Erasmus, 1975b; Walton, 1992). Vahşi tip BTV suşları ile canlı attenuue aşı virusunun genetik reassortmenti sonucu yeni BTV serotipleri oluşabilmektedir. Aşı virusunun yeniden virulens kazanması ve genetik reassortment oluşumunda vektörlerin rolü olup olmadığı bilinmemektedir. Gebeliğin ilk yarısında canlı attenuue aşıyla aşılamanın yapıldığı koyunlarda ve gebeliğin ilk 3 aylık döneminde canlı attenuue aşıyla aşılaman sığırlarda fötusun beyinde malformasyonlar ve abort meydana gelmektedir (Savini ve ark., 2008).

İnaktif aşılaların kısa süreli bağışıklık oluşturmalarına rağmen, canlı atenüe aşılardan daha güvenli olduğu bildirilmektedir. Çünkü canlı attenuue aşı uygulamalarında sonra bazen embriyopati'ler ve koçlarda geçici sterilite olayları gözlenmiştir. İnaktif aşılaların kullanımı sonrasında sığır ve keçilerde viremi döneminin kısaldığı görülmüştür. Bu tip

aşılar insekt vektörlerin bulunduğu sezonlarda güvenle kullanılabilirler. İspanya, İtalya, Fransa (Korsika) ve Portekiz’de yaygın olarak kullanılmışlardır.

Amerika’da hücre kültürlerinde üretilen monovalent modifiye canlı aşılar kullanılmaktadır. BTV-10 serotipine karşı uzun süreli bağışıklık sağlamaktadır. Ancak aşı virusunun plasentayı geçerek fötusta encephalopati, retinal displazi, körlük gibi teratojenik bozukluklara yol açtığı bildirilmiştir (MacLachlan, 2000).

BT aşılama programlarında karşılaşılan zorluklardan biri enfekte hayvanı aşılanmış hayvandan ayırt etmektir. Barros ve ark. (2009) bu problemi çözmek amacıyla I-ELISA sistemi geliştirmişlerdir (DIVA). Rekombinant olarak elde ettikleri NS3’e karşı oluşan serolojik yanıtı koyun ve sığırlarda test etmişlerdir. Bu amaçla inaktive bivalan BTV2-4 ile aşılanan hayvanlar ile kontrol grubunu BTV2-4 ile enfekte etmişlerdir. Aşılanmamış kontrol grubunda enfeksiyonu takiben yaklaşık 15. günde NS3’e karşı oluşan antikorlar I-ELISA ile saptanırken, aşıli hayvanlarda NS3’ e karşı serolojik yanıt gelişmemiştir.

BTV serotipleri arasında yakın antijenik ilişki olmadığından, birçok BTV tipinin aynı anda enfeksiyon oluşturduğu durumlarda problemler ortaya çıkmaktadır. Bu problemlerle karşılaşmamak için polivalan aşılarda kullanılması en iyi yöntemdir (Erasmus, 1990). Bilinen 24 serotipten 21’ nin bulunduğu Güney Afrika’ da polivalan aşılarda hazırlanmasında, bazı suşlara karşı yeterli bağışıklık oluşmaması sebebiyle kombinasyon güçlükleriyle karşılaşmıştır. Bundan dolayı polivalan aşılarda suş seçimi önemlidir(Erasmus, 1990; Gleering, 1990).

Günümüzde en az 3 hafta aralıklarla verilen her biri 5 farklı serotip içeren 3 polivalan aşı Güney Afrika’ da kullanılmaktadır (Erasmus, 1990).

Aşılar doku kültüründe üretilmektedir. Aşılar, ilkbaharda ve kırımdan 3-6 hafta önce uygulandığında immunité şansı yüksektir. Gebe ve 6 aydan küçük hayvanlara aşı uygulanmamalıdır. Gebe koyunlar doğum sonrası, koçlar da koç katımından sonra aşılanmalıdır (Howell ve Verwoerd; 1971). Maternal antikorlar kolostrum ile yeni

doğanlara nakledilir (Erasmus, 1990) ve yaklaşık 2-6 ay korunma sağlar. İmmun yanıtı artırmak amacıyla her yıl aşılamanın tekrarlanması önerilir (Erasmus, 1975b).

1977 yılında Aydın ilinde görülen enfeksiyonda koyunlardan alınan kan örnekleri kesin teşhis ve identifikasyon için Güney Afrika Onderstepoort Veteriner Araştırma Enstitüsüne gönderilmiş ve etken BTV-4 olarak tespit edilmiştir. Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde tip-4 e karşı aşı üretimine başlanmıştır. Aşı suşu, Pirbright Araştırma Enstitüsünden getirilen, Güney Afrika orjinli, hücre kültürüne adapte SA.BT.4/BHK/4 suşudur. Bu attenuue suş, ETY de 72, kuzu böbrek hücre kültürlerinde 2, BHK hücre kültürlerinde 4 pasaj yapıldıktan sonra elde edilmiştir.

Hastalıktan daha önce hiç etkilenmemiş Kuzey Avrupa' da 2007 yılında BTV salgınları görülmüştür. Sığır işletmelerinde hastalıktan dolayı büyük ekonomik kayıplar oluşmuştur. Yapılan izolasyon çalışmalarında mavi dil virüsünün serotip-8 olduğu tespit edilmiştir. BTV-8' in insekt vektörünün C.dewulffi olduğu düşünülmektedir. Avrupa Birliği Komisyonu 90/424/CEE kararı ile, ruminant işletmelerinin tamamında 2008 yılı bahar dönemi ile 2008 yılı haziran ayı arasında inaktif BTV-8 aşısıyla aşılama yapılmıştır. Aşı sığır, koyun ve keçilere uygulanmıştır. Almanya, Belçika, Fransa, Hollanda ve Lüksemburg'da hastalık daha sık görüldüğünden, aşılamalarda bu ülkelerde 200 km'lik tampon bölgeler oluşturulmuştur.

1.10. Amaç

BT hastalığı, Türkiye'nin de içinde yer aldığı Akdeniz çukuru ülkelerinde ruminant yetiştiriciliklerinde önemli kayıplara neden olan bir Arbovirus enfeksiyonu olarak dikkati çekmektedir. Kan emen ve uçucu vektör arthropodlarla naklediliyor olması yanında, ülkemizde belirlenen en az 3 serotipinin bulunması sebebiyle diğer virus enfeksiyonlarından farklı epidemiyolojik özelliklere sahiptir. Bu durum enfeksiyonun varlığı ve seyrinin serotip düzeyinde sürekli ve çok süratli takibini gerekli kılmaktadır. Planlanan bu araştırmanın amacı, ülkemizde seyreden BT virus serotiplerinin identifikasyonu için jenerik ve tip spesifik RT-PZR ile PRN tekniklerinin geliştirilmesi ve tanısal etkinliklerinin sorgulanmasıdır.

2. MATERİYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Hücre Kültürü

BTV saha izolatlarının üretilmesi, titresinin belirlenmesi ve bu izolatlara spesifik antikorların tespiti amacıyla uygulanacak olan plak reduksiyon ve nötralizasyon testinde Viroloji Anabilim Dalı hücre kültürü koleksiyonunda bulunan Vero AFFSA hücre kültürü kullanıldı. Hücre kültürlerinde idame vasat olarak; 25000 U/ml Penisilin ve 20 mg/ml Streptomisin ve %10 Fötal Dana Serum (FDS, Biochrom, Almanya) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Seromed, Almanya), virus üretme vasatı olarak ise %2 FDS içeren DMEM kullanıldı.

2.1.2. Referans Viruslar

Araştırma kapsamında yapılan jenerik ve serotip spesifik RT-PZR uygulamalarında referans viruslar olarak Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı virus koleksiyonunda bulunan BT virusun 2, 4, 9 ve 16. serotipleri kullanıldı. Diğer taraftan tavşanlardaki hiperimmunizasyon çalışmaları, plak test, makronötralizasyon ve plak redüksiyon nötralizasyon testlerinde ise serotip 2 haricindeki diğer üç referans virus kullanıldı. Bu viruslar arasında yer alan serotip 4, ülkemizde Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından hazırlanan aşı virusu iken diğer tüm viruslar İngiltere, IAH, Pirbright Laboratuvarından temin edildi.

2.1.3. BTV Saha İzolatları

Araştırma kapsamında serotipik identifikasyonları yapılmak üzere, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne izole edilen ve daha önce ortak bir proje kapsamında (TUBITAK, TOVAG-105O241) Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı virus koleksiyonuna katılan 26 adet BT virusu kullanıldı. Söz konusu viruslar, 1998-2005 yılları arasında Türkiye'nin

değişik bölgelerindeki BT şüpheli klinik olgulardan alınan örneklerin, bir pasaj embriyolanmış tavuk yumurtası (ETY) inokulasyonu sonrasında, sadece Ag-Capture ELISA tekniği ile ön identifikasyonu gerçekleştirilmiş ve sonrasında BHK-21 hücrelerine adaptasyonu ile izole edilmiştir. Ancak anabilim dalımızda BHK-21 hücre kültüründe yaşanan problemler nedeniyle virusların Vero AFFSA hücrelerine adaptasyonuna çalışıldı. Araştırmada kullanılan virus izolatlarına ait bilgiler Çizelge 2.1’de sunuldu.

Çizelge 2.1. : Araştırmada kullanılan virus izolatlarına ait bilgiler.

İZOLAT KODU	İL	İLÇE/KÖY	TARİH	TÜR	HÜCRE/ PASAJ NO
TR-1	MUĞLA	DALAMAN	1999	KOYUN	VERO/5
TR-2	İZMİR	MENEMEN	1998	KOYUN	VERO/2
TR-3	AYDIN	BOZDOĞAN	1998	KOYUN	VERO/3
TR-4	İZMİR	MENEMEN	1999	KOYUN	VERO/2
TR-5	MUĞLA	DALAMAN	1998	KOYUN	VERO/6
TR-6	İZMİR	BUCA	1998	KOYUN	VERO/3
TR-7	ÇANAKKALE	YENİCE	1999	KOYUN	VERO/2
TR-8	ANTALYA	MANAVGAT	1999	KOYUN	VERO/2
TR-9	İZMİR	TİRE	1999	KOYUN	VERO/4
TR-10	AYDIN-5	SÖKE	1998	KOYUN	VERO/3
TR-11	ANTALYA	MANAVGAT	1999	KOYUN	VERO/2
TR-12	AYDIN	ÇİNE	1998	KOYUN	VERO/3
TR-13	AYDIN	MERKEZ	2001	KOYUN	VERO
TR-14	AYDIN	ÇİNE	2001	KOYUN	VERO
TR-15	AYDIN	ÇİNE	2001	KOYUN	VERO
TR-16	AYDIN	GERMENCİK	2000	KOYUN	VERO
TR-17	AYDIN	ÇİNE	2001	KOYUN	VERO
TR-18	AYDIN	DOZDOĞAN	2005	KOYUN	VERO/3
TR-19	DENİZLİ	ACIPAYAM	1998	KOYUN	VERO/1
TR-20	AYDIN	ÇİNE	1999	KOYUN	VERO/1
TR-21	ANTALYA	SERİK	1999	KOYUN	VERO/1
TR-22	MUĞLA	MİLAS	1999	KOYUN	VERO/1
TR-23	İÇEL	MERKEZ	1999	KOYUN	VERO/1
TR-24	İZMİR	BUCA	1999	KOYUN	VERO/1
TR-25	AYDIN	BOZDOĞAN	1999	KOYUN	VERO/1
TR-26	ANTALYA	SERİK	1999	KOYUN	VERO/1

2.1.4. Dana serumu

Virus izolasyonu ve hücrelerin üretilmesinde ticari olarak temin edilen f tal dana serumu (FDS, Biochrom S-0113, Almanya) kullanıldı.

2.1.5. Deney Hayvanı

Araştırmada PRN testinde kullanılan tip spesifik hiperimmun serumların elde edilmesi amacıyla bir seri tavşan kullanıldı. İmmünizasyon çalışmalarında kullanılan tavşanlar, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanlarını Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (G DAM) temin edildi. İlgili merkeze etik kurul izni ile yapılan müracaat sonrasında talebimiz uygun görülerek, çalışmada kullanılacak 8 adet Yeni Zelanda tavşanının inokulasyonu için rezervasyon yapıldı. Hiperimmunizasyon için 3 adet serotip kullanılacak olması nedeniyle, tavşanlar her grupta iki adet olacak şekilde toplam 3 inokulasyon grubuna ayrılırken, tavşanlardan iki tanesi de kontrol grubunu oluşturmak üzere ayrı tutuldu. Araştırmanın hayvan deneyleri ile ilgili bölümüne ait etik izin EK-1'de sunuldu.

2.2. Metod

2.2.1. BTV Saha İzolatlarının  retilmesi ve Klonlanması

ETY inokulasyonu sonrasında Ag-Capture ELISA testi ile pozitif olarak tespit edilen izolatlar VeroAFFSA hücrelerine adapte edildikten sonra, son nokta sulandırma (end-point dilution) tekniği ile klonlandı. Öncelikle viruslar serumsuz DMEM içerisinde logaritma 10 tabanına göre 6 basamak sulandırıldı. Her sulandırmadan 200 l hacimde daha önceden VeroAFFSA hücresi üretilen 24 gözlü hücre kültürü tabletlerin 2 adet gözüne adsorbsiyonlu yöntem ile inokulasyon yapıldı. Bir saat süreyle yapılan inkübasyon işlemini takiben her bir tablet gözüne 1 ml DMEM ilave edildi. Kültür sistemi 4-5 gün süreyle %5 CO₂ içeren 37 C lik etüvde inkübe edildi. Süre sonunda CPE gözlenen son iki sulandırma basamağındaki hücreler pipete edilerek tablet yüzeyinden ayrılması sağlandı. Ayrılan hücreler santrifüj tüplerine aktarıldı. Dondurma-

özme ve yüksek devirde santrifüj işlemlerini takiben viruslar 0.5 ml hacimde porsiyonlanarak -80°C'ye kaldırıldı.

2.2.2. BTV Saha İzolatlarının Plak Titrasyon Yöntemi ile Enfeksiyözite Güçlerinin Belirlenmesi

Hücre kültürlerinde üremesini tamamlamış ve porsiyonlanarak -80°C'de saklanan viruslar, serumsuz DMEM içinde 10 katlı olacak şekilde 8 basamak sulandırıldı. Her sulandırmadan 200 µl hacimde daha önceden Vero hücresi üretilen 24 gözlü hücre kültürü tabletinin ikişer gözüne inokulasyon yapıldı. Bir saat süreyle yapılan 37°C'de %5 CO₂' li etüvde inkübasyon işlemini takiben her bir tablet gözüne en az 1 ml hacimde DMEM içinde %1.6 olacak şekilde hazırlanan Carboxymethylcellulose (CMC; Sigma-Aldrich, USA)' dan ilave edildi. Kültür sistemi 4-5 gün süreyle aynı koşullarda inkübe edildi. Süre sonunda hücre yüzeyindeki CMC uzaklaştırılmaksızın kullanılan tüm gözlerdeki hücreler %10 formaldehit solüsyonu ile en az 30 dakika (tercihan gece boyunca) oda sıcaklığında fikze edildi. Fikzasyonu tamamlanan hücreler %0.35 kristal viyole boyası ile boyandı ve her sulandırma için oluşan plaklar sayıldı. Sonuçlar aşağıdaki formüle yerleştirilerek, virusların enfeksiyöziteleri plak oluşum ünitesi (POÜ/ml) şeklinde hesaplandı.

$$\text{POÜ/ml} : \text{Plak gözlenen son sulandırma} \times \text{Ortalama plak sayısı} \times 5$$

2.2.3. BTV Saha İzolatlarının İdentifikasyonu

Hücre kültürlerinde, sitopatolojik değişiklikler (CPE) saptanan tüpler süre sonunda -80°C lik derin dondurucuda donduruldu ve 37°C lik su banyosunda hızla çözdürüldü. Steril tüplere aktarılan örnekler, +4°C de, 3000 rpm' de, 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant, virus identifikasyonu için kullanıldı. İdentifikasyon işlemi, 2.2.3.1 ve 2.2.3.2' de tanımlanan şekilde, sırası ile moleküler genetik identifikasyon ve PRNT ile yapıldı.

2.2.3.1. Moleküler Genetik İdentifikasyon

2.2.3.1.1. Jenerik Primerler ile Moleküler İdentifikasyon

Mavidil viruslarının identifikasyonu, sırası ile 2.2.3.1.1.1, 2.2.3.1.1.2 ve 2.2.3.1.1.3' de tanımlanan şekilde, BTV Genomik RNA İzolasyonu, jRT-PZR yöntemi ve PZR Ürünlerinin Agaroze Jel Elektroforez Yöntemi ile Görüntülenmesi ile gerçekleştirildi.

2.2.3.1.1.1. BTV Genomik RNA İzolasyonu

RNA ekstraksiyonunda Chomczynski ve Sacchi (1987) tarafından tanımlanan Asit Guanidin tiyosiyanat-Fenol ekstraksiyon metodu kullanıldı. Bu amaçla 400µl klinik örnek ve 400µl solüsyon D (4.2M Guanidin tiyosiyonat, 0.75M Sodyum Sitrat dihidrat, 0.33M N-Lauril sarcosin ve 360µl 2-merkaptotanol) karışımı 1.5 ml'lik tüp içerisinde bir araya getirildi ve karıştırıldı. Karışımın üzerine 300µl asit fenol (pH 4), kloroform-izoamilalkol [Ch/IsoA (49:1)] ve 100µl 3M sodyum asetat (pH 5.2) ilave edildi ve homojen bir karışım elde edilene kadar 15 saniye süre ile karıştırıldı. Tüpler masaüstü santrifüjde, oda ısısında, 12000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan 3 fazın en üst fazından 700 µl yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine eşit hacimde -20 °C'ye soğutulmuş 2-izopropanol ilave edildi ve karıştırıldı. Nükleik asit presipitasyonu için karışım en az 1 saat süre ile -80°C de bekletildi. Süre sonunda donmuş olan karışımlar oda ısısında eritildikten sonra, 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Çöken RNA pelleti, %70' lik etanol ile yıkandı ve 37°C lik etüvde kurutuldu. Kurutulan pelletler 20 µl deiyonize su (18Mohm/cm, Applichem, Almanya) ile çözüldü.

2.2.3.1.1.2. Jenerik Reverz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (jRT-PZR)

Ekstraksiyon sonunda elde edilen RNA, komplementer DNA (cDNA) sentezi için kalıp olarak kullanıldı. Bu amaçla RT-PZR, birbirini takip eden iki basamakta ve sırasıyla 15µl ve 50µl' lik hacimlerde gerçekleştirildi. İlk aşamada yapılan cDNA sentezi, iki farklı karışımdan oluşan ve birbirini takip eden iki reaksiyon sonucu gerçekleştirildi. Karışım I, 10µl' lik hacimde hazırlandı ve termal çevirici cihazda (Biometra, Almanya) ikincil RNA yapılarının açılması için, 70°C de 5 dakikalık ısı döngüsü uygulandı. Cihazdan alınan tüpler buz akülerinde soğutulduktan sonra, karışım I' in üzerine karışım

II' den 5µl eklendi ve 25°C de 5 dakika, 37°C de 1 saat ve 70°C de 5 dakika basamaklarından oluşan ısı döngüleri sonunda tek iplikli cDNA sentezi gerçekleştirildi. Karışım I ve II' nin içerikleri Çizelge 2.2' de sunuldu.

Çizelge 2.2. Reverz Transkripsiyon karışımlarının bileşimleri.

Karışım I		Karışım II	
Bileşenler	Miktar (µl)	Bileşenler	Miktar (µl)
RNA Eksraktı	5	5X RT Tampon	3
Hegzamer Primerler	1	dNTP (10 mM)	1
Deiyonize Su (18 MOhm/cm)	4	MMLV Reverz Transkriptaz	1
Toplam Hacim	10	Toplam Hacim	5
Toplam Reaksiyon Hacmi		15 µl	

Komplementer DNA sentezinden sonra DNA'nın jenerik PZR yoluyla çoğaltılması aşamasına geçildi. BTV izolatlarının tümü, 10 nolu RNA segmentine (Seg-10) yönlendirilmiş BTV-Gen/10/F ve BTV-Gen/10/R primer çiftleri ile PZR'ye tabi tutuldu. Araştırmada kullanılan primer dizinleri Çizelge 2.3.'de sunulmuştur.

DNA amplifikasyonu için tanımlanan 50 µl lik PZR karışımının bileşimi Çizelge 2.4' de sunulmuştur. Farklı primer setleri ile hazırlanan karışımlara aynı ısı döngüleri uygulandı. Termal çevirici cihazında bulunan reaksiyon tüplerine, 94°C de 4 dakikalık denatürasyon basamağını takiben, 56°C de 45 saniye, 72°C de 2 dakika ve 94°C de 30 saniyelik 35 döngüden oluşan çoğaltma basamağı uygulandı. Çoğaltma işlemi 50°C de 1 dakika, 72°C de 10 dakikalık son uzama basamağından oluşan ısı döngüleri ile tamamlandı.

Çizelge 2.3. Jenerik PZR’ de kullanılan primer dizinleri, yerleşimleri ve elde edilen ürün büyüklüğü.

Primer Kodu*	Lokasyon (nt)	Primer dizini (5’→3’)	Ürün Büyüklüğü (bp)	Kaynak
BTV-Gen/10/1-F	1-22	GTAAAAAAGTGTCTGCTGCCATG	822	Nikolakaki ve ark., 2005
BTV-Gen/10/798-R	798-822	GTAAGTGTGTAGCGCCGCATACCCT		

*BTV-Serotip/Segment/primer başlangıç nükleotidi-yönü

Çizelge 2.4. Jenerik primerlerle yapılan PZR’u karışım bileşimi.

PZR Karışım Bileşimi		
Bileşen	Miktar (µl)	Son Konsantrasyon
cDNA	5	
Taq DNA Polimeraz	0.5	3U
10X Tampon	5	1X
MgCl ₂ (25mM)	4	2.0 mM
dNTP (10mM)	1	0.04µM
Primer F (10pmol)	0.8	0.32µM
Primer R (10 pmol)	0.8	0.32µM
Deiyonize Su (18MOhm/cm)	32.9	
Toplam Reaksiyon Hacmi	50 µl	

2.2.3.1.1.3. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrophorez Yöntemi ile Görüntülenmesi

Beher içerisinde 0.3 gr agaroz (Prona, EU) tartıldı. Üzerine 30 ml 0.5X TAE (Tris-Asetik Asit-EDTA) elektrophorez tamponu ilave edildi ve karışım mikrodalga fırında kaynatılarak çözüldü. Jelin 50-55°C ye soğuması beklendi ve 0.5 µg/ml etidyum bromid (Sigma, ABD) ilave edildi. Hazırlanan % 1 lik agaroz, jel tarağı yerleştirilmiş jel tablasına döküldü. Agarozun donması için 15 dakika beklendi. Taraklar çıkartıldı ve jel tablası elektrophorez tankına yerleştirildi. PZR ürünleri, 5 kısım ürün, 1 kısım 6X yükleme boyası (10mM Tris-HCl, %0.03 bromophenol blue, %60 gliserol, 60mM EDTA) oranında karıştırılarak toplam 6µl hacminde jel tarakları yardımı ile açılan gözlemlere aktarıldı. Ürün büyüklüğünün belirlenebilmesi için, PZR ürünleri ile birlikte 1µl 100 bp’lik DNA merdiveni (Fermentas, Litvanya) yüklendi. Jel’e volt/cm elektrik akımı

uygulanarak 30 dakika süreyle DNA ürünlerinin göçü sağlandı. PZR sonucunda oluşan bantlar UV transilluminatör (Vilber Lourmat, Fransa) ve jel dokümantasyon sistemi (Kodak, Gel Logic 100, ABD) yardımı ile görüntülendi.

2.2.3.1.2. Serotip Spesik Primerler ile Moleküler İdentifikasyon (sRT-PZR)

BT virus saha izolatlarının, tip spesifik primerler ile identifikasyon işlemi, sırası ile 2.2.3.1.1.1, 2.2.3.1.1.2 ve 2.2.3.1.1.3' de tanımlanan şekilde, RNA Ekstraksiyonu işlemi, jRT-PZR yöntemi ve PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroferez Yöntemi ile Görüntülenmesi ile gerçekleştirildi.

Bu amaçla, Mertens ve ark. (2007) tarafından tasarlanan BT virusunun tip 2 ve tip 4 primerlerine ilave olarak, tip 9 ve tip 16 primerleri bu çalışma kapsamında Akdeniz çukuruna kıyısı bulunan ülkelerden izole edilen dizinler kullanılarak tasarlandı. Araştırmada kullanılan primer dizinleri ve ilgili genler üzerindeki yerleşimleri Çizelge 2.5' de sunulmuştur.

Çizelge 2.5. Tip spesifik PZR için kullanılan primer dizinleri ve özellikleri.

Primer Kodu*	Lokasyon (nt)	Primer dizini (5'-3') [§]	Ürün Büyüklüğü (bp)	Spesifite
BTV-2/2/852-F	852-874	GA K T Y T R ATGTCGGATATT R GTCACG	1804	Tip-2
BTV-2/2/2656-R	2656-2638	TCGTCGCACACTTC R ATAG		
BTV-4/2/200-PF	200-221	GCTTAACATAAAACCAACGAGG	2324	Tip-4
BTV-4/2/ 2524R	2524-2505	AACTTGGACGTC ACAACAGG		
BTV-9/2/1473-F	1473-1491	GG S GAATATATTTCT R ATGG	1128	Tip-9
BTV-9/2/2601-R	2601-2584	GGAAAACTGATTGGCAAT		
BTV-16/2/2010F	2010-2029	GAACGTTGTATGATGTCTCG	762	Tip-16
BTV16/2/2772R	2772-2752	GCCGAAGGTGCGATCTGGCCG		

*BTV-Serotip/Segment/primer başlangıç nükleotidi-yönü

[§] Standart Karışık baz tanımlamaları, **K**: G/T; **Y**: C/T; **R**: A/G; **S**: C/G

2.2.3.2. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT) ile Serotiplendirme

Referans viruslar (BTV-9 ve BTV-16) ve ülkemizde aşı suşu olarak kullanılan BTV-4 ile tavşanlar hiperimmünize edildi. Elde edilen hiperimmun serumlar kullanılarak Vero AFFSA hücre kültüründe üretilen 21 adet izolatın her birine ayrı ayrı PRN testi uygulandı.

2.2.3.2.1. Hiperimmunizasyon için Virusların Üretilmesi ve Konsantrasyonu

Referans viruslar (BTV-9 ve BTV-16) ile aşı suşu BTV-4, 175 cm²'lik kültür şişelerinde monolayer olarak üretilen Vero AFFSA hücrelerine inokule edildi. Bu amaçla, her serotip için 2 adet flask 0.01 moi virus dozu ile enfekte edildi. İnokulasyonu izleyen 3. günden itibaren %90 oranında CPE gözlenen flasklar donduruldu. Daha sonra çözülerek, 8.000 g'de 30 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonunda her virus için süpernatant kısım ayrıştırılarak +4°C'ye kaldırıldı. Pelletler 2mM Tris-HCl tamponu yardımıyla resüspanse edilerek -80°C'de donduruldu. Virus çoğalmasını izleyen dönemde BT virusunun %80'inin hücreye bağımlı olması sebebiyle, santrifüjle elde edilen enfektif hücre pelletlerine üç kez dondur ve çöz işlemi yapıldı. Son dondur-çöz işleminden sonra hücre kültürü vasatı vortekslenerek +4°C'de 8.000 g'de 30 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant kısım ayrıştırılarak, ilk santrifüj sonrasında toplanan süpernatantlara ilave edildi. Virus konsantrasyonu için Polietilenglikol (PEG) 6000'in 1mM Tris-HCL içindeki %30'luk çözeltisi hazırlandı. Her virus için ayrı ayrı toplanan süpernatantlara PEG solüsyonu damla damla ilave edilerek 30 dakika süreyle +4°C'de manyetik karıştırıcı üzerinde karışmaya bırakıldı. Aynı ortamda 1 gece bekletilen süpernatantlar, süre sonunda 8.000 g'de 30 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant kısım atıldı. Dibe çöken pellet, 2mM Tris-HCl tamponuyla orijinal virus hacminin 1:50'si olacak şekilde resüspanse edilerek porsiyonlandı. Elde edilen konsantre virusun titresi tekrar plak test ile kontrol edildi.

2.2.3.2.2. Hiperimmunizasyon

PEG 6000 ile konsantre edilen referans viruslar (BTV-9 ve BTV-16) ve aşı suşu BTV-4'den yaklaşık 10^4 POU/ml doza tekabül edecek hacimlerde (0.5-0.8 ml) alınarak eşit hacimde Freund's complete adjuvanı (Sigma-Aldrich, USA) ile karıştırıldı. Elde edilen emülsiyon insülin enjektörleri ile tavşanların traşlanmış sırt derisi altına (s.c.) 5-6 noktadan inokule edildi. Onbeş gün ara ile tekrarlayan 4 inokulasyonu izleyen 15. gün alınan kan örneklerinin serum fraksiyonu ayrıldıktan sonra ısı ile inaktivasyonu yapıldı. Elde edilen serumlardaki serotip spesifik antikorların varlığı nötralizasyon testi ile araştırıldı. İnokulasyon gruplarının oluşumu ve inokulasyon şeması Çizelge 2.6'da sunuldu.

Çizelge 2.6. BT virusu tip spesifik hiperimmunserum üretimi amacıyla oluşturulan tavşan grupları ve inokulasyon şeması.

GRUP NO	HAYVAN SAYISI	İNOKULE EDİLEN VİRUS	İMMÜNİZASYON ŞEMASI
I	2	BTV-4	İlgili virusla 15 gün aralıklı 4 inok. (derialtı).
II	2	BTV-9	İlgili virusla 15 gün aralıklı 4 inok. (derialtı)
III	2	BTV-16	İlgili virusla 15 gün aralıklı 4 inok. (derialtı)
IV	2	Kontrol	DMEM ile 15 gün aralıklı 4 inok. (derialtı)

2.2.3.2.3. Serum Nötralizasyon Testi (SNT)

Hiperimmunizasyon sonucu elde edilen anti-BTV4, anti-BTV9 ve anti-BTV16 tavşan serumlarının her birinde BTV-4, BTV-9 ve BTV-16' ya spesifik nötralizan antikorların araştırılması amacıyla Frey ve Liess (1971)' in bildirdiği yöntemle göre makronötralizasyon testi uygulandı.

Bu amaçla, anti-BTV4, anti-BTV9 ve anti-BTV16 tavşan serumları birer tüp içerisinde 1/2 oranında sulandırıldı. Her sulandırmanın üzerine eşit miktarda 100DKID₅₀/ml (tip-4 için 2×10^{-3} /ml, tip-9 için 2×10^{-4} /ml ve tip-16 için 1/15000) oranında sulandırılan BT viruslarından ilave edildi. Tüpler 37°C CO₂'li etüve kaldırılarak, bir saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda her karışımdan 0.2 ml hacimde daha önceden 24 göz hücre kültürü tabletinde üretilen Vero AFFSA

hücrelerine 2'şer adet göze olmak üzere inokulasyon yapıldı. İnokulasyonu izleyen 4-5 gün süresince hücrelerde oluşan sitopatik değişiklikler hücre kültürü mikroskobuyla incelenerek, serumlar antikor varlığı yönünden değerlendirildi.

2.2.3.2.4. Hiperimmün Serumların Serum Nötralizasyon 50 (SN₅₀) Değerinin Mikronötralizasyon Yöntemi ile Saptanması

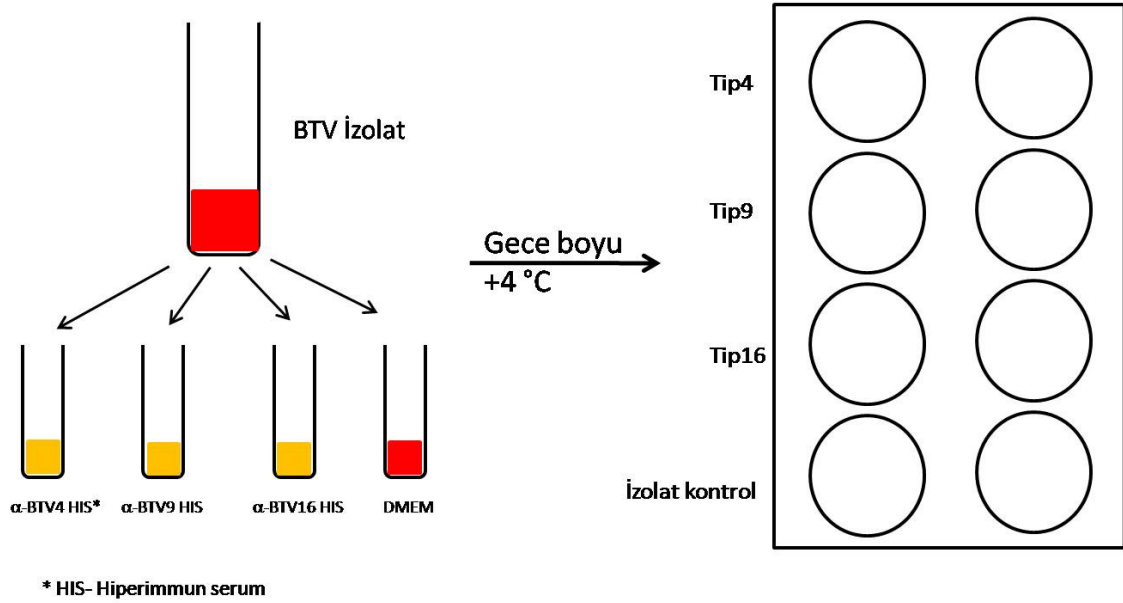
Serotip spesifik antikor taşıdıkları tespit edilen serumlar, saf serumdan (1/1) başlamak üzere 2 katlı olarak sulandırıldı. Bu amaçla mikronötralizasyon tabletinin birinci sırasında her anti serum örneği için iki göz ayrılarak saf serumlardan bu gözlere 0,1 ml konuldu. Altındaki gözlere 0,05 ml Eagle's MEM vasatı konulduktan sonra, birinci sıradan alt gözlere çok kanallı pipet yardımıyla 0,05 ml serum sulandırmaları aktararak, serumların 1/640'a kadar sulandırmaları hazırlandı. Bu işlemten sonra tüm test gözlerine serum sulandırmalarına eşit miktarda 100DKID₅₀/0.05 ml oranında sulandırılan virus serotiplerinden ilave edildi. Virus kontrol için ayrılan gözlere 0.05 ml serumsuz DMEM, 0.05 ml 100DKID₅₀ oranında sulandırılmış ilgili virus serotipi, hücre kontrol için ayrılan gözlere ise 0,1 ml serumlu DMEM konuldu. Tabletler 37°C lik CO₂'li etüvde bir saat süreyle nötralizasyon için inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda tablet gözlerine Vero hücre süspansiyonundan (300.000 hücre/ml) 0.05 ml konuldu. Tabletler 37°C' lik CO₂' li etüve kaldırılarak, tabletlerin gözlerindeki hücrelerde oluşan sitopatik değişiklikler 4-5. günde doku kültürü mikroskobu ile değerlendirildi.

2.2.3.2.5. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT)

Virusların PRNT ile serotipik tanısı için, her izolat titresini oranında sulandırıldıktan sonra tavşanların hiperimmunizasyonu ile elde edilen her üç serotipe ait serumlarla nötralize edilerek daha önceden hazırlanan VeroAFFSA hücrelerine inokule edildi. Bu genel strateji doğrultusunda, BT izolatları, iki farklı şekilde sulandırıldı; ml'de 500 ve daha yüksek plak sayısına sahip BTV izolatları 200 pfu/0,2 ml olacak şekilde sulandırılırken, ml'de 500 virus partikülünden daha az virus içeren izolatlar PRN testine titre değerleri oranında sulandırılarak dahil edildi. Daha sonra 0,25 ml hacimdeki virus sulandırmalarının üzerine eşit hacimde ve SN₅₀ titresini oranında sulandırılmış o serotipe spesifik hiperimmün tavşan serumu konularak, karışım +4°C'de gece boyunca inkube

edildi. İnkubasyon süresi sonunda 200µl hacimde karışım daha önceden 24 göz hücre kültürü tabletinde üretilen Vero AFFSA hücrelerinin 2 adet gözüne inokule edildi ve 1 saat süreyle 37°C’de inkube edildi. Süre sonunda hücrelerin yüzeyi yaklaşık 1,5 ml hacimde %3,2 CMC içeren DMEM ile kaplanarak, test ileri inkubasyona alındı. İnokulasyonu izleyen 4-5. günde hücreler %10 formol ile fikze edildi ve kristal viole ile boyandıktan sonra, test gözlerinde oluşan plaklar sayıldı. Test kontrol ve nötralizasyon uygulanan tablet gözlerindeki veriler ile karşılaştırıldı. Değerlendirme yapılırken, test sonu plak sayısı teste alınan plak sayısının yarısı veya daha azı olarak tespit edilen reaksiyonlar pozitif olarak değerlendirildi. PRNT’nin yapılışına ilişkin şematik anlatım Şekil 2-1.’de sunuldu.

Şekil 2.1. PRN testinin uygulamasına ilişkin ana basamaklar.

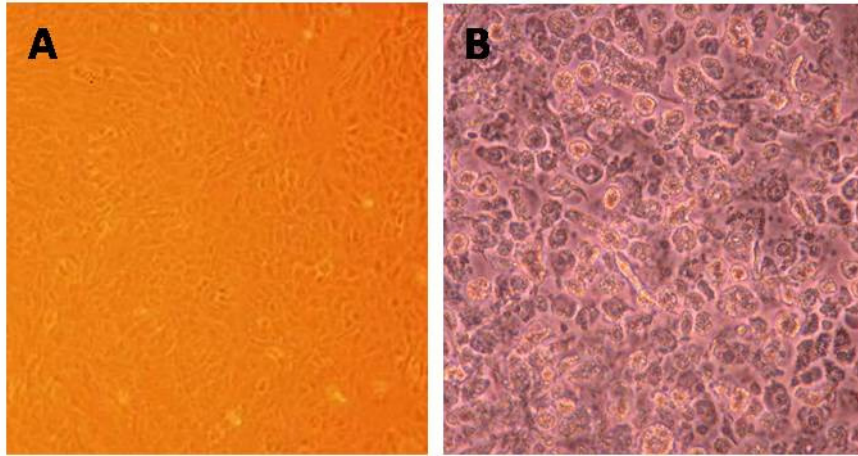


3. BULGULAR

3.1. Virolojik Çalışma

3.1.1. Hücre Kültürü İnokulasyonu

Son nokta sulandırma tekniğiyle Vero AFFSA hücre kültürüne inokule edilen 26 adet izolattan 21 tanesinde, 4-5 günlük inkübasyon süresi sonunda hücre kültüründe meydana gelen intrastoplazmik ve intra nükleer inklüzyon cisimcikleri ile karakterize CPE saptandı. İzolatlardan 5 adedinde (TR13-17) yapılan 3 kör pasaja karşın, diğer izolatlarda tanımlanan özellikte CPE gözlenmedi. Vero AFFSA hücre hatlarında saptanan CPE ve hücre kontrole ait görüntüler sırası ile Şekil 3.1.'de sunuldu.



Resim 3.1.(A) Hücre Kontrol (Normal, x400) (B) Hücre kültüründe BTV-9 üremesi sonucunda 72. saatte oluşan CPE (Faz kontrast, x600)

3.1.2 . Virusların Enfeksiyözite Gücü

Plak titrasyon testi sonucunda 21 virus izolatının enfeksiyözite güçleri plak oluşum ünitesi (POÜ/ml) şeklinde hesaplandı. İzolatlara ait enfektivite değerleri Çizelge 3.1. de sunuldu.

Çizelge 3.1. BTV izolatlarının yapılan plak titrasyon sonrası elde edilen enfektivite değerleri.

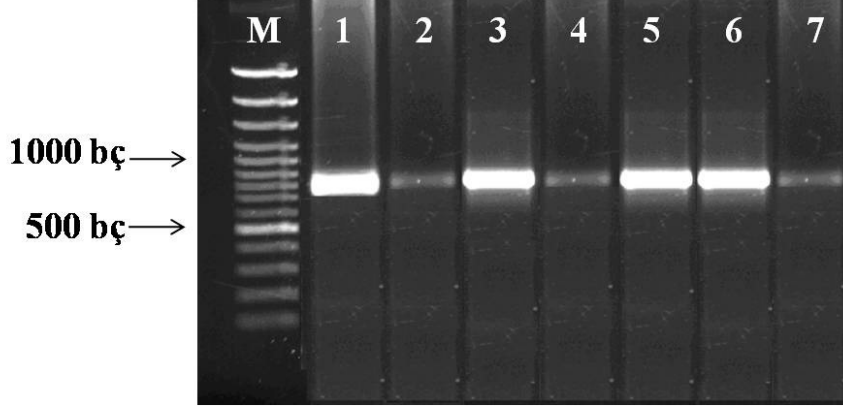
İZOLAT NO	İnfektivite (POÜ/ml)	İZOLAT NO	İnfektivite (POÜ/ml)
TR-1	$7,5 \times 10^4$	TR-14	-
TR-2	5×10^3	TR-15	-
TR-3	400	TR-16	-
TR-4	100	TR-17	-
TR-5	2	TR-18	500
TR-6	100	TR-19	$7,5 \times 10^3$
TR-7	350	TR-20	300
TR-8	180	TR-21	250
TR-9	250	TR-22	$1,5 \times 10^3$
TR-10	$7,5 \times 10^3$	TR-23	750
TR-11	$4,5 \times 10^3$	TR-24	8
TR-12	200	TR-25	20
TR-13	-	TR-26	475

3.2. Moleküler Virolojik Tekniklerle Serotipik Karakterizasyon

3.2.1. Jenerik Reverz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (jRT-PZR)

BTV izolatlarından Vero AFFSA hücre kültüründe üretilen 21 adetinin 10 nolu RNA segmentine ait cDNA kalıp olarak kullanılmak suretiyle BTV-Gen/10/F ve BTV-Gen/10/R primer çiftleri ile jRT-PZR'ye tabi tutuldu. İzolatların tümünde BTV nükleik asit pozitifliği saptandı. jRT-PZR test sonucuna ait jel görüntüsü Resim 3.2'de gösterildi. Vero AFFSA hücrelerine yapılan tekrarlayan inokulasyonlara rağmen CPE gözlemlenmeyen izolatların (TR 13-17) jRT-PZR tekniği ile kontrolünde, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarafından BHK-21 hücre kültürlerinde yapılan pasajlarına ait hücre sıvıları kullanıldı. Yapılan jRT-PZR sonrasında istenilen büyüklüğe (822 bp) sahip spesifik bantlar elde edildi.

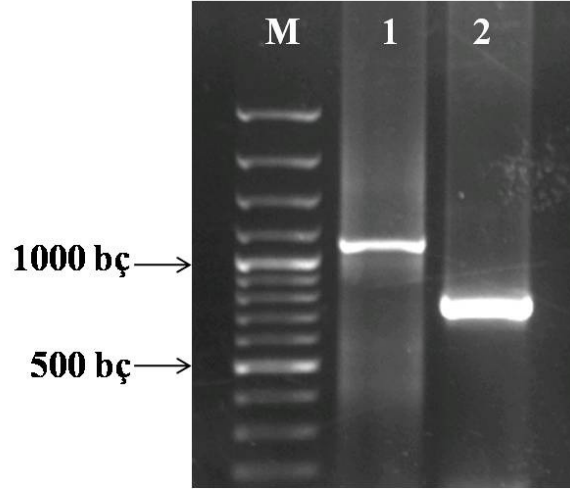
Şekil 3.2. Jenerik RT-PZR sonuçları. M: 100 bç DNA Merdiveni (Fermentas, Litvanya); Hat 1- 7: BTV saha izolatlarına ait RT-PZR DNA ürünleri (822 bç).



3.2.2. Serotip Spesifik Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (sRT-PZR)

Vero hücre kültürüne adapte edilebilen BTV saha izolatları, BTV-2, BTV-4, BTV-9 ve BTV-16 tip spesifik primer çiftleri kullanılarak sRT-PZR tekniğiyle amplifiye edildi. İzolatların hiçbirinde BTV-2 ve BTV-4 tip spesifik primer çiftleri ile yapılan reaksiyonlardan istenilen bölgeye ait DNA ürünü çoğaltılamadı. BTV-9 tip spesifik primer çiftleri ile yapılan sRT-PZR sonucunda 19 saha izolatında istenilen büyüklükte ampikon elde edildi. BTV-16 tip spesifik primer çiftleri ile yapılan sRT-PZR sonucunda ise 1 saha izolatı (TR-18) BTV-16 olarak serotip düzeyinde identifiye edildi (Çizelge 3.2). Diğer taraftan bir adet izolat (TR-23) yapılan sRT-PZR uygulaması sonucunda hedeflenen izolatlardan herhangi birisi olarak identifiye edilemedi. Serotip spesifik RT-PZR test sonucuna ait jel görüntüsü Resim 3.3’de gösterildi.

Şekil 3.3. Serotip Spesifik RT-PZR sonuçları. M: 100 bç DNA Merdiveni (Fermentas, Litvanya); Hat 1: BTV-9 DNA ürünü (1128 bç); Hat:2 BTV-16 DNA ürünü (762 bç).



Çizelge 3.2. Araştırmada kullanılan BT virus izolatlarının jRT-PZR ile sRT-PZR/PRNT'nin karşılaştırmalı sonuçları.

İZOLAT NO	jRT-PZR	sRT-PZR / PRNT			
		BTV-2	BTV-4	BTV-9	BTV-16
TR-1	+	-/-	-/-	+/+	-/-
TR-2	+	-/-	-/-	+/+	-/-
TR-3	+	-/-	-/-	+/+	-/-
TR-4	+	-/-	-/-	+/+	-/-
TR-5	+	-/-	-/-	+/+	-/-
TR-6	+	-/-	-/-	+/+	-/-
TR-7	+	-/-	-/-	+/+	-/-
TR-8	+	-/-	-/-	+/+	-/-
TR-9	+	-/-	-/-	+/+	-/-
TR-10	+	-/-	-/-	+/+	-/-
TR-11	+	-/-	-/-	+/+	-/-
TR-12	+	-/-	-/-	+/+	-/-
TR-13	+	TE	TE	TE	TE
TR-14	+	TE	TE	TE	TE
TR-15	+	TE	TE	TE	TE
TR-16	+	TE	TE	TE	TE
TR-17	+	TE	TE	TE	TE
TR-18	+	-/-	-/-	-/-	+/+
TR-19	+	-/-	-/-	+/+	-/-
TR-20	+	-/-	-/-	+/+	-/-
TR-21	+	-/-	-/-	+/+	-/-
TR-22	+	-/-	-/-	+/+	-/-
TR-23	+	-/-	-/+	-/-	-/-
TR-24	+	-/-	-/-	+/+	-/-
TR-25	+	-/-	-/-	+/+	-/-
TR-26	+	-/-	-/-	+/+	-/-

TE: Test edilmedi

3.3. Serolojik Çalışma

3.3.1. Serum Nötralizasyon Testi

Makronötralizasyon testleri sonucu hiperimmün tavşan serumların her birinde, sadece hiperimmunizasyonda kullanılan serotip spesifik antikor varlığı belirlendi.

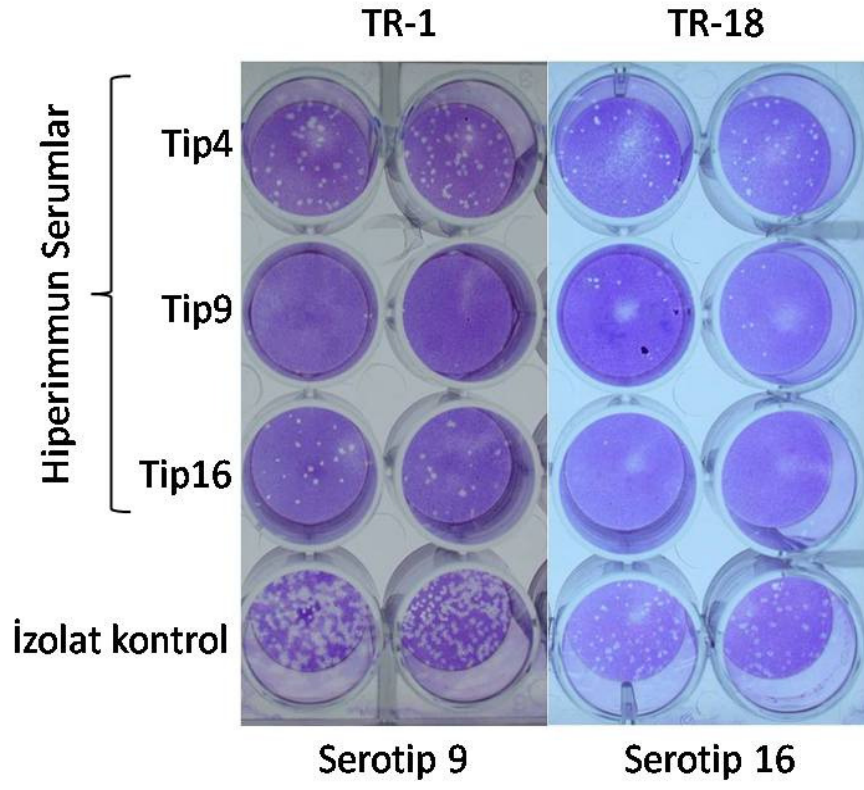
3.3.2 Hiperimmün Serumların Serum Nötralizasyon 50 (SN₅₀) Değeri

Tavşanlardan sağlanan her bir serotip spesifik hiperimmün serum antikor titresi 1/10 olarak saptandı.

3.3.3 Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT)

İnokulasyonu izleyen 5. günde hücreler fikze edilerek, kontrol ve nötralizasyon uygulanan gruplardaki plaklar sayıldı ve elde edilen sonuçlar birbiriyle karşılaştırıldı. BTV-9 spesifik hiperimmün tavşan serumu ile 19 adet saha izolatının enfeksiyözitesinin en az %50 oranında bloke edildiği tespit edildi. Böylelikle bu izolatların BTV-9 olarak serotipik identifikasyonu yapıldı. Serotip spesifik RT-PZR çalışmalarında hiçbir DNA ürünü elde edilemeyen bir adet izolat (TR-23), PRNT ile serotip 4 olarak identifiye edilirken, 18 nolu izolat (TR-18) PRNT ile serotip 16 olarak identifiye edildi. Çalışmada serotipik tanı için PRNT testine tabi tutulan iki adet izolata (TR-1 ve TR-18) ait test sonucunu gösteren resim Şekil 3-4’de sunuldu.

Şekil 3.4. PRNT ile serotipik identifikasyonu yapılan iki izolata ilişkin plak görünimleri.



4. TARTIşMA

BT hastalığı, Türkiye'nin de içinde yer aldığı Akdeniz ukuru ülkelerinde, ruminant türleri yetiştiriciliklerinde önemli kayıplara neden olan bir Arbovirus enfeksiyonu olarak dikkati çekmektedir. BTV, Reoviridae ailesinin orbivirus cinsinde Bluetongue virus grup içerisinde sınıflandırılmış olup, 24 serotipi vardır (Roy, 2002).

'Biting-Midges (Sokucu sinekler)' olarak isimlendirilen Culicoides'lerin 1000 kadar türü identifiye edilmiş ve yapılan çalışmalar ile 57 türün Türkiye'de varlığı tespit edilmiştir (Dik, 1997). Türkiye'de C.imicola'nın BT enfeksiyonunu nakleden temel vektör olduğu bildirilmiştir (Mellor, 1995).

BTV' nin hemotopoetik, retiküloendotelial dokulara ve özellikle endotelial hücrelere özel bir affinitesi vardır (Murphy ve ark., 1999). Özellikle bazı organ ve küçük kan damarları ile bunların dallarına afinite gösterir. Bu afinitenin sebebi tam olarak anlaşılamamakla birlikte, endotel hücreleri arasındaki fark ve virusun spesifitesine bağlanmaktadır (Erasmus, 1990).

BT hastalığının, kan emen vektör arthropodlarla naklediliyor olması yanında, ülkemizde belirlenen tip 2, 4, 9 ve 16 olmak üzere 4 farklı serotipinin bulunması sebebiyle diğer virus enfeksiyonlarından farklı epidemiyolojik özelliklere sahiptir. Bu durum enfeksiyonun varlığı ve seyrinin serotip düzeyinde sürekli ve çok sratlı takibini gerekli kılmaktadır.

Bu çalışmada, ülkemizde seyreden BTV serotiplerinin rutin moleküler tanısına yardımcı olacak jenerik ve tip spesifik primerlerin dizayn edilmesi, bunların tanısıl işlevlerinin karşılaştırılması ve güvenilir in-house RT-PZR tekniğinin standardize edilmesi amaçlanmıştır.

Bu alışmada, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünce izole edilen ve daha önce ortak bir proje

kapsamında (TÜBİTAK, TOVAG-105O241) Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı virus koleksiyonuna katılan 26 adet BT virusu kullanıldı. Söz konusu viruslar, 1998-2005 yılları arasında Türkiye'nin değişik bölgelerindeki BT şüpheli klinik olgulardan alınan örneklerin, bir pasaj embriyolanmış tavuk yumurtası (ETY) inokulasyonu sonrasında, Ag-Capture ELISA tekniği ile ön identifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

BT enfeksiyonun 1924 yılından beri Kıbrıs' ta görüldüğü, 1943 yılında BTV-3 ve sınıflandırılmayan diğer bir tip ile meydana gelen epidemilerin oluştuğu ortaya konulmuştur. 1969 yılında serolojik olarak belirlenen tip-4 daha sonra virusun izolasyonu ve identifiye edilmesiyle doğrulanmıştır (Sellers, 1975).

Uzun bir süre Türkiye' de varlığı bildirilmeyen BT enfeksiyonu 1977 yılının Ekim ayında Aydın ve çevresindeki 7 ilde görülmüştür. Başlangıçta tam olarak tanımlanamayan enfeksiyon Kasım ayında 12 ile daha sığramış, 400 koyunun hastalanmasına ve bunların yarısının ölümüne neden olmuştur. Yapılan klinik gözlemler, patolojik bulgular ve laboratuvar çalışmaları sonucunda enfeksiyonun etkeni BT tip-4 olarak identifiye edilmiştir. Daha sonraki yıllarda İzmir, Manisa ve Balıkesir yörelerinde tekrar ortaya çıkan BT enfeksiyonu 600 koyunun hastalanmasına ve bunların %25'inin ölümüne; Çanakkale, Kocaeli, Denizli ve Antalya'da çıkan BT salgını 500 koyunun hastalanmasına ve bunların %20' sinin ölümüne yol açmıştır (Urman ve ark., 1979; Yonguç ve ark., 1982).

Türkiye' de BT enfeksiyonu ile ilgili olarak yapılan birçok çalışmada (Bolat, 1986; Hazıroğlu, 1987; Girgin ve Yonguç, 1988; Öztürk ve ark., 1990; Burgu ve ark., 1992; Ertürk, 1994; Mellor ve ark., 1995; Özgünlük, 2003; Yıldırım, 2003) sığır, koyun ve keçi populasyonlarında enfeksiyonun yaygın olarak bulunduğu ortaya konulmuş olup; bu çalışmalarda Türkiye'nin değişik bölgelerinde BTV-4 seroprevalansı koyunlarda %0-100, keçilerde %2,8-50 ve sığırlarda da %0-75,21 oranları arasında bildirilmiştir. Karaoğlu ve ark. (2003) Trakya bölgesinde 5 ile bağlı 21 ilçe/köyden örneklenen 557 adet sığır serumunda BT enfeksiyonunun seroprevalansını % 94.8- 97.5 olarak tespit etmiştir. Bulut ve ark. (2006) Konya bölgesinden 562 adet koyun ve keçi kan serumu

örneği toplamışlardır; BT enfeksiyonun seroprevalansını ELISA testi ile koyun ve keçilerde sırasıyla sonucunda koyun ve keçilerde sırasıyla %14.4 ,%60; SN testi ile sırasıyla %13.9 ile %53.5 oranında belirlemişlerdir. Gür (2008) 82 adet kursaklı ceylan (*Gazella subgutturosa subgutturosa*), 684 adet koyun ve 100 adet sığır kan serumunu yaptığı C-ELISA testi ile kontrol etmiş; C-ELISA sonucunda kursaklı ceylan, koyun ve sığırlarda BT seropozitiflik oranlarını sırasıyla %40.2, %29.5 ve %88 olarak bulmuştur.

Türkiye’de varlığı 1944 yılından beri bilinen bu enfeksiyonla ilgili yakın zamanda yapılan izolasyon çalışmaları, BTV-4 dışındaki bazı serotiplerin de mevcut olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle Ege Bölgesi ve Trakya’da 1998-2001 yılları arasında gözlenen salgınlardan yapılan izolasyonlar bildirilmektedir. Trakya bölgesinde 1999 yılında yapılan çalışmalarda sahadan izole edilen virus BTV-9 olarak tanımlanmıştır. Mellor ve Witmann (2002), BTV’nin 1998 yılından beri Güney ve Batı Anadolu’ da aktif olduğunu, 2000 yılındaki salgında BTV-16 izolasyonu ve identifikasyonunun yapıldığını bildirmektedir.

BT enfeksiyonunun epidemiyolojisinde rezervuar-vektör-iklim üçlü faktörü önemli olup, özellikle vektörlerin aktif olmadığı dönemde virusun varlığını sürdürebilmesi bir bölgede enfeksiyonun devamlılığında kilit niteliğindedir. Bu konuda birçok bildirim bulunmaktadır. BT enfeksiyonu sığırlarda vireminin 100 gün kadar sürmesi rezervuar olarak sığırları öne çıkartmaktadır. Sığırlardaki vireminin uzun olmasının, hem enfeksiyonun nakli hem de vektörün aktif olmadığı kış aylarında etkenin bir sonraki sezona aktarılmasında önemli rol oynadığı vurgulanmaktadır (Mertens, 1999). Bundan başka, özellikle enfeksiyonun bulunmadığı bölgelere nakledilmesi ya da bölgede enfeksiyonun yayılmasında rüzgarın etkin faktörlerden olduğu bilinmektedir. Rüzgarın şiddeti arttıkça uçuş aktivitesi düşer, ancak rüzgarın etkisi ile çok uzak mesafelere taşınan enfekte vektörler taşıdıkları bölgelerde yeni enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu şekilde bir bölgeden diğerine hatta bir ülkeden başka bir ülkeye enfeksiyonun naklinin mümkün olduğu bildirilmektedir (Sellers ve Pedgley, 1985). Bu durum enfeksiyonun varlığı ve seyrinin serotip düzeyinde sürekli ve çok süratli takibini gerekli kılmaktadır. Uygulamada virusların izole edilebilmesine rağmen serotipik identifikasyonun gerçekleştirilememesi ve hatta bu konuda uluslararası referenz

laboratuarlara bağımlı olunması, söz konusu takibin sağlıklı bir şekilde yapılmasını engelleyen en önemli olumsuzluk olarak karşımıza çıkmaktadır.

BTV izolasyon çalışmalarında farklı hücre kültürlerinin kullanımına ilişkin bildirimler (Bando, 1975; Goldsmit ve ark.,1975; Wechsler ve McHolland, 1988; Erasmus, 1990) bulunmaktadır. BTV'nin saha izolatlarının ilk izolasyon çalışmalarında embriyolu tavuk yumurtasına intravasküler yolla inokulasyonlar yapılmış olup, buradaki izolasyon başarısının BHK-21 ve Vero hücreleriyle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Goldsmit ve ark., 1975). Benzer şekilde virusun üretilmesinde en hassas hücre kültürünün BHK-21 olduğu bildirilmektedir (Bando, 1975). Bu temel bilgiler ışığında, araştırmamızda Vero hücrelerine adapte etmeye çalıştığımız BTV saha izolatlarının birim hacimdeki enfektif virus partikülü sayısını ifade eden plak sayıları dikkate alındığında, izolatlar genelinde elde edilen viral enfektivite düşüklüğünün virus-hücre (Vero) uyumsuzluğu veya adaptasyonu sorunundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Wechsler ve McHolland (1988) virusun Madin-Darby Canine Kidney (MDCK), Rainbow Trout Gonad (RTG) ve Gekko Lung (GL) hücrelerinde CPE oluşturmadan ürediğini bildirmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından, BTV'nin, BHK-21, Bighorn Sheep Fetal Tongue (BHFTE), Bovine Turbinatae (BT) ve Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) hücrelerinde sayılması zor, çok fazla sayıda plak oluşturduğunu bildirmiştir. BTV, Vero ve L929 hücrelerinde sayılabilir nitelikte etrafı sınırlı belirgin plaklar meydana getirebilmektedir (Howell ve ark.,1967; Thomas ve Samagh, 1979). OIE tarafından yayımlanan uygulama bültenlerinde ise Vero hücrelerinde CPE'nin görülmesi için 5 günlük inkubasyon süresinin yeterli olduğu bildirilmektedir (Anon., 2004a). Ancak bu araştırmada inokulasyon sonrası BTV izolatları için uygulanan inkubasyon süresi en az 6 gün olarak kaydedilmiştir. Bu bulgunun mevcut Vero hücrelerinin kullanıldıkları yüksek pasaj sayısı nedeniyle, BTV üremesine beklenen desteği verememesinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada OIE önerisine göre gerçekleştirilen virus izolasyon çalışması sonucunda 26 adet saha izolatının 21 adedinde değişik derecelerde CPE oluşmasına

rağmen, 5 adet saha izolatında CPE oluşumu gözlenmemiştir. Ancak CPE gözlenmeyen 5 adet saha izolatlarında jRT-PZR testi sonucunda BTV nükleik asiti saptanmıştır. Bu veri BTV enfeksiyonu tanısında RT-PZR testinin virus izolasyonu ile karşılaştırıldığında yüksek duyarlılıkta olduğunu bildiren birçok çalışma ile (Akita ve ark.,1992; Gard ve ark., 1992; Shad ve ark., 1997; Clavijo ve ark., 2002; Mann ve ark., 2003; Zientara ve ark.,2003; 2004; 2006) paralellik göstermektedir.

Bu araştırmada NS3 bölgesini kodlayan segment 10 dizinleri kullanılarak serotip düzeyinde olmaksızın tüm BT saha viruslarının nükleik asit varlığını söylemek mümkün olabilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda NS3 proteininin konak bağımlı olduğu ve özellikle insekt hücrelerinde replikasyonu tamamlayıcı ve esansiyel bir faktör olarak görev aldığı, özellikle memelilerden BT virusunun tespiti için ise uygun bir hedef olmadığı belirtilse de (Guirakhoo ve ark., 1995) çalışmamızda bunun tam tersine tüm virus izolatlarında bu bölge çoğaltılabilmektedir. Bu durum muhtemelen söz konusu segmentin tüm nükleotid dizisinin (822 bç) hedeflenmesinden kaynaklanmaktadır.

Diğer taraftan son yıllarda yapılan çalışmalarda (Maan ve ark., 2007; Özkul ve ark., 2009) Seg-10'un bütünüyle çoğaltılmasının daha sonra bu DNA ürünlerine yapılacak dizin analizi ve filogenetik değerlendirmelerle (özellikle Neighbor Joining analizi), BT virus izolatlarının topotipinin ortaya konulmasına katkısı olabilecektir. Bu noktada araştırmamızda kullanılan izolatların daha önce bir başka araştırma projesi kapsamında (TOVAG 1050241) yapılan filogenetik incelenmesinde ağırlıklı olarak batı grubu BT virusları arasında yer aldığı da ortaya konulmuştur (Özkul ve ark., 2009)

Araştırmada kullanılan saha izolatlarının tip spesifik primerlerle sRT-PZR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Saha izolatlarının 19 adedi BTV-9 olarak tanımlanmıştır. Araştırmada kullanılan tüm izolatların BTV-2 ve BTV-4 primeri ile yapılan sRT-PZR sonucunda beklenen büyüklükte ampliconlar elde edilememiştir. Bu sonuçların ışığında, örneklerin toplandığı 1998-2005 yılları arasındaki dominant serotipin BTV-9 olduğu ileri sürülmektedir. Bu değerlendirme ülkemize komşu ve batısında yer alan coğrafyalarda aynı dönemlerde yaşanan BT salgınlarına ilgili raporlarla (Nikolakaki ve ark., 2005) tamamen uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan virusların izole edildiği tarihler ve coğrafi bölgeler itibariyle, ülkemizde BTV-2'nin bulunmadığı görülmüştür. Yukarıdaki değerlendirmeden yola çıkıldığında, ülkemizdeki BT enfeksiyonlarından büyük oranda sorumlu olan BTV-9'un daha çok Ege'den izole edildikleri görülmüştür. Her ne kadar izolat sayısı az olsa da BTV-4 ve BTV-16 olarak serotiplendirmesi yapılan virusların Güney ve Güney Batı Akdeniz bölgelerinden izole edildikleri tespit edilmiştir. Bu bulgular ile BTV-9 ve BTV-16'nın çoğunlukla batı coğrafyamızla paylaşımında (Nikolakaki ve ark., 2005) BTV-4'ün ise doğu coğrafyamızla (Özkul ve ark., 2009) paylaşımında olduğu ileri sürülmektedir.

BTV enfeksiyonunun indirekt teşhisi için çeşitli serolojik testlerden yararlanılır. ELISA, CF ve AGID yöntemleri grup spesifik antikorların tespiti, SN, IFAT, B-ELISA ise tip spesifik antikorların tespitine yönelik olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Boulanger ve ark., 1967; Pearson ve Jochim, 1979;; Herniman ve ark., 1983; Anderson, 1984; Jochim, 1985; Luedke, 1985; Afshar ve ark., 1992; Luedke, 1992; Calisher, 1992; Pearson ve ark., 1992). Bu araştırmada, Ankara Üniversitesi Viroloji Anabilim Dalı stoklarında bulunan 3 referans serotip (BTV-4, BTV-9 ve BTV-16) kullanılarak tavşanlar hiperimmünize edilmiş ve elde edilen serumlar kullanılmak suretiyle, özellikle moleküler tanı sistemlerine sahip olmayan teşhis laboratuvarlarının kullanabileceği, PRNT'nin BT viruslarının serotip ayırımındaki etkinliği değerlendirilmiştir.

PRNT ortak grup antijenlerinin ileri benzerliği nedeniyle ELISA ve Virus Nötralizasyon Testi gibi serolojik testlerle tür bazında tanısının konmasının mümkün olmadığı virus enfeksiyonlarında halen başarıyla kullanılmaktadır (Gordon ve ark., 1992; Özkul ve ark., 2006). Bu konuda özellikle Bunya-, Flavi- ve Togavirus ailelerinde yeralan arbovirus enfeksiyonlarının tanısı amacıyla referans teknik olarak kullanılmaktadır (Gordon ve ark., 1992; Ulloa ve ark., 2003). Bu çalışmalara benzer şekilde, araştırmamızda da BTV serotiplerinin tanısında PRNT, virusların hücreye adapte edilip üretilmediği şartta, başarıyla kullanılmıştır. Bu tekniğe ilgili yapılan nihai değerlendirmede, PRNT'nin en önemli dezavantajı olarak virusların bu teknikle tanısal ayırımına gitmeden önce mutlak suretle viral izolasyonunun ve takiben hücre kültürüne adaptasyonunun tamamlanmasının zorunluluğu tespit edilmiştir.

Tavşan immunizasyonunda kullanılan virusların PEG-6000 ile konsantre edilmeleri ve tavşanlarda 8 haftaya varan inokulasyonlara rağmen serotiplere karşı yüksek nötralizasyon antikor titresi elde edilememiştir. Oysa ki daha önce yapılan bir çalışmada, benzer konsantrasyon işlemi ile, koyunlarda inokulasyon sonrası aktif enfeksiyonuna karşı bağışıklık sağlayabilecek düzeyde antikor oluşumu bildirilmiştir (Ramakrishnan ve ark., 2006). Bu araştırmada düşük titreli antikor elde edilmesinin olası nedenleri arasında i-) tavşanların uygun bir hayvan modeli olmaması veya ii-) virusun inokulasyon öncesi daha ileri düzeyde purifikasyona ihtiyaç duyabileceği üzerinde ağırlıkla durulmaktadır.

Araştırmada kullanılan 26 saha izolatının PRNT ile 19 adedi BTV-9 ve 1 adedi BTV-16 olarak serotip düzeyinde identifiye edildi. BTV-4 spesifik primerleri ile beklenen büyüklükte DNA ürünü elde edilemeyen bir adet izolatın (TR-23) PRNT ile serotip düzeyinde identifikasyonları yapılabilmektedir. Bu durumun ağırlıklı olarak sRT-PZR uygulamasına ilgili bir olumsuzluğa bağlı olabileceği üzerinde durulmaktadır. Söz konusu izolatın PRNT ile serotip 4 olarak identifiye edildiği göz önüne alındığında, aynı izolatın sRT-PZR ile tanısında çoğaltılması beklenen 2324 nükleotit uzunluktaki genomik cDNA'yı çevreleyen olası primer dizinlerinin, VP2'nin en değişken amino (NH-) ve karboksi (-COOH) terminallerine denk geldiği görülmektedir. Hedef DNA'yı çoğaltmak için tasarlanan primerlerin Akdeniz çukuru izolatlarına ait dizinlerden elde edilmiş olması da dikkate alındığında, BTV-4 primerlerinin yerel izolatlarla ilgili hedef cDNA üzerinde beklenen komplementer dizinleri bulamadığı ve bu nedenle bu örneğe ilişkin spesifik amplifikasyon elde edilemediği düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda BTV-4 Avrupa izolatları ve aşı suşlarının ayrımında bile farklı primer dizinlerine sahip RT-PZR protokollerinin kullanılması da bu düşüncüyü destekler mahiyettedir (Mertens ve ark., 2007; Zientara ve ark., 2006).

Bu sonuçlar ışığında BTV saha izolatlarının serotipik identifikasyonunda, PRN testinin RT-PZR ile karşılaştırıldığında hemen hemen benzer duyarlılıkta olduğu belirlenmiştir. Böylece, moleküler tanı sistemlerine sahip olmayan teşhis laboratuvarlarında da PRNT ile serotip ayrımının yapılabileceği ortaya konulmuştur.

Ancak böyle bir uygulama, mutlaka virusun izolasyonuna ihtiyaç duymaktadır ki bu özellik PRNT'nin en önemli tanısal dezavantajı olarak değerlendirilmektedir. BT epidemilerinin mevsimselliği ve uçabilen vektörlerle sezon içinde hızlı bir yayılımının söz konusu olduğu göz önüne alındığında, izolasyon olmadan da virusun etkilenen bireylere ait örneklerde yüksek duyarlılıkla ve o oranda süratle tespit edilmesine ihtiyaç vardır. Hastalığın görüldüğü tüm ülkelerde yapılan tanısal hedefli çalışmaların ortak sonucu, RT-PZR uygulamalarının tanısal değerinin artırılması gerekliliğidir. Bu nedenle ülkemizde hastalığın süratli tanısının konması ve dolayısıyla hastalığa bağlı olumsuzlukların önüne geçilebilmesi Eş Zamanlı (real time) RT-PZR gibi floresan boya ile işaretli probler kullanılarak duyarlılıkları artırılmış ileri in vitro amplifikasyon tekniklerinin geliştirilmesi ve kullanımlarının yaygınlaştırılmasına ihtiyaç duymaktadır.

.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmada kullanılan 26 saha izolatının tiplendirilebilen 21 adedi dikkate alındığında, bu izolatlardan 19 adedi BTV-9; 1 adedi BTV-4 ve 1 adedi ise BTV-16 olarak serotip düzeyinde ön tiplendirildiği,
2. 1998-2005 yılları arasında Türkiye'nin değişik bölgelerinde görülen BT enfeksiyonlarından büyük oranda serotip 9'un sorumlu olduğu, bu serotipin ağırlıklı olarak Ege'de bulunduğu, serotip 4 ve serotip 16'nın ise çok düşük prevalansta seyrettiği ve çoğunlukla güney ve güney Anadolu'da bulunduğu,
3. Virusların izole edildiği tarihler ve coğrafi bölgeler itibarıyla Türkiye'de BT serotip 2'nin bulunmadığı,
4. Serotip tayini için kullanılan sRT-PZR ve PRNT'nin hemen hemen benzer duyarlılıkla çalıştığı, bu araştırma için sadece bir izolatın (TR-23) sRT-PZR ile serotipik tanımlamasının yapılamamasına karşın PRNT ile identifiye edildiği, dolayısıyla PRNT'nin serotip identifikasyonunda güvenle kullanılabilecek bir tanısal araç olduğu,
5. Özellikle PRNT'de kullanılan hiperimmün serumlar hazırlanırken, tavşanların ileri düzeyde purifiye edilmiş virus veya viral antijenler ile inokule edilmesi gerekliliği,
6. ETY pasajı sonrasında BT antijeni tespit edilen örneklerin hücre kültürü adaptasyonu için öncelikle BHK-21 hücrelerine inokule edilmesinin, buradaki titre yükselmesi sonrasında bir başka (tercihan Vero) hücre kültürlerine geçilebileceği, aksi taktirde Vero hücrelerinde beklenen titre yükselmesinin zaman alacağı,
7. BT virusunun moleküler tanısı amacıyla öncelikle segment 10 (Seg-10) düzeyinde jRT-PCR yapıldıktan sonra, sRT-PZR ile serotipik ayrıma gidilmesinin uygun bir tanısal sıralama olabileceği,
8. RT-PZR temelli serotiplendirme çalışmalarının etkin laboratuvar ve kullanıcı profillerinde daha verimli olabileceği sonuçlarına varılmıştır.

BTV saha izolatlarının PRNT ile serotipik identifikasyonunda, tanısal ayırıma gitmeden önce virus izolasyonu ve takiben hücre kültürüne adaptasyonun tamamlanması gerekmektedir. BT epidemilerinin mevsimselliği, biyolojik vektör olan insektlerin tamamen elimine edilmesindeki güçlük ve meteorolojik faktörlerin etkisiyle hızlı bir yayılımının olması dikkate alındığında, enfekte bireylerde virus izolasyonu yapılmadan da virusun hızlı ve yüksek duyarlılıkta tespit edilmesi gerekmektedir.

BT hastalığının görüldüğü tüm ülkelerde son yıllarda yapılan tanısal hedefli çalışmaların ortak hedefi, RT-PZR uygulamalarının tanısal değerinin artırılmasına yöneliktir. Bu noktadan hareketle, Eş Zamanlı (real time) RT-PZR gibi floresan boya ile işaretli probler kullanılarak duyarlılıkları artırılmış ileri in vitro amplifikasyon tekniklerinin geliştirilmesi ve kullanımlarının yaygınlaştırılması, ülkemizde BT hastalığının süratli tanısının konmasına ve dolayısıyla hastalığa bağlı olumsuzlukların önüne geçilebilmesine olanak sağlayacaktır.

ÖZET

Yerel Mavidil virusu izolatlarının Plak Redüksiyon Nötralizasyon (PRN) ve Reverz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) teknikleri ile serotipik identifikasyonu

Bu çalışmada 1998-2005 yılları arasında izole edilen yerel BT viruslarının serotipik identifikasyonu amaçlanmıştır. Bu amaç için jenerik ve serotip spesifik RT-PZR sistemleri ile PRN testi tasarlanmıştır. Jenerik RT-PZR segment 10 düzeyinde daha önce bildirilen (Nikolakaki ve ark., 2005) primerler kullanılarak gerçekleştirilirken, sRT-PZR segment 2 düzeyinde ve serotip 2 ve 4 için daha önce Mertens ve ark. (2007) tarafından, serotip 9 ve 16 için ise bu çalışma kapsamında tasarlanan primerler kullanılarak gerçekleştirildi.

jRT-PZR ile araştırma kapsamında çalışılan 26 adet BTV izolatının tamamında Seg-10 spesifik DNA ürünleri elde edilebilmiştir. Diğer taraftan sRT-PZR uygulaması sonunda ise izolatlardan 19 adedi serotip 9 ve 1 adedi serotip 16 olarak identifiye edildi. sRT-PZR sonunda serotip 2 ve 4 primerleri ile herhangi bir DNA ürünü elde edilemedi.

Moleküler identifikasyon verileri kullanılarak PRN testinin ana komponenti olan tip spesifik hiperimmun serumların elde edilmesi için 3 referans virus (BTV-4, BTV-9 ve BTV-16) tavşanlara inokule edildi. İnokulasyon takvimi sonunda hiperimmun serumlarda her 3 virusa karşı 1:10 düzeyinde nötralizan antikor titresi belirlendi. Bu serumlar kullanılarak yapılan PRN testi sonunda 19 izolat BTV-9, 1'er izolat BTV-4 ve BTV-16 olarak identifiye edildi.

Sonuç olarak RT-PZR direkt olarak laboratuvar ve kullanıcı profillerinden etkilense de sRT-PZR ve PRN testleri arasında BT virusu serotiplerinin tanısı açısından benzer duyarlılık tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: BT, serotipik identifikasyon, RT-PZR, PRNT

SUMMARY

Serotypic identification of local Bluetongue virus isolates using Plaque Reduction Neutralization (PRN) and Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Techniques

In this study it is aimed to serotypic identification of local Bluetongue viruses (BTV) isolated between 1998 and 2005. For this purpose, generic (g) and serotype specific (s) RT-PCR systems and Plaque Reduction Neutralization Assay (PRNA) were designed. Generic RT-PCR was performed on segment 10 level using primers designed previously (Nikolakaki et al.). On the other hand, sRT-PCR was carried on segment 2 with primers sets two of which were designed previously by Mertens et al. (2007) while remaining two (BTV-9 and BTV-16) were designed within this study.

At the end of gRT-PCR applications, specific DNA product (822 bp in length) was amplified in all of 26 BTV field isolates. On the other hand, based on sRT-PCR, 19 BTV isolates were identified as serotype 9 and one isolates was found as serotype 16. There was no specific DNA amplification as a result of sRT-PCR.

Using molecular identification data as a main component of PRNA hyperimmun serums against three serotypes (BTV-4, BTV-9 and BTV-16) were produced in rabbits. Neutralizing antibody level in hyperimmun serums for all of three viruses were detected as 1:10. PRNA of field isolates of BTV using hyperimmune serums revealed nineteen BTV-9, one BTV-4 and one BTV-16 serotypic distribution among the isolates.

In conclusion, although RT-PCR is directly influenced by laboratory or user profile, sRT-PCR and PRNA were found in almost similar sensitivity in diagnosing BTV serotypes.

Key words: BT, serotypic identification, RT-PCR, PRNA

KAYNAKLAR

- AFSHAR, A., THOMAS F.C., WRIGHT P.F., SHAPIRO J.L., SHETTIGARA P.T., ANDERSON J. (1987). Comparison of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of bluetongue virus antibodies in serum and whole blood. *J. Clin. Microbiol.*, **25**: 1705-1710.
- AFSHAR, A, THOMAS, F. C., WRIGHT, P. F.(1989). Comparison of competitive ELISA, indirect ELISA and standard AGID tests for detecting bluetongue virus antibodies in cattle and sheep. *Vet Rec* **124**:136-141.
- AFSHAR, A, ANDERSON, J, EATON, B. T. (1991). Serological diagnosis of bluetongue by blocking or competitive ELISA by four laboratories. *J Vet Diagn Invest* **3**: 255-257.
- AFSHAR, A., DULAC, G. C., RIVA, J. (1992). Comparison of blocking dot ELISA and competitive ELISA using a monoclonal antibody for detection of Bluetongue virus antibodies in cattle. *Vet. Mic* **31**: 33-39.
- AKITA, G. Y., CHINSANGARAM, J., OSBURN, B. I., IANCONESCU, M., KAUFMANN, R. (1992). Detection of bluetongue virus serotype by polymerase chain reaction. *J Vet Diag Invest* **4**: 400-405.
- ALEXANDER, K. A., MACLACHLAN, N. J., KAT, P., HOUSE, C., O'BRIEN, S., LERCHE, N. W., SAWYER, M., FRANK, L., HOLEKAMP, K., SMALE, L., MCNUTT, J., LAURENSEN, M., MILLS, M. G. L., OSBURN, B. I. (1994). Evidence of Natural Bluetongue Virus Infection among African Carnivores. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **51**(5): 568-576.
- ANDERSON, J. (1984). Use of a monoclonal antibody in a blocking ELISA to detect group specific antibodies to bluetongue virus. *J. Immunol. Methods.* **74**: 139-149.
- ANON. (1999) Bluetongue in Bulgaria: Additional information. *Off. Int. Epizoot. Dis. Info.* 12, 122.
- ANON. (2004a). Bluetongue. In: *Terrestrial Animal Health Code*, Chapter 2.2.13, article 2.2.13.1. Office Internationale des Epizooties, Paris.
- ANON. (2004b). General principles and surveillance systems for specific diseases, Appendix 3.8.1. General principles for recognising a country or zone free from a given disease/infection. In: *Terrestrial Animal Health Code*, Section 3.8. Office Internationale des Epizooties, Paris.
- ANON. (2004c). SFVO Annual Report 2003. Swiss Federal Veterinary Office, Berne.
- ANON. (2004d). Surveillance fièvre catarrhale du mouton. In: *Bulletin no. 11 Août 2003–Juillet 2004*. Ministère de l' Agriculture, de l' Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales, France.
- ANTHONY, S., MAAN S., SAMUEL A.R., MELLOR P.S., MERTENS P.P.C. (2003). Differential diagnosis of bluetongue virus using a reverse transcriptase-polymerase chain reaction for genome segment 7. *Vet Ital* 2003, 40, 546-551.

- ARADAIB, I. E., SCHORE, C. E., CULLOR, J. S., OSBURN, B. I. (1998). A nested PCR for detection of North American isolates of bluetongue virus based on NS1 genome sequence analysis of BTV-17. *Vet. Microbiol.*, **59**: 99-108.
- ARADAIB, I. E., MOHAMED, M. E., ABDALLA, T. M., SARR, J., ABDALLA, M. A., YOUSOF, M. A., HASSAN, Y. A., KARRAR, A. R. (2005). Serogrouping of United States and some African serotypes of bluetongue virus using RT-PCR. *Vet. Microbiol.* **111**: 145-150.
- BALASURYA U.B.R., NALDER S.A, WILSON W.C., SMYTHE A.B., DE SANTIS, P., ZHANG., N., MACLACHLAN, N. J. (2003). Global isolates of bluetongue virus segregate into region-specific topotypes based on phylogenetic analyses of their NS3 genes, Proceedings of the Third OIE Bluetongue International Symposium 26-29 October 2003, Taormina, Italy.
- BANDO, B. M. (1975) Isolation of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses in cell culture. *Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.* **18**: 163-174.
- BARRATT-BOYES, S.M., MACLACHLAN N.J. (1995). Pathogenesis of bluetongue virus infection of cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **206**: 1322-1329.
- BARROS, C. S., CRUZ, B., LUIS, T. M., RAMOS, F., FAGULHA, T., DUARTE, M., HENRIQUES, M., FEVEREIRO, M. (2009). A DIVA system based on the detection of antibodies to non-structural protein 3 (NS3) of bluetongue virus. *Vet. Microbiol.*, doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.033 (baskıda)
- BEATON, A.R., RODRIGUEZ, J., REDDY, Y. K., ROY, P. (2002). The membrane trafficking protein calpactin forms a complex with bluetongue virus protein NS3 and mediates virus release, *PNAS* 99, pp. 13154-13159.
- BENDER, L.C., LI, H., THOMSON, B.C., MORROW, P.C., VALDEZ, R. (2003). Infectious disease survey of Gemsbok in New Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, **39**: 772-778.
- BLACKSELL, S. D., LUNT R. A. (1993). Serotype identification of Australian bluetongue viruses using a rapid fluorescence inhibition test. *J. Virol. Methods*, **44**, (2-3): 241-250.
- BOLAT, Y. (1986). Elazığ, Diyarbakır ve Şanlıurfa illerinde koyunların mavidil hastalığının yayılması üzerinde serolojik araştırmalar. *S. Ü. Vet. Fak. Derg.*, **1**:103-112.
- BONNEAU, K. R., DEMAULA C. D., MULLENS B. A., MACLACHLAN N. J. (2002). Duration of viremia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus infected cattle and sheep. *Vet. Microbiol.*, **88**: 15-125.
- BOONE, J. D, BALASURIYA, U, B, KARACA, K, AUDONNET, J. C, YAO, J., HE, L., NORDGREN, R., MONACO, R., SAVİNİ, G., GARDNER, I., MACLACHLAN, N. J. (2007). Recombinant canarypox virus vaccine co-expressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep. *Vaccine* **25**(4):672-678.

- BOULANGER, P., RUCKERBAUER, G. M., BANNISTER, G. L., GRAY, D. P., GIRAND, A. (1967). Studies on bluetongue: III Comparison of two complementfixation methods. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, **31**: 166- 170.
- BOWNE, J. G. (1971). Bluetongue Disease. *Advances in Veterinary Science and comparative Medicine*. United States Department of Agriculture, Denver Colorado.
- BOWNE, J. G. (1973). Is bluetongue an important disease in cattle? *J. Am. Vet. Med. Assn.* **163**: 911-914.
- BREARD, E., HAMBLIN, C., HAMMOUMI, S., SAILLEAU, C., DAUPHIN, G., ZIENTARA, S. (2004) The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica, *Res. Vet. Sci.* **77**: 1–8.
- BREWER, A.W., MACLACHLAN N. J. (1992). Ultrastructural characterization of the interaction of bluetongue virus with bovine erythrocytes in vitro. *Vet. Pathol.*, **29**: 356-359.
- BREWER, A.W., MACLACHLAN N. J. (1994). The pathogenesis of bluetongue virus infection of bovine blood cells in vitro: Ultrastructural characterization. *Arch. Virol.*, **136**: 287-298.
- BULUT, O., YAVRU, S., YAPKIÇ, O., ŞİMŞEK, A., KALE, M., AVCI, O. (2006). Serological investigation of Bluetongue virus infection by serum neutralization test and Elisa in sheep and goats. *Bull Vet Inst Pulawy* **50**: 305-307.
- BURGU, İ., URMAN, H. K., AKÇA, Y., MELLOR, P.S., HAMBLIN, C. (1992). Serologic survey and vector surveillance for bluetongue in Southern Turkey. In: *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses*. Proceedings of the second international symposium. Ed: Walton, T.E., Osburn, B.I. CRC Press inc., p: 168-174.
- CABASSO, V. J., ROBERTS, G. I., DOUGLAS, J. M., ZORZI, R., STEBBINS, M. R., COX, H. R. (1955). Bluetongue. 1. Propagation of bluetongue virus of sheep in suckling hamsters. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **88**: 678-681.
- CALISHER, C. H. (1992). Diagnostic procedures for arboviruses. In : *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbivirus*. Ed.: T.E. Walton, B.I. Osburn, CRS Press Inc., Fla., 525-532.
- CHAUHAN, H. C., CHANDEL, B. S., GERDES, T., VASAVA, K. A., PATEL, A. R., KHER, H. N., SINGH, V., DONGRE, R.A. (2004). Seroepidemiology of bluetongue in dromedary camels in Gujarat, India. *Journal of Camel Practice and Research*, **11** (2): 141-145.
- CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann. Biochem.* **162**: 156-159.
- CLAVIJO, A., HECKERT, R. A., DULAC, G. C., AFSHAR, A. (2000). Isolation and identification of bluetongue virus. *J. Viral Methods*, **87** (1-2): 13-23.

- CLAVIJO, A., SEPULVEDA, L., RIVA, PESSOA-SILVA, M., TAILOR-RUTH ES, A., LOPEZ, J. W. (2002). Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. *Vet Rec* **151**: 301-302.
- COAKLEY, W., SMITH, V. M., MAKER, D. (1980). A serological survey for bluetongue virus antibody in Western Australia. *Aust. Vet. J.*, **56**: 487-491.
- COWLEY, J. A., GORMAN, B. M. (1987). Genetic reassortants for identification of the genome segment coding for the bluetongue virus hemagglutinin. *J. Virol.* **61**:2304-2306.
- DANGLER, C. A., DE MATTOS, C. A., DE MATTOS, C. C., OSBURN, B. I. (1990). Identifying bluetongue virus ribonucleic acid sequences by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **28**: 281-292.
- DEMAULA, C. D., LEUTENEGGER C. M., BONNEAU K. R., MACLACHLAN N. J. (2002). The role of endothelial cell-derived inflammatory and vasoactive mediators in the pathogenesis of bluetongue. *Virology*, **29**: 330- 337.
- DE MATTOS C. C., DE MATTOS C. A., OSBURN B. I., MACLACHLAN N. J. (1994). Evolution of the L2 gene of strains of bluetongue virus serotype 10 isolated in California, *Virology* **201**:173-177.
- DELLA-PORTA , A. J., HERNİMAN K. A. J., SELLERS R.F.(1981). A serological comparison of the Australian isolate of bluetongue virus type 20 (CSIRO 19) with blue tongue group viruses. *Vet. Microbiol.*, **6**: 9-21
- DİK, B. (1989). Konya ve çevresinde bulunan Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) türleri üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- DİK, B. (1993). Adana, İçel ve Antalya yörelerinde bulunan culicoides latreille, 1908 (Diptera: Ceratopogonidae) türlerinin tespiti. 8. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 7-10 Eylül, Trabzon
- DİK, B. (1995). Ege Bölgesi Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) türlerinin tespiti. 9. Ulusal Parazitoloji Kongresi. 24-27 Ekim, Antalya.
- DİK, B. (1997). Ceratopogonid'ler ve parazitolojik önemleri. Parazitoloji'de Artropod Hastalıkları ve Vektörler. Ed.: A. Özcel, N. Daldal, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın **13**:111-143.
- DULAC, G. C., C. DUBUC, C., AFSHAR, A., MYERS, D. J., BOUTTARD, A., SHAPIRO, J., SHETTIGARA, P. T. (1988). Consecutive outbreaks of epizootic haemorrhagic disease of deer and bluetongue. *The Vet Rec* **122**: 340.
- EMAU, P., GIRI, S. N., ANDERSON, G. A., STOTT, J. L., OSBURN, B. I. (1984). Function of prostaglandins, thromboxane A2 and histamine in hypersensitivity reaction to experimental bluetongue disease in calves. *Am J Vet Res.*, **45**(9): 1852-1857.
- ERASMUS, B. J.(1975a). Bluetongue in sheep and goats. *Aust. Vet J.*, **51**(4): 165-170
- ERASMUS, B. J.(1975b). The control of bluetongue in an enzootic situation. *Aust Vet J.*, **51**(4):209-210.

- ERASMUS, B. J. (1990). Bluetongue virus. In : Virus infection Of Ruminants . Ed.:Z.Dinter, B. Morein, Amsterdam, The Netherland, p.: 227-237.
- ERTÜRK, A. (1994). Çeşitli serumlarda (sığır, koyun, keçi) mavidil antikorlarının agar-jel presipitasyon testi ile karşılaştırılması. Etlik Vet. Mikrobiol. Derg., **7**(5) : 1-9.
- FENNER, F., BACHMANN, P. A., GIBBS, E. D. J., MURPHY, F. A., STUDDERT, M. J., WHITE, D. O.(1987). Veterinary Virology, Academic Pres. INC. Orlando, Florida. p:582-587.
- FREY, H. R., LIESS, B. (1971). Vermehrungskinetik und verwendbarkeit eines stark zytopathogenen vd-md virusstammes für diagnostischeuntersuchungen mit der mikrotiter-methode. Zbl. Vet. B, **18**: 61-71.
- GARD, G. P. (1984). Studies of bluetongue virulence and pathogenesis in sheep. Technical Bulletin No. 103, Department of Industries and Development, Darwin, Australia.
- GARD, G. P., EATON, B. T., GOULD, A. R. (1992). Virus isolation technology for Australian orbiviruses. In: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbivirus. Ed.: T. E. Walton, B. I., Osburn, Crs. Pres Inc., Fla., 694-700.
- GAYDOS, J. K., STALLKNECHT, D.,KAVANAUGH, D.,OLSON, R.,FUCHS, E. (2002). Dynamics of maternal antibodies to hemorrhagic disease viruses (Reoviridae: Orbivirus) in white- tailed deer. R. J Wildl Dis. **38** (2):253-7.
- GERBIER. G. ,HENDRIKX, P., ROGER, F., ZIENTARA, S., BITEAU-COROLLER, F.,GRILLET, C., BALDET, T., ALBINA, E. (2004). Bluetongue control using vaccines: experience of the Mediterranean islands. Vet. Ital., **40** (4), 611-615.
- GILLESPI E. J.H., TIMONEY, J. F. (1981). Bluetongue. Hagan and Bruners infectious disease of domestic animal. **7**, 653-659.
- GİRGİN, H., YONGUÇ, A. D. (1988). Türkiye’ deki koyunların mavidil hastalığının serolojik, etiyolojik ve patolojik durumu üzerinde araştırmalar. Etlik Vet. Mikrob. Derg., **6**(3):13-24.
- GLEERING, W. A. (1990). The disease and their diagnosis. Emergency Disease of Livestock, 1:22-27.
- GOLDSMIT, L., BARZILAI, E., TARMOR, A. (1975). The comparative sensitivity of sheep and chicken embryos to bluetongue virus and observations on viremia in experimentally infected sheep. Aust Vet J., **51**(4): 190-196.
- GORDON, S. W., TAMMARIELLO, R. F., LINTHICUM, J. K., DOHM, J. D., DIGOUTTE, J. P., CALVO-WILSON, M. A. (1992). Arbovirus Isolations from Mosquitoes Collected During 1988 in the Senegal River Basin. Am. J. Trop. Med. Hyg., 47(6), 742-748.
- GUIRAKHOO, F., CATALAN J. A., MONATH, T. P. (1995). Adaptation of bluetongue virus in mosquito cells results in overexpression of NS3 proteins and release of virus particles, Arch. Virol. **40**, 967–974.
- GUPTA, Y., CHAND, P., SINGH, A., JAIN, N. C. (1990). Dot immunoblotting assay in comparison with enzyme linked immunosorbent assay for the detection of BTV antibodies in sheep. Vet. Microbiol., **22**: 365-371.

- GUSTAFSON, G. A., PEARSON, J. E., MOSER, K. M. (1992). A comparison of the bluetongue competitive ELISA to other serologic tests. In *Bluetongue, African horse sickness and related orbiviruses* (T.E. Walton & B.I. Osburn, eds). Proc. Second International Symposium, Paris, 17-21 June 1991. CRC Press, Boca Raton, 570-574.
- GÜR, S. (2008). A serologic investigation of blue tongue virus (BTV) in cattle, sheep and gazella subgutturosa subgutturosa in southeastern Turkey. *Trop Anim Health Prod* **40**:217-221.
- GÜRTÜRK, S., BURGU, İ., TOKER, A. (1980). Türkiye’ de sığırlarda mavi dil (bluetongue) enfeksiyonu üzerinde araştırmalar. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.* **27**(1-2): 322-330.
- HAMBLIN, C. (2004). Bluetongue virus antigen and antibody detection, and the application of laboratory diagnostic techniques. *Veterinaria Italiana*, **40** (4): 312-320.
- HARDING, M. J., PRUD’HOMME, I., ROLA, J. (1995). Identification of the major North America bluetongue viruses using nucleic acid amplification techniques. *Molec. Cell. Probes*, **9**: 223-231.
- HASSAN, A. (1992). Status of bluetongue in the Middle East and Asia. In : *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbivirus*.Ed.:T.E. Walton, B. I. Osburn, CRS. Press Inc., FLA.,p.: 38-41.
- HASSAN, S., ROY, P. (1999). Expression and Functional Characterization of Bluetongue Virus VP2 Protein: Role in Cell Entry. *Journal of Virology*, Dec., 9832- 9842.
- HAWKES, R. A., KIRKLAND, P. D., SANDERS, D. A., ZHANG, F., LI, Z., DAVIS, R. J., ZHANG, N. (2000). Laboratory and field studies of an antigen capture ELISA for bluetongue virus. *J. Virol. Methods.*, **85**: 137-149.
- HAZIROĞLU, R. (1987). Buzağlarda hydranencephalie olgularında patolojik-anatomik bulgular. *Doktora Tezi. A. Ü. Sağıl. Bilm. Enst. Ankara.*
- HERNİMAN, K. A. J., BOORMAN, J. P. T., TAYLOR, W. P. (1983). BTV in Nigerian dairy cattle herd. Serological studies and correlation of virus activity to vector population. *J. Hyg.*, **90**: 177-193.
- HIRASAWA, T. , ROY, P. (1990). The complete nucleotide sequence of VP5 of a strain of bluetongue virus of serotype 2 isolated in the USA reveals its close relationship with a virus of serotype 1 isolated in Australia. *Virus Research* **15**: 107-112.
- HOFF, G.L., HOFF, D.M. (1976). Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease. A review of these diseases in nondomestic artiodactyles. *J. Zoo. Anim. Med.*, **7**: 26–30.
- HOFFMANN, B., SASSERATH, M., THALHEİM, S., BUNZENTHAL, C., STREBELOW, G., BEER, M. (2008). Bluetongue virus serotype 8 reemergence in Germany, 2007 and 2008. *Emerg Infect Dis.*, **14**:1421– 1423.
- HOURRIGAN, J. L., KLINGSPORN, A. L. (1975a). Epizootiology of bluetongue: The situation in the United State of America. *Aust Vet J.*, **51**(4): 203-208.

- HOURRIGAN, J. L., KLINGSPORN, A. L. (1975b). Bluetongue : The disease in cattle. Aust. Vet. J., **51**: 170-174.
- HOUSE, C., HOUSE, J. A, BEMINGER, M. L. (1990). Detection of bluetongue group-specific antibody by competitive ELISA. J Vet Diagn Invest **2**: 137-139.
- HOWELL, P. G., VERWOERD D. W., OELLERMANN, R. A. (1967). Plaque formation by bluetongue virus. Onderstepoort J. Vet. Res. **34**: 317-332.
- HOWELL, P. G., KUMM, N. A., BOTHA, M. J. (1970). The application of improved techniques to the identification of strains of Bluetongue virus, Onderstepoort J. Vet. Res. **37**: 59-66.
- HOWELL, P. G., VERWOERD, D. W. (1971). Bluetongue virus. Virology Monographs **9**: 37-74.
- HOWERTH, E. W., GREENE, C. E., PRESTWOOD, A. K. (1989). Experimentally induced bluetongue virus infection in white-tailed deer : Coagulation, clinical pathologic and gross pathologic changes. Am.J. Vet. Res. **49**:1906-1913.
- HUÏSMANS, H., ERASMUS, B. J. (1983). Identification of the serotype-specific and group specific antigens of bluetongue virus. Onderstepoort J. Vet. Res. **48**:51-58.
- HUISMANS, H., VAN DIJK, A. A. (1990). Bluetongue virus structural components. Current Topics in Microbiology and Immunology **162**: 21-37.
- HYATT, A. D., ZHAO, Y., ROY, P. (1993). Release of bluetongue virus-like particles from insect cells is mediated by BTV nonstructural protein NS3/NS3A, Virology **193** , pp. 592-603.
- INABA, Y. (1975). Ibaraki disease and its relationship to bluetongue. Aust. Vet. J., **51**: 178-184.
- JEGGO, M. H., WARDLEY, R. C., BROWNLIE, J., (1984). A study of the role of cell-mediated immunity in bluetongue infection in sheep, using cellular adoptive transfer techniques. Immunology, **52**: 403-410.
- JOCHIM, M. M., BARBER, T. L., BANDO, B. M. (1974). Identification of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses by the indirect fluorescent antibody procedure. Proc. 17th Ann. Meeting Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn., 91-103.
- JOCHIM, M. M. (1985). An overview of diagnostics for bluetongue. Prog. Clin. Biol. Res., **178**, 423-433.
- KARAOĞLU, T., ÖZGÜNLÜK, İ., DEMİR, B., ÖZKUL, A., BURGU, İ. (2007). Seroprevalence of culicoides-borne disease in cattle in European Turkey. A.Ü. Vet. Fak. Derg. **54**: 121-125.
- KARSTAD, L., WINTER, A., TRAINER, D. O. (1961). Pathology of epizootic hemorrhagic disease of deer. Am. J. Vet. Res. **22**: 227.

- KARSTAD, L., TRAİNER, D. O. (1967) Histopathology of experimental bluetongue disease of white-tailed deer. *Can. Vet. J.*, 8(11), 440-447.
- KATZ, J. B., ALSTAD, A. D., GUSTAFSON, G. A., MOSER, K. M. (1993). Sensitive identification of bluetongue virus serogroup by a colorimetric dual oligonucleotide sorbent assay of amplified viral nucleic acid. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 3028-3030.
- KIMBERLING, C. V. (1988). Akabane disease. In: Jensen And Swift's Diseases Of Sheep. 3. Baski, Pla., p.: 71-72.
- KNUDSON, D. L. ,MONATH, T. P. (1990) . Orbiviruses. In : Fundamental Virology, Ed.: B. N. Fields, D. M. , Knipe, P. M. Howley, 2th Edition, Lippincott-Raven , Pla., Newyork,USA p.:1405-1433.
- KOWALIK, T. F., LI, J. K. K. (1991). Bluetongue virus evolution: sequence analyses of the genomic S1 segments and major core protein VP7. *Virology* 187, 749-755.
- LE BLOIS, H., MERTENS, P. P. C., FRENCH, T., BURROUGHS, J. N. , ROY, P. (1992). The expressed VP4 protein of bluetongue virus is the guanylyl transferase. *Virology* 189, 757-761.
- LUEDKE, A. J., R. H. JONES, M. M. JOCHIM. (1967). Transmission of bluetongue between sheep and cattle by *Culicoides variipennis*. *Am. J. vet. Res.* 28: 457-460.
- LUEDKE, A. J., JOCHİM, M. M., JONES, R. H. (1977). Bluetongue in cattle: effects of *culicoides variipennis*- transmitted bluetongue virus on pregnant heifers and their calves. *Am J Vet Res*, 38(11): 1687-1695.
- LUEDKE, A. J. (1985). WHO/FAO Working Team Report: Virology. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 178, 665-668.
- LUEDKE, A. J. (1992). Bluetongue, epizootic hemorrhagic disease and ibaraki. In: *Veterinary Diagnostic Virology*. Ed : A. E. Castro, W. P. Heuschele, Boston, p.: 76-79.
- LUNT, R. A., WHITE, J. R., BLACKSELL, S. D. (1988). Evaluation of a monoclonal antibody blocking ELISA for the detection of group specific antibodies to bluetongue virus experimental and field sera. *J. Gen. Virol.*, 69, 2729-2740.
- MAAN, S., MAAN, N. S., SINGH, K. P., SAMUEL, A. R., MERTENS, P. P. C. (2003). Development of reverse transcriptase polymerase chain reaction-based assay and sequencing for typing European strains of bluetongue virus and differential diagnosis of field and vaccine strains. *Vet Ital* 40, 552-561.
- MAAN, S., MAAN, N. S., O'HARA , R., SAMUEL, A. R., MEYER, A. J., RAO, S., MERTENS P. P. C. (2004). Completion of the sequence analysis and comparisons of genome segment 2 (encoding outer capsid protein VP2) from representative isolates of the 24 bluetongue virus serotypes. In *Bluetongue, Part II* (N.J. MacLachlan & J.E. Pearson, eds). *Proc. Third International Symposium, Taormina, 26-29 October 2003*. *Vet. Ital.*, 40 (4), 484-488.
- MAAN, S., MAAN, N.S., SAMUEL, A.R., RAO, S., ATTOUI, H., MERTENS, P. P. C. (2007). Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes, *J. Gen. Virol.* 88, 621-630.

- MACLACHLAN, N.J., OSBURN, B.I. (1983). Bluetongue virus-induced hydranencephaly in cattle. *Vet. Pathol.*, 20:563-573.
- MACLACHLAN, N.J., OSBURN, B.I., STOTT, J. L. (1989). –Is bluetongue virus infection of cattle a truly persistent viral infection? *Proc. US Anim. Hlth Assoc.*, 94, 89-98.
- MACLACHLAN, N.J., BARRATT-BOYES, S.M., BREWER, A.W. (1992). Bluetongue virus infection of cattle. In: Walton T.E., Osburn, B.I., (Eds), *Bluetongue, African Horse Sickness and related Orbiviruses*. pp: 23–33.
- MACLACHLAN, N.J. (1994). The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **17**: 197-206.
- MACLACHLAN, N.J., NUNAMAKER, R.A., KATZ, J. B., SAWYER, M. M., AKITA, G. Y., OSBURN, B. I., TABACHNICK, W. J. (1994). Detection of Bluetongue virus in the blood of inoculated calves: comparison of virus isolation, PCR assay, and in vitro feeding of *Culicoides variipennis*, *Arch. Virol.* **136**: 1–8.
- MACLACHLAN, N, J. (2000). Bluetongue Vaccines in the United States. Erişim: [http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/bluetongue_vaccines_usa.pdf]. Erişim Tarihi: 25 Kasım 2008
- MACLACHLAN, N. J. (2004) Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. *Veterinaria Italiana*, **40** (4): 112-118
- MACLACHLAN, N. J., PEARSON, J.E. (2004). Bluetongue. *Proceedings of the Third International Symposium. Vet Ital* **40** (3): 1-730.
- MAHRT C. R., OSBURN B. I. (1986) Experimental bluetongue virus infection of sheep: Effect of previous vaccination; clinical and immunological studies. *Am J Vet Res* **47**:1191–1197.
- MARSHALL, J. J. A., ROY, P. (1990). High level expression of the two outer capsid proteins of bluetongue virus serotype 10: their relationship with the neutralization of virus infection. *Virus Research* **15**: 189-196.
- MARTİN L., MEYER, A. J., O'HARA R.S, FU, H., KNOWLES, N. J. , MERTENS, P. P. C. (1998). Phylogenetic analysis of African horse sickness virus genome segment 10: sequence variation, virulence characteristics and cell exit, *Arch. Virol.* **14**: 281–293
- MARTYN, J. C, GOULD, A. R, EATON, B. T. (1990). High level expression of major core protein VP7 and the non-structural protein NS3 of bluetongue virus in yeast: use of expressed VP7 as a diagnostic, group-reactive antigen in a blocking ELISA. *Virus Res* **18**:165-178.
- MCCOLL, K. A., GOULD, A. R. (1991). Detection and characterisation of bluetongue virus using the polymerase chain reaction. *Virus Res.*, **21** (1), 180-188.
- MC KERCHER, DG; MCGOWAN, B; HOWARTH, JA; SAITO, J. K. (1953). A preliminary report on the isolation and identification of the bluetongue virus from sheep in California. *J Am Vet Med Assoc.* Apr;122(913):300–301.

- MECHAM J.O. (1993). – Detection of bluetongue virus from blood of infected sheep by use of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay after amplification of the virus in cell culture. *Am. J. Vet. Res.*, **54**, 370-372.
- MECHAM, J. O. (2006). Detection and titration of bluetongue virus in *Culicoides* insect cell culture by an antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Virological Methods* **135**, 269–271.
- MELLOR, P. S., JENNINGS, D. M., HAMBLING, C., BURGU, I., URMAN, H. K., AKÇA, Y., HAZIROĞLU, R., ALKAN, F., YONGUÇ A. D., ÖZKUL, A., EREN, H. (1995). Control of akabane disease and surveillance of bluetongue and ephemeral fever. United Nations Development Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- MELLOR, P. S. (2000). Replication of arboviruses in insect vectors. *J. Comp. Path.*, 123:231-247.
- MELLOR, P. S., WITMANN, E. J. (2002). Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998 – 2001. *Vet J.* 164 (1) : 20- 37.
- MERTENS, P. P., SANGAR, D.V. (1985). Analysis of the terminal sequences of the genome segments of four orbiviruses, *Virology* 140:55-67.
- MERTENS, P. P. C. (1999). Orbiviruses And Coltiviruses. In : *Encyclopedia of Virology*. Ed.: A. Granoff, R. G. Webster, Volum Two, Harcourt Sience and Technology Compony, Academic Press, San Diego Calif. USA. p.:1043-1061.
- MERTENS, P. P. C. (2007). Summary of the molecular epidemiology of Bluetongue virus in Europe since 1998: introductions, origins and movements of individual virus strains. Erişim: http://www.reoviridae.org/dsrna_virus_proteins//ReoID/BTV-mol-epidem.htm. Erişim Tarihi: 12.04.2007
- MERTENS, P. P. C., MAAN, N. S., PRASAD, G., SAMUEL, A. R., SHAW, A. E., POTGIETER, A.C., ANTHONY, S. J., MAAN, S. (2007). Design of primers and use of RT-PCR assays for typing European bluetongue virus isolates: differentiation of field and vaccine strains. *Journal of General Virology*, 88, 2811–2823.
- METCALF, H. E., LOMME, J., BEAL, C.(1980). Estimate of incidence and direct economic losses due to bluetongue in Mississippi cattle during 1979. In: 84th Annual Meeting of United States Health Association, Luisville, Kentucky, USA.
- MOULTON J.E. (1961). Pathology of bluetongue in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 138, 493-498.
- MURPHY, F. A., GIBBS, J. E. P., HORZINECK, C. M., STUDDENT, M. J. (1999). *Veterinary Virology*, 3th Edition, Raven Press Ltd. New York. USA.
- NETTLES, V. F., DAVIDSON W. R., STALLKNECHT, D. E. (1992). Surveillance for hemorrhagic disease in white-tailed deer and other wild ruminants, 1980–1989, *Proceedings of the Annual Conference of the Southeastern Association of Fish and Wildlife Agencies* 46: 138–146.

- NIEKERK M.VAN., SMIT C.C., FICK W.C., STADEN, V. VAN , HUISMANS, H. (2001). Membrane association of African horse sickness virus nonstructural protein NS3 determines its cytotoxicity, *Virology* 279, pp. 499–508.
- NIKOLAKAKI, V.S., NOMIKOU, K., KOUMBATI, M., MANGANA, O., PAPANASTASSOPOULOU, M., MERTENS, P.C., PAPADOPOULOS, O. (2005). Molecular analysis of the NS3/NS3A gene of Bluetongue virus isolates from the 1979 and 1998–2001 epizootics in Greece and their segregation into two distinct groups. *Virus Research* 114 6–14.
- NUNAMAKER, R. A., MECHAM, J. O., HOLBROOK, F. R., LOCKWOOD, J. A. (1997). Applications of dot-blot, ELISA, and immunoelectron microscopy to field detection of bluetongue virus in *Culicoides variipennis sonorensis*: an ecological perspective. *J. Med. Entomol.*, 34, 24-28.
- OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES (OIE) (2000). Bluetongue. In *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. OIE, Paris, 153-167.
- OLDFIELD, S., HIRASAWA, T., ROY, P. (1991). Sequence conservation of the outer capsid protein, VP5, of bluetongue virus, a contrasting feature to the outer capsid protein VP2. *Journal of General Virology* 72, 449-451.
- OSBURN, B.I., SILVERSTEIN, A.M., PRENDERGAST, R.A., JOHNSON, R.T., PARSHALL, C.J. (1971). Experimental viral-induced congenital encephalopathies. I. Pathology of hydranencephaly and porencephaly caused by bluetongue vaccine virus. *Lab. Invest.*, 25:197-205.
- OSBURN, B. I. (1992). Immune responses to orbiviruses. In: *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbivirus*. Ed.: T. E. Walton, B. I. Osburn, Crs. Pres Inc., Fla., p.: 511-524.
- ÖZGÜNLÜK, I. (2003). Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) Kapsamındaki Bölgede Sığırlarda Mavidil, Akabane ve İbaraki enfeksiyonlarının Seroepidemiolojisi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- ÖZKUL, A., ERTÜRK, A., ÇALIŞKAN, E., SARAÇ, F., CEYLAN, C., MERTENS, P., KABAKLI, O., DİNÇER, E., ÇİZMECİ, S.G. (2009). Segment 10 based molecular epidemiology of bluetongue virus (BTV) isolates from Turkey: 1999-2001. *Virus Res.*, 142; 134-139.
- ÖZKUL, A., YILDIRIM, Y., PINAR, D., AKÇALI, A., YILMAZ, V., ÇOLAK, D. (2006). Serological Evidence of West Nile Virus (WNV) in Mammalian Species in Turkey. *Epidemiology and Infection*, 134: 826-829.
- ÖZTÜRK, F., YAVRU, S., ERÖZ, S. (1990). Koyunlarda mavidil enfeksiyonu üzerinde seroepizootolojik araştırmalar. *S. Ü. Vet. Fak. Derg.*, 6(1): 37-40.
- PARSONSON, I.P. (1990). Pathology and pathogenesis of bluetongue infections. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 162, 119-141.
- PARSONSON, I. M. (1992). Overview of BTV infection of sheep. In : *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbivirus*. Ed.: T. E. Walton, B. I. Osburn, Crs. Press Inc., Fla., p.: 713-724.

- PEARSON, J. E., JOCHIM, M. M. (1979). Protocol for the immunodiffusion test for bluetongue. *Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.*, 22, 463-471.
- PEARSON, J. E., GUSTAFSON, G. A., SHAFER, A. L., ALSTAD, A. D. (1992). Diagnosis of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease. In *Bluetongue, African horse sickness and related orbiviruses* (T.E. Walton & B.I. Osburn, eds). *Proc. Second International Symposium, Paris, 17-21 June 1991*. CRC Press, Boca Raton, 533-546.
- PERRIN, A., ALBINA, E., BRARD, E., SAILLEAU, C., PROM'E, S., GRILLET, C., KWIATEK, O., RUSSO, P., THIERY, R., ZIENTARA, S., C'ETRE-SOSSAH, C. (2007). Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: Evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine* (25) 6774-6783.
- PINI, A., COAKLEY, W., OHDER, H. (1966). Concentration of bluetongue virus in experimentally infected sheep and virus identification by immune fluorescence technique. *Arch. fur ges. Virus.*, 18, 358-390.
- PINI, A., OHDER, H., WHITELAND, A. P., LUND, L. J. (1968). Studies on fluorescent and neutralising antibodies to the bluetongue virus in sheep. *Arch. Fur ges. Virus.*, 25, 129-136.
- PINI A. (1976). A study on the pathogenesis of Bluetongue: Replication of the virus in the organs of infected sheep. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **43**: 159- 164.
- POTGIETER, A. C., MONACO, F., MANGANA, O., NOMIKOU, K., YADIN, H., SAVINI, G. (2005). VP2-segment Sequence Analysis of Some Isolates of Bluetongue Virus Recovered in the Mediterranean Basin During the 1998-2003 Outbreak. *J. Vet. Med. B* 52, 372-379.
- RAMAKRISHNAN, M.A., PANDEY, A.B., SINGH, K.P., NANDI, S., MEHROTRA, M.L. (2006). Immune Responses and Protective Efficacy of Binary Ethylenimine (BEI)-Inactivated Bluetongue Virus Vaccines in Sheep. *Vet. Rec. Com.*, **30**: 873-880.
- REDDINGTON, J. J., REDDINGTON, G. A., MACLACHLAN N. J. (1991). A competitive ELISA for detection of antibodies to the group antigen of bluetongue virus. *J Vet Diagn Invest* **3**: 144-147.
- ROBINSON, R. M., HAILEY, T. L., LIVINGSTON, C. W., THOMAS, J. W. (1967). Bluetongue in the desert bighorn sheep. *The Journal of Wildlife Management* **31**: 165-168.
- ROY, P. (1989a). Bluetongue virus genetics and genome structure. *Virus Research* 13, 179-206.
- ROY, P. (1989b). Bluetongue virus proteins. *Journal of General Virology* 73, 3051-3064.
- ROY, P. (1996). Orbivirus structure and assembly. *Virology* 1996 Apr1;218(1):296.
- ROY, P. (2002). Orbivirus. Ed: C. D. Tidona, G. Darai. *The Springer Index of Viruses*. Springer-Verlag. Berlin, Germany. p.:957-963.

- RUSSELL, H., O'TOOLE D.T., BARDSLEY K., DAVIS W.C., ELLIS J.A. (1996). Comparative effects of bluetongue virus infection of ovine and bovine endothelial cells. *Vet. Pathol.*, **33**, 319-331.
- SAEGERMAN, C., BERKVEN, D., MELLOR, P. S. (2008). Bluetongue Epidemiology in the European Union. *EID Journal Home*, **14**: 118-124.
- SAVINI, G., MONACO, F., CITARELLA, R., CALZETTA, G., PANICHI, G., RUIU, A., CAPORALE, V. (2004). Monovalent modified vaccine against bluetongue virus serotype 2: immunity studies in cows. In: MacLachlan, N.J., Pearson, J.E. (Eds.), *Bluetongue, Part II. Proc. Third International Symposium. Veterinaria Italiana*, vol. 40. Taormina, 26-29 October, pp. 664-667.
- SAVINI, G., POTGIETER, A. C., MONACO, F., MANGANA-VOUGIOUKA, O., NOMIKOU, K., YADIN, H., CAPORALE, V. (2004). VP2 gene sequence analysis of some isolates of bluetongue virus recovered in the Mediterranean Basin during the 1998-2002 outbreak. *Vet. Ital.*, **40** (4), 473-478.
- SAVINI, G., MACLACHLAN, N. J., SANCHEZ-VIZCAINO, J. S., ZIENTARA, S. (2008). Vaccines against bluetongue in Europe. *Comparative Immunology, Microbiology Infectious Diseases* **31**: 101-120.
- SHAD, G., WILSON, W. C., MECHAM, J. O., EVERMANN, J. F. (1997). Bluetongue virus detection: a safer reverse-transcriptase polymerase chain reaction for prediction of viremia in sheep. *J. Vet. Diag. Invest.* **9**: 118-124.
- SHAW, A. E., MONAGHAN, P., ALPAR, H. O., ANTHONY, S., DARPEL, K. E., BATTEN, C. A., GUERCIO, A., ALÍMENA, A. G., VITALE, M., BANKOWSKA, K., CARPENTER, S., JONES, H., OURA, C. A., KING, D. P., ELLIOTT, H., MELLOR, P. S., MERTENS, P. P. (2007). Development and initial evaluation of a real-time RT-PCR assay to detect bluetongue virus genome segment 1, *J. Virol. Methods* **145**: 115-126.
- SELLERS, R. F. (1975). Bluetongue in Cyprus. *Aust. Vet. J.* **51**(4) : 198-203.
- SELLERS, R. F. (1983). International importance of same exotic virus infection in sheep. In: *Disease of Sheep*. Ed.: W. B. Martin. Blackwell Scientific Publications, London., p.: 220-224.
- SELLERS, R. F., PEDGLEY, D. E. (1985). Possible windborne spread to western Turkey of bluetongue virus in 1977. *J. Hyg (Lond)*. **95**(1):149-158.
- SINGER, R.S., MACLACHLAN N.J., CARPENTER T.E. (2001). Maximal predicted duration of viremia in bluetongue virus-infected cattle. *J. Vet. Diag. Invest.*, **13**: 43-49.
- SPREULL, J. (1905). Malarial catarrhal fever (bluetongue) of sheep in South Africa. *J. Comp. Path. Therap.*, **18**:321-337.
- SMRITI, S.(2005). Comparative efficacy of standard AGID, CCIE and competitive ELISA for detecting bluetongue virus antibodies in indigenous breeds of sheep and goats in Rajasthan, India. *J Vet Sci.*; **6** (1):77-79.

- STANISLAWEK, W. L., LUNT, R. A., BLACKSELL, S. D., NEWBERRY, K. M., HOOPER, P., WHITE J. R. (1996). Detection by ELISA of bluetongue antigen directly in the blood of experimentally infected sheep. *Vet. Microbiol.*, **52**: 1-12.
- STOTT, J. L., LAUERMAN, L. H., LUEDKE, A. J. (1982). Bluetongue virus in pregnant elk and their calves. *American Journal of Veterinary Research* **43**: 423-428.
- STOTT, J. L., BLANCHARD-CHANNELL, M., SCIBIENSKI, R.J., STOTT, M.L. (1990). Interaction of bluetongue virus with bovine lymphocytes. *J. Gen. Virol.*, **71**, 363-368.
- STOTT, J. L., BLANCHARD-CHANNEL M., STOTT, M. L., BARRATT-BOYES, S. M., MACLACHLAN, N. J. (1992). Bluetongue virus tropism for bovine lymphocyte subpopulations. In *Bluetongue, African horse sickness and related orbiviruses* (T.E. Walton, B.I. Osburn, eds). *Proc. Second International Symposium, Paris, 17-21 June 1991*. CRC Press, Boca Raton, 781-787.
- TABACHNICK, W. J., MACLACHLAN, N. J., THOMPSON, L. H., HUNT, G. J., PATTON, J. F. (1996). Susceptibility of *Culicoides variipennis sonorensis* to infection by polymerase chain reaction-detectable bluetongue virus in cattle blood. *Am J Trop Med Hyg* **54**: 481-485.
- TAKAMATSU, H., KIRKHAM, P. A., PARKHOUSE, R. M. E. (1997). A $\gamma\delta$ T-cell specific surface receptor (WC1) signaling G0/G1 cell cycle arrest. *Eur. J. Immunol.*, **27**: 105-110.
- TAKAMATSU, H., MELLOR, P.S., MERTENS, P. P. C., KIRKHAM, A., BURROUGHS, J. N., PARKHOUSE, R. M. E. (2003). A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector. *J. Gen. Virol.*, **84**: 227-235.
- TANYA, V. N., GIBBS, E. P. J. (1991). Bluetongue. In: *Disease of Sheep*. Ed.: W. B. Martin, I. D. Autken, Blackwell Scientific Publications, London. p.:348-351.
- THEVASAGAYAM, J. A., WELLBY, M. P., MERTENS, P. P. C., BURROUGHS, J. N., ANDERSON, J. (1996). Detection and differentiation of epizootic haemorrhagic disease of deer and bluetongue viruses by serogroup-specific sandwich ELISA. *J. Virol. Methods*, **56**: 49-57.
- THIRY, E., SAEGERMAN, C., GUYOT, H., KIRTEN, P., LOSSON, B., ROLLIN, F. (2006). Bluetongue in northern Europe. *Vet Rec* **159**: 327.
- THOMAS, F. C., SAMAGH, B. S. (1979). A rapid plaque neutralization test for bluetongue virus. *Can. J. Comp. Med.* **43**: 234-236.
- THOMAS, F. C., RANDALL, G. C. B., MYERS, D. J. (1986). Attempts to establish congenital bluetongue virus infection in calves. *Can. J Vet. Res.* **50**: 280-281.
- THOMAS, F. C., RANDALL, G. C. B., MYERS, D.J. (1986). Attempts to establish congenital bluetongue virus infection in calves. *Can. J Vet. Res.* **50**: 280-281.
- TOUSSAINT, JF., SAILLEAU, C., MAST, J., HOUDART, P., CZAPLICKI, G., DEMEESTERE, L. (2007). Bluetongue in Belgium, 2006. *Emerg Infect Dis* ;**13**:614-616.
- TUFAN, M. (2006). 2006 yılı hayvan hastalık ve zararlıları ile mücadele programı. 50 Ek 12

- ULLOA, A. ., LANGEVIN, S. A., MENDEZ-SANCHEZ, J.D., ARREDONDO-JIMENEZ, J. I., RAETZ, J. L., POWERS, A. M., VILLARREAL-TREVİÑO, C., GUBLER, D. J., KOMAR, N. (2003). Serologic Survey of Domestic Animals for Zoonotic Arbovirus Infections in the Lacandón Forest Region of Chiapas, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 3(1): 3-9.
- URMAN, H. K., MİLLİ, Ü., MERT, N., BERKİN, S., KAHRAMAN, M. M., YÜCE, H., AVVURAN, H. (1979). Türkiye’de buzağlarda konjenital epizootik arthrogriposis ve hydranencephalie olayları. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.*, **26**: 287-292.
- VAN DER WALT, N. T. (1980). A haemagglutination and haemagglutination inhibition test for bluetongue virus. Onderstepoort. *J. Vet. Res.* **47**:113-117
- VENTER E.H, VAN DER LUGT, J.J., GERDES G.J. (1993). Detection of Bluetongue virus RNA in cell cultures and in the central nervous system of experimentally infected mice using in situ hybridization. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* **60**: 39-45.
- VOSDINGH, R.A., TRAINER, D. O., EASTERDAY, B. C. (1968). Experimental Bluetongue Disease in White-Tailed Deer. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* **32**: 382-387.
- WADE-EVANS A.M., MERTENS P.P.C., BOSTOCK C.J. (1990). Detection of the polymerase chain reaction for detection of bluetongue virus in tissue samples. *J Virol Methods* **30**: 15-24
- WALTON, T. E. (1992). Attenuated and inactivated orbiviral vaccines. In: *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbivirus*. Ed.: T. E. Walton, B. I. Osburn, Crs. Pres Inc. Fla., p.:851-855.
- WECHSLER, S. J., MC HOLLAND, L. E. (1988). Susceptibilities of 14 cell lines to bluetongue virus infection. *J. Clin. Microbiol.* **26**:2324-2327.
- WECHSLER, S.J., MC HOLLAND, L. E., TABACHNICK, W. J. (1989). Cell lines from *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) support replication of bluetongue virus, *J. Invertebr. Pathol.* **54**: 385–393.
- WECHSLER, S. J., LUEDKE, A. J. (1991). Detection of bluetongue virus by using bovine endothelial cells and embryonated chicken eggs, *J. Clin. Microbiol.* **29**: 212–214.
- WECHSLER, S. J., MCHOLLAND, L. E., WILSON, W. C. (1991). A RNA virus in cells from *Culicoides variipennis*, *J. Invertebr. Pathol.* 57, pp. 200–205.
- WHITE, D. M., WILSON, W.C., BLAIR, C. D., BEATY, B. J. (2005). Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects. *Journal of General Virology*. **86**: 453-462.
- WHITE, D.M., BLAIR, C. D., BEATY, B. J. (2006). Molecular epidemiology of Bluetongue virus in northern Colorado. *Virus Research* **118**: 39–45.
- WORK, T. M., JESSUP, D. A., SAWYER, M. M. (1992) Experimental bluetongue and epizootic hemorrhagic disease virus infection in California black-tailed deer. *Journal of Wildlife Diseases*, **28**(4), 623-628.

- YANG, Y. Y., LI, J. K. K. (1992). Complete genomic sequences of the GP5 protein gene of bluetongue virus serotype 11 - 17. *Virus Research* **23**: 163-171.
- YILDIRIM, Y. (2003). Kuzeydoğu Anadolu Bölgesindeki Sığırlarda Mavidil, IBR, PI-3, EBL ve BVD Enfeksiyonlarının Seroprevalansı. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- YILMAZ, H. (1994). Elazığ yöresinde bulunan Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) türleri üzerine araştırmalar. Doktora tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- YONGUÇ, A.D., TAYLOR, W.P., CSONTON, L., WORRALL, E. (1982). Bluetongue in western Turkey. *Vet Rec*, **111**: 144-146.
- YU, Y., FUKUSHO, A., RITTER, D. G., ROY, P. (1988). Complete nucleotide sequence of the group-reactive antigen VP7 gene of bluetongue virus. *Nucleic Acids Research* **16**, 1620.
- ZHOU, E. M., RIDD, D., RIVA, J, FERNADO, L., CLAVIJO, A.(2001). Development and evaluation of an IgMcapture ELISA for detection of recent infection with bluetongue viruses in cattle. *J. Virol. Methods*, **91**: 175-182.
- ZIENTARA, S., BREARD, E., SAILLEAU, C. (2003). Bluetongue diagnosis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Vet Ital* **40**: 531-537.
- ZIENTARA, S., BRÉARD, E., SAILLEAU, C. (2004). Bluetongue diagnosis by reverse transcriptase polymerase chain reaction. In *Bluetongue, Part II* (N.J. MacLachlan & J.E. Pearson, eds). Proc. Third International Symposium, Taormina, 26-29 October 2003. *Vet. Ital.*, **40** (4): 531-537.
- ZIENTARA, S., BRÉARD, E., SAILLEAU, C. (2006). Bluetongue: characterization of virus types by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Dev Biol (Basel)* **126**, 187–196.

EK-1: Araştırmaya ait etik kurul raporu



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

06/12/2007

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/ 105- 20175 -
KONU:

Sayın

Prof.Dr.Aykut ÖZKUL
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-07.061 kod numaralı ve *“Yerel Mavdil virüsü izolatlarının plak ve nötralizasyon (PRN) moleküler yöntemlerle serotipik identifikasyonu”* başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-07.061 and entitled *“Serotypic identification of local Bluetongue virus isolates using plaque reduction neutralization assay (PRNA) and molecular techniques”* is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards.

Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı
Chairman
Gazi University Experimental Animals Ethical Council

Prof.Dr.Engin ÇALGÜNER

Prof.Dr.Nedret KILIÇ

Prof.Dr.Sevil PEHLİVAN

Prof.Dr.Deniz ERDOĞAN

Prof.Dr.Deniz ERBAŞ

Prof.Dr.Fatma AKAR

Prof.Dr.Altan DOĞAN

Uzman Dr. Şeyda DİKER

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Volkan

Soyadı : YILMAZ

Doğum Yeri ve tarihi : Ankara, 16/07/1978

Uyruğu : T.C.

Medeni Durumu : Bekar

İletişim adresi ve telefonu: Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim
Dalı KARS (0474) 2426800/1170

II- Eğitimi

1995-2000 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

1992 -1995 Ankara Cumhuriyet Lisesi

III- Ünvanları

Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

2003-2009 yılları arasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji
Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

- Ozkul, A., Yıldırım, Y., Pınar, D., Akcalı, A., Yılmaz, V., Colak, D. Serological Evidence of West Nile Virus (WNV) in Mammalian Species in Turkey. Epidemiology and Infection, 134: 826-829 (2006).
- Yıldırım Y., Yılmaz V., Otlı S., Şahin M. Kars Yöresi Kültür Irkı Sığırlarda Bovine Leukemia Virus (BLV) Enfeksiyonun Seroprevalansı. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 14(1): 99-103 (2008).
- Yıldırım Y., Yılmaz V. Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi Sınır İllerinde Bulunan Sığırlarda Viral Solunum Sistemi Enfeksiyonlarının Seroprevalansı (yayına kabul edildi).
- Bilge Dağalp S., Güngör, E., Demir A. B., Pınar Muz D., Yılmaz V., Oğuzoğlu T. Ç., Ataseven V. S., Alkan, F. The Investigation of The Presence of Bovine Herpesvirus type 4 (BoHV-4) in Cows with Metritis in a Dairy Herd (yayına kabul edildi).

Projeler:

- Oğuzoğlu, Ç., Muz P.D., Yılmaz, V., Akça, Y., Burgu, İ. Türkiye Orijinli BVDV/BDV İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu ve Antikor ELISA kiti geliştirilmesi. TÜBİTAK Ulusal Genç Araştırmacı Kariyer Geliştirme Programı. Proje No: TOVAG-1050479-86, Başlangıç Tarihi: 2006-Bitiş Tarihi: 2009.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

- Oğuzoğlu, Ç., Muz P.D., **Yılmaz, V.**, Güngör, E., Özkul, A., Alkan, F., Akça, Y., Burgu, İ. Türkiye’ de Çift Tırnaklılardan İzole Edilen Pestivirusların Moleküler Karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Hannover Veteriner Fakültesi IV Bilimsel İşbirliği Toplantısı, Ankara, 12 Ekim 2006.
- Bilge Dağalp, S., Güngör, E., Demir, A.B., Oğuzoğlu, Ç., **Yılmaz, V.**, Pınar, D., Alkan, F. Bir Süt Sığırcılığı İşletmesinde Bovine Herpesvirus Tip 4 (BHV-4) Enfeksiyonunun Serolojik ve Virolojik Olarak Araştırılması. Uluslararası Katılımlı VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Side – Antalya, 26 – 28 Eylül 2006, Poster Sunumu.
- Oguzoglu, T. C., Pinar-Muz, D., **Yılmaz, V.**, Ozkul A., Alkan, F., Akca, Y., Burgu, I. Molekulare Charakterisierung von BVDV Isolaten anlässlich von Pestivirus-Bekämpfungsmaßnahmen in der Türkei. 6. Stendaler Symposium zur BHV 1-, BVD- und Paratuberkulose-Bekämpfung vom 7. bis 9. März 2007 Stendal, Poster Sunumu.
- Oguzoglu, T. C., Pinar-Muz, D., **Yılmaz, V.**, Ozkul A., Alkan, F., Akca, Y., Burgu, I. Molecular typing of Turkish BVDV field isolates collected from different regions between 1997 to 2007. XIV. International Congress of Virology, 10-15 August 2008, İstanbul, Poster Sunumu.
- Yıldırım, Y., **Yılmaz V.** Kars Yöresi Kültür Irkı Sığırlarda Bovine Leukemia Virus (BLV) Enfeksiyonun Enzyme Linked İmmunosorbent Assay ve Agar Jel İmmunodiffuzyon Testleri ile Araştırılması. Uluslararası Katılımlı VIII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Kampüs-Van, 07-09 Ekim 2008, Poster Sunumu.
- Yıldırım, Y., **Yılmaz V.** The Seroprevalence of Bluetongue Virus (BTV) Serotypes 4, 9 and 16 Infections in Cattle in Some Northeastern Anatolia Provinces Of Turkey. 3rd Annual Meeting EPIZONE, Antalya, 12-15 May 2009, Poster Sunumu.