T.C

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONYA BÖLGESİNDEKİ KOYUNLARDA MAVİDİL VİRUS ENFEKSİYONUNUN ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) İLE SEROLOJİK ARAŞTIRILMASI

Gülsen YİĞİT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Konya, 2008

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KONYA BÖLGESİNDEKİ KOYUNLARDA MAVİDİL VİRUS ENFEKSİYONUNUN ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) İLE SEROLOJİK ARAŞTIRILMASI

Gülsen YİĞİT

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Yrd.Doç.Dr. Rüstem DUMAN

2008, 65 Sayfa

Jüri : Yrd.Doç.Dr Rüstem DUMAN

Prof.Dr.Sibel YAVRU

Doç.Dr.Orhan YAPICI

Bu çalışma, Konya bölgesindeki koyunlarda, BTV' ye özgü antikorların kompetitif ELISA (c-ELISA) ile seroprevalansını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, kapalı işletme modeli uygulanan bazı özel hayvancılık işletmelerinde bulunan klinik olarak sağlıklı, aşılanmamış, 460 adet koyundan tesadüfi örnekleme metodu ile kan örnekleri alınmıştır. Toplanan kan serumu örnekleri, ticari c-ELISA ile BT virusuna karşı antikor varlığı yönünden incelenmiştir. Araştırma sonucunda, 460 koyun serumunun 46' sında (%10) BT virusuna özgü antikor varlığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: koyun, mavidil virusu, seroloji, c-ELISA

ABSTRACT

Master Thesis

SEROLOGICAL INVESTIGATION OF BLUETONGUE VIRUS INFECTION BY ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) IN SHEEP IN KONYA REGION

Gülsen YİĞİT

Selçuk University

Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Rüstem DUMAN

2008, 65 Page

Jury : Assist. Prof. Dr. Rüstem DUMAN
Prof. Dr. Sibel YAVRU
Assoc. Prof. Dr. Orhan YAPICI

This study was conducted to determine the seroprevalence of BTV-specific antibodies in sheep in Konya province using the competitive-ELISA. For this purpose, blood samples from a number of 460 sheep farmed in intensive conditions with a history of no vaccination against BT and reported being clinicaly healthy were randomly collected. The collected serum samples were examined by the presence of anti-BT virus antibodies by c-ELISA. By this investigation, 46 samples out of 460 (10 %) were detected to contain anti BT antibodies.

Key words: sheep, bluetongue virus, serology, c-ELISA

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, Konya bölgesindeki özel hayvancılık işletmelerinde bulunan klinik olarak sağlıklı, aşılanmamış koyunlardan toplanan kan serumu örneklerinde kompetitif ELISA ile BTV' ye karşı antikorların saptanması amaçlanmıştır.

Bana bu konuda çalışma olanağı veren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Rüstem DUMAN'a, laboratuvar çalışmalarında ve diğer aşamalarda çalışmamın başından beri bilgileriyle ve her türlü destekleriyle yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Sibel YAVRU'ya , Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK'e, Doç. Dr. Orhan YAPICI ' ya, Doç. Dr. Oya BULUT'a, Arş. Gör. Oğuzhan AVCI'ya ve bu çalışmada emeği geçen herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Konya 2008 Gülsen YİĞİT

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....iii
ABSTRACT.....iv
ÖNSÖZ.....v
İÇİNDEKİLER.....vi
ÇİZELGE VE ŞEKİL LİSTESİ.....vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....ix
1. GİRİŞ.....1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....3
2.1.Etiyolojik Etken.....3
2.2.Epidemiyoloji.....4
2.3. Bulaşma.....5
2.3.1. Omurgalı konakçılar.....7
2.3.2. İnkübasyon süresi ve viremi.....7
2.4. Ruminantlarda BTV' nin Patogenezi.....8
2.4.1. Klinik belirtiler.....8
2.4.2. Hücre tropizmi, yayılma ve rezervuar.....9
2.4.3. BTV' ye selüler yanıt.....11
2.4.3.1. Hücre ölümü.....11
2.4.3.2. Sitokinler ve prostanoid indüksiyon.....12
2.5. BTV' ye Karşı İmmün Yanıtlar.....12
2.5.1. BTV' ye karşı humoral immünite.....13
2.5.2. BTV' ye karşı hücresel immünite.....14
2.5.2.1. Fare ve koyunlarda sitotoksik T hücresi yanıtı.....14
2.5.2.2. 'Yardımcı' T hücresi yanıtları.....15
2.6. Patoloji ve Post-mortem Bulgular.....15
2.7. Teşhis ve Ayırıcı Teşhis.....16
2.8. Tedavi.....18
2.9. Önlem ve Kontrol.....18
2.9.1. Mavidil virusuna karşı aşılar.....20

2.9.1.1. Atenüe aşılar....20
2.9.1.2. İnaktif aşılar....21
2.9.1.3. Virus benzeri partiküller....21
2.9.1.4. Rekombinant vektörler....22
2.10. Mavidil Virusu' nun Dünyada ve Türkiye' de Dağılımı....23
2.11. Koyunlarda BTV Enfeksiyonu Üzerine Dünya' da ve Türkiye' de Yapılan Araştırmalar....24
3. MATERYAL VE METOT....28
3.1. Materyal....28
3.1.1. Kan örnekleri....28
3.2. Metot....28
3.2.1. Kan serum örneklerinin hazırlanması....28
3.2.2. Kompetitif enzyme linked immunosorbent assay (c-ELISA)....28
3.2.2.1. Genel bilgiler....29
3.2.2.2. Kit bileşenleri....29
3.2.2.3. Gerekli fakat test kitine dahil edilmeyen materyaller....30
3.2.2.4. Muhafaza ve stabilite....30
3.2.2.5. C-ELISA için ön hazırlık....31
3.2.2.6. Test prosedürü....31
3.2.2.7. Testin geçerliliği....33
3.2.2.8. Sonuçların değerlendirilmesi....33
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA....34
5. SONUÇ VE ÖNERİLER....52
6. KAYNAKLAR....53

ÇİZELGE VE ŞEKİL LİSTESİ

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 4.1. C-ELISA testi sonuçları.....34

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. Setup Record 30

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

AGID : Agar Gel Immunodiffusion–Agar Jel İmmünodifüzyon

AGPT : Agar Gel Precipitation Test–Agar Jel Presipitasyon Testi

BHV-1 : Bovine Herpes Virus-1

BLV : Bovine Leukemia Virus

BRSV : Bovine Respiratory Syncytial Virus

BT : Bluetongue–Mavidil

BTV : Bluetongue Virus–Mavidil Virusu

BVDV : Bovine Viral Diarrhea Virus

C-ELISA : Competitive-ELISA–Kompetitif-ELISA

CFT : Complement Fixation Test–Komplement Fikzasyon Testi

CPE : Cytopathologic Effect – Sitopatolojik Etki

DIVA : Differentiating Infected from Vaccinated Animals

$DKID_{50}$: Doku Kültürü İnfektif Doz_{50}

DNA : Deoksiribonükleik Asit

dsRNA : Double-Stranded RNA

EHDV : Epizootic Haemorrhagic Disease Virusu

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

GRSV : Goat Respiratory Syncytial Virus

HI : Hemaglütinasyon – İnhibisyon

KKKA : Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi

mNT : Mikronötralizasyon Testi

OD : Optik Dansite

OIE : Office International des Epizooties

PCR : Polymerase Chain Reaction

RT-PCR : Reverse-Transcription- Polymerase Chain Reaction

SNT : Serum Neutralisation Test–Serum Nötralizasyon Testi

ssRNA : Single-Stranded RNA

1. GİRİŞ

Koyun yetiştiriciliğinin Türkiye ekonomisinde özel bir önemi vardır. Toplam et üretiminin %18.67' si, süt üretiminin %6.65' i, deri üretiminin %65.15' i koyunlardan sağlanmaktadır (http://www.tuik.gov.tr/yillik/yillik.pdf). Türkiye İstatistik Kurumu' nun 2007 yılı istatistiki verilerine göre ülkemizde yaklaşık 25,5 milyon (http://www.tuik.gov.tr/yillik/yillik.pdf), araştırmanın yapılacağı Konya ilinde ise 1.380.442 adet koyun mevcuttur (http://www.konyatarim.gov.tr/hvynfaal-ad.asp?id=95).

Ekonomi uzmanlarınca Türkiye' nin mevcut hayvancılık sektörü içinde,dış pazarlarda rekabet gücüne sahip hayvancılık dalları içerisinde koyunculuğun, tavukçuluktan sonra en önemli hayvancılık dalı olduğu bildirilmiştir. Bu sektörde üretimden tüketime her kademede büyük sorunlar olagelmiştir. Bunlar arasında da, yetiştiricilik ve hastalık sorunları daima güncelliğini korumuştur. Koyun yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen faktörlerin en önemlilerinden birisi de, verim özelliklerinde azalma, sağaltım için medikal girdiler, mortalite vb. nedenlerle önemli ekonomik kayıplara neden olabilen virusların yol açtığı hastalıklardır (Aytuğ 1990).

Reoviridae familyasının ekonomik açıdan önemli bir orbivirusu olan mavidil virusu (Bluetongue virus, BTV), çoğunlukla koyunlarda, ara sıra sığırlarda ve bazı geyik türlerinde hemorajik bir hastalığa neden olmaktadır (Mertens ve ark. 2004). BTV, bazı sokucu sinekler (*Culicoides* spp. – Diptera: Ceratopogonidae) aracılığı ile memeli konakçıları arasında nakledilmekte ve tüm ruminant türlerini enfekte edebilmektedir. BTV bir arbovirus olmasına rağmen, bazen seminal sıvı ve plasenta yoluyla nakledilebilmektedir (Parsonson 1990). Dünyanın dört bir yanında, sadece düşük düzeyde kros-koruma hasıl eden ve aşılama stratejileri karmaşık olan toplam 25 serotip bildirilmiştir (Barros ve ark. 2007).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda bu serotiplerden daha çok 2, 4, 9 ve 16'nın gözlendiği bildirilmiştir (Mellor ve Wittmann 2002). Mavidil, ekonomik etkisi yüzünden Office International des Epizooties (OIE) A listesine kaydedilmiş bir hastalıktır (OIE 2000). BTV enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiş ekonomik kayıplara direkt olarak verimlilikte azalmalar ve ölüm ile daha da önemlisi indirekt olarak hayvan hareketlerinin kısıtlanması, sığır semen ihracatıyla ilgili kısıtlamalar ve

diyagnostik testler dahil, kontrol ölçümleri, uygulama masrafları sebep olmaktadır (Anonymous 2007)

Bu çalışma, Konya bölgesindeki koyunlarda *Culicoides* cinsi sokucu sineklerle bulaşan ve ekonomik öneme sahip Mavidil enfeksiyonunun kompetitif ELISA (c-ELISA) ile seroprevalansının tespiti amacıyla yapılmıştır. Elde edilen bulguların koruma, kontrol ve eradikasyon için gerekli önlemlerin alınması hususunda ışık tutacağı kanısındayız.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Etiyolojik etken

Mavidil virusu Reoviridae familyasından Orbivirus cinsinin tip türüdür. Tam virionlar 80 nm kadar bir çapa sahip olup, çift tabakalı bir kapside sahiptirler. İki protein ihtiva eden difüz dış tabaka, son derece düzenli kor (öz) partikülünü ortaya çıkarmak için, enzimatik olarak veya tuz konsantrasyonu ve Ph' yı kullanarak uzaklaştırılabilir. İkozahedral simetri şeklinde dizilmiş 32 adet halkasal kapsomerden meydana gelen ve 5 protein içeren kore partikülünün yaklaşık 54 nm çapı vardır. Cins ismi bu yapıdan türetilmiştir (orbis= Latince halka, çember). Kapsomerler gerçekte tübüler yapılardır ve düzenli hekzagonal ve pentagonal kalıplar halinde düzenlenmiş daha küçük yapısal birimlerden meydana gelirler. Çift iplikçikli RNA (dsRNA) genomu, büyüklük bakımından 0.5 kDa' dan 2.7 kDa' a kadar değişen ve gen fonksiyonları değişik olan (yani onlar ayrı ayrı fonksiyonel viral proteinlere tercüme edilirler) 10 segmentten meydana gelir. Genom segmentleri, azalan büyüklük sırasına göre 1-10 arasında sınıflandırılırlar, oysaki viral polipeptidler yapısal proteinler (VP1-VP7) ve yapısal olmayan proteinler (NS1-NS3) şeklinde ayrılırlar. Viral proteinlerden ikisi, VP2 ve VP5, difüz dış kapsid tabakasını oluştururlar ve omurgalı konakçılarda serotip-spesifik nötralizan antikorların indüksiyonundan sorumludurlar. Şu anda virusun 25 farklı serotipi bilinmektedir (Barros ve ark.2007). Bununla birlikte, bunların hepsi, nötralizasyon testleriyle kros-reaksiyonlar, in vivo çalenç enfeksiyonlarda kros-korunma ve enfekte ruminantlarda heterotipik antikorların gelişmesi aracılığıyla gösterildiği gibi, birbirleriyle az ya da çok derecede ilişkilidirler. Bu ilişkilerin evrimsel bir temeli olabileceği ileri sürülmüştür (Mellor 2001).

Mavidil virusu nispeten ısıya dirençli olup, 20°C, 4°C ve –70°C' de stabil, ancak –20°C' de labildir. Lipid eriticilere karşı kısmen dirençlidir, fakat 6.5' in altındaki pH derecelerinde süratle inaktive olur (Mellor 2001).

2.2. Epidemiyoloji

Mavidil, ilk kez 19. yüzyılda Güney Afrika' da ithal Merinos koyunlarında tanımlanmıştır (Monath ve Guirakhoo 1996). Hastalık 1902' de "koyunların malarial catarrhal fever" ı olarak zikredilmiş, fakat 1905' de "bluetongue" olarak adlandırılmıştır (Monath ve Guirakhoo 1996). Mavidil 20. yüzyılın başlangıcında hastalığa son derece duyarlı olan yerli olmayan koyun ırklarının ithali ile Afrika' da yayılmıştır (Monath ve Guirakhoo 1996). Mavidil enfeksiyonu daha sonra hemen hemen tüm kıtalarda 40° güney ve 53° kuzey enlemleri arasındaki bölgelerde, yani Amerika, Afrika, Avustralya ve Asya' da (Mellor ve Boorman 1995), 1996 yılında dünya çapında 3 milyar dolar kayıba neden olan (Tabachnick 1996) enzootik bir hastalık olarak tanımlanmıştır. 1998' den önce, BTV' nin ara sıra olan kısa ömürlü saldırıları Avrupa' nın güneyinde (İspanya, Portekiz, Yunanistan ve Kıbrıs) meydana gelmiştir (Mellor ve Boorman 1995). Bununla birlikte, 1998' den beri, 6 farklı serotipten (1, 2, 4, 8, 9, 16 tipleri) en azından 8 farklı BTV suşu, pek çok kuzey Avrupa ülkesi dahil Avrupa' yı istila etmiştir (Purse ve ark. 2005, Saegerman ve ark. 2008).

2006 Ağustos' unda, BTV-8 (2006 süresince kuzey Avrupa'da BT vakası meydana gelen; Almanya, Belçika ve kuzeydoğu Fransa' da yayılmadan önce) ilk olarak Hollanda' da tespit edilmiştir. Kış mevsiminden sonra, viral enfeksiyon güçlü bir nüksetme göstermiş ve 2007' de toplam olarak 40931 vakaya yol açarak Avrupa' daki dağılımını genişletmiştir (http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/adns/index_en.htm). Örneğin, Fransa' da BTV-8' in yayılımı, ülkenin sadece güney kısımlarını etkilemediği bildirilen 15253 vakayla birlikte 95 departmandan 60' ını etkilemiştir. 2007' de Belçika (6661 vaka), Almanya (11487 vaka) ve Hollanda' da (5798 vaka) da tekrar ortaya çıkmış ve Lüksemburg (1315 vaka), Danimarka (1 vaka), İsviçre (5 vaka), Çek Cumhuriyeti (1 vaka) ve İngiltere (65 vaka)' ye yayılmıştır. 2007 süresince, BTV-8 ile enfekte önemli miktarda hayvan İtalya' ya sokulmuştur. 2008 Ocak ayında, BTV-8 ile enfekte hayvanlar İspanya' da saptanmış ve virus Avrupa kıtasından enfekte hayvanların ithaliyle Kuzey İrlanda' ya girmiştir, fakat enfekte ve temas halindeki hayvanların tamamının kesimiyle çabukca elimine edilmiştir. BTV-1, 2006 yılında Kuzey Afrika ve Sardinya adasında, 2007 yılında ise ilk olarak İspanya' da daha sonra da French Pays Basque' da tespit edilmiştir

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

BTV enfeksiyonunun Avrupa' daki evrimi, özellikle yeniden düzenleme ile yeni varyantların ortaya çıkışını kolaylaştıran birkaç serotipin hızı ve yayılma boyutu düşünüldüğünde, göz dağı vermektedir (Saegerman ve ark. 2008).

İklim değişikliği nedeniyle Avrupa' nın güneyinde vektör dağılımının değişimi (*Culicoides imicola*), Korsika (Fransa) gibi yeni coğrafik bölgelere mavidil virusunun uzanımını kısmen açıklayabilir (Purse ve ark. 2005, Saegerman ve ark. 2008). Bununla birlikte, *C. imicola*' ya, ne BTV-8' in çok etkili bir biçimde nakledildiği Avrupa' nın kuzeyinde ne de BTV-9' un ortaya çıktığı Avrupa' nın Balkan bölgelerinde rastlanmamıştır. *C. obsoletus* ve *C. pulicaris* tür komplekslerine ait olan yeni *Culicoides* vektör türleri, belki de böyle bölgelerde BTV nakline karışmıştır (Mellor ve Wittmann 2002).

ABD' de yeni 8 adet daha BTV serotiplerinin bulunması, Avrupa' da ilk kez saptanan BT dağılımındaki değişikliklerin dünya çapında bir fenomen, belki de iklim değişikliğinin bir sonucu olabileceğini kuvvetle akla getirmektedir (Johnson ve ark. 2006).

2.3. Bulaşma

Mavidil virusu, hemen hemen tamamıyla gerçek biyolojik vektörler olarak hareket eden *Culicoides* cinsi sokucu sineklerin belli türlerinin sokmaları yolu ile ruminant konakçıları arasında nakledilmektedir. Bundan dolayı, onun dünyadaki dağılımı, sokucu sinek vektör türlerinin bulunduğu bölgelerle sınırlıdır ve bulaşma ergin vektörlerin aktif olduğu yılın belirli dönemleriyle sınırlıdır. Epizootik bölgelerde bu genellikle vektör bolluğunun en fazla olduğu zaman olduğu için yaz ve sonbaharın sonları anlamına gelir. Sokucu sinekler viremik ruminantlar üzerinde beslenip, virus replikasyonu 10000 misline kadar sürdürülebildiği zaman BT virusu ile enfekte olurlar. Enfekte tatarcıklar, virus tükrük bezlerine ulaşıp, 25°C' de yaklaşık 6-8 gün, ancak ortam sıcaklığı düştüğünde kademeli olarak daha uzun süren tükrük bezlerindeki replikasyonundan sonra hastalığı nakletmeye yetenekli olurlar. Bir defa enfekte olan vektör ömür boyu enfekte kalır ve her bir kan yemeğinde virusu nakledebilir. Tek bir sokucu sinek ısırığı duyarlı ruminant konakçıyı enfekte etmeye yeterlidir. Bununla

birlikte, vektörler aracılığı ile BT virusunun transovaryal veya vertikal bulaşımının meydana geldiği gözükmemektedir (Mellor 2001).

Amerika kıtasında bulunan en önemli titrersinek (tatarcık) *Culicoides* vektör türleri, *C. insignis* (başlıca Orta ve Güney Amerika) ve *C. variipennis* (Kuzey Amerika) tir. Afrika' da bu vektör *C. imicola* ve *C. bolitinos* olabilirken, Avrupa' nın güneyinde *C. imicola* ve *C. obsoletus* olabilir. Avustralya' da *C. brevitarsis*, *C. fulvus*, *C. wadai* ve *C. actoni* en önemli vektörler iken, Asya' nın epey bir ucundan öbür ucuna *C. imicola*, bu 4 türe ilaveten hastalığın bulaşmasında rol almaktadır. Bu coğrafik bölgelerin herbirinde başka türler de zaman zaman bulaşmada daha az bir rol oynayabilirler (Mellor 2001).

Genel olarak, *Culicoides* türlerinin birkaç km ya da daha az uçuş menzili vardır. Bununla birlikte, diğer birçok uçucu böcekte olduğu gibi, çok daha uzun mesafelere havai plankton gibi nakledilme yetenekleri vardır. Gerçekten, 1971 de Avustralya' nın kuzeyine BT virus vektörü *C. wadai*' nin girişi, yaygın olduğu Endonezya' dan rüzgar-kaynaklı bir giriş olabilir. Bu bağlamda, BT virusunun yeni bölgelere dağılımının, bazen hakim olan rüzgarlarla sürdürülen enfekte vektör *Culicoides*' lerin uzun mesafeli dağılımı yüzünden olabileceğini akla getiren önemli miktarda delil vardır (Mellor 2001).

Culicoides vektör türleri aracılığı ile bulaşmaya ilaveten, BT virusu bazen doğrudan hastalığın viremik fazı esnasında biriken spermle de nakledilebilmektedir. Bu nedenle, BT virusu ile enfekte ülkelerden BT virusundan ari bölgelere ruminant semenlerinin gönderilmesi sıkıca kontrol edilir ve güvenliği sağlamak için uyulması gereken ayrıntılı protokoller mevcuttur. Benzer şekilde, algılanan risk semen nakline göre daha düşük olmasına rağmen, enfekte annelerden embriyo transferinin alıcılarda virus bulaşmasıyla sonuçlanmamasını sağlamak için protokoller de mevcuttur. Transplasental bulaşma kaydedilmiştir, fakat viral idame için önemli bir mekanizma olduğu düşünülmemektedir (Mellor 2001).

2.3.1. Omurgalı konakçılar

Mavidil virusunun çok geniş bir konakçı dizilimi vardır ve muhtemelen tüm ruminant türleri enfeksiyona duyarlıdır. Bununla birlikte, enfeksiyon sonucu, aynı türlerin bireyleri arasında olduğu gibi, farklı türler ve soylar arasında da çok değişebilir. Belirli koyun ırkları ve bazı geyik türlerinde sonuç, şiddetli ve ekseriya fatal olabilirken, diğer birçok ruminant türlerinde enfeksiyon genellikle inapparenttir. Aslında, klinik hastalık derecesinin hayvan ırkı ve türlerine, virusun serotipi veya suşu ile çevrenin iyi tanımlanmamış belirli etkileşimlerine (örneğin stresli olan ya da yüksek seviyede solar radyasyona maruz kalan koyunların, böyle muameleye maruz kalmayanlara göre daha şiddetli lezyon geliştirdikleri bilinmektedir) bağlı olduğu gözükmektedir (Mellor 2001).

Tarihi olarak, primer mavi dil virus döngüsünün, Afrika antilop türleri ile *Culicoides* sokucu sinek türlerini içine alması mümkündür. Afrika' nın büyük bir bölümünün tarımsal gelişiminde ve bu kıtanın dışındaki ülkelere mavi dil virusunun girişinde yabani av hayvanlarının geleneksel rolü, büyük ölçüde sığırlar tarafından devralınmıştır. Şu anda bir titrersinek- sığır döngüsünde varlığını sürdürdüğü gözüken virus, belli bir enfeksiyon seviyesine ulaşır ulaşmaz, koyunlarda sekonder bir döngüyü başlatmak için dökülüp saçılmaktadır. Bu genellikle, vektör titrersinek populasyonlarının maksimum seviyede olduğu yaz sonlarında veya sonbaharda meydana gelmektedir (Mellor 2001).

2.3.2. İnkübasyon süresi ve viremi

Mavidil virusu ruminant bir konakçıya girdiğinde, ilk önce lokal lenf nodüllerinde, daha sonra diğer lenf nodülleri, kan oluşturan organlar ile kılcal damarlar ve küçük kan damarlarını astarlayan endotelyal hücrelerde replike olmaktadır. Hayvanların çoğunda viremi, ilk kez, enfekte edici doza ve enfeksiyon yoluna bağlı olarak, enfeksiyondan yaklaşık 3 – 6 gün sonra saptanır. Koyunlarda viremi, 54 günlük maksimum bir süre bildirilmesine rağmen, genellikle 6 – 10 gün, nadiren 14 günden daha fazla sürmektedir. Virusun mililitre başına %50 Doku Kültürü İnfektif Dozu ($DKİD_{50}$/ml), 10^6 civarında bir azami titreye ulaşabilmektedir. Sığırlarda viremi, koyunlarla aynı seviyede en yüksek noktaya ulaşabilir, fakat daha uzun bir süreye (7 – 28 gün) sahip olmaya meyillidir ve bazen 100 gün kadar uzun sürebilir. Diğer

ruminant türlerindeki [evcil keçiler, Blesbok veya Bontebok (*Damaliscus pygargus*), Beyaz kuyruklu geyik (*Odocoileus virginianus*), Elk (*Cervus elaphus*), Arap ceylanı (*Gazella* türü), Bataklık mandası (*Bubalus bubalis*)] maksimum viremi süresinin 10 – 50 gün arasında değiştiği görünmektedir (Mellor 2001).

Dolaşım sistemindeyken BT virusunun büyük bir kısmının, esas olarak deveran eden eritrositlerin membranlarında ve daha az boyutta lökosit tabakası içeren hücrelerde olmak üzere immünolojik yönden ayrıcalıklı yerlerde tecrit edildiği ve böylece humoral antikorun etkilerinden korunduğu zannedilmektedir. Dolayısıyla, virus ve antikor dolaşım sisteminde bir arada var olabilirler ve virusun, enfekte eritrositler sonunda uzaklaştırılıncaya kadar süredurması mümkündür. Sığır eritrositlerinin yarı ömrü tahminen 120 gün olduğu için, yukarda bildirildiği gibi enfeksiyon sonrası 100. güne kadar sığır kanından mavidil virusunun izolasyonu, bu teoriye uygundur (Mellor 2001).

2.4. Ruminantlarda BTV' nin Patogenezi

2.4.1. Klinik belirtiler

Enzootik kuşaklardaki ılıman iklimlerde, BTV salgınları, ergin *Culicoides* vektörlerinin yüksek populasyonlarıyla ilişkili mevsime bağlı olarak meydana gelmekte olup, evcil ve yabani ruminantları etkileyebilmektedir (Barratt-Boyes ve MacLachlan 1995, Tabachnick 1996). BTV enfeksiyonuna duyarlı olan sığırlar genellikle açık klinik belirtiler geliştirmezler, fakat IgE aracılı hipersensibilite reaksiyonu gösterebilirler (Anderson ve ark. 1987). Bununla birlikte, virus için rezervuar teşkil eden sığırlar, hastalığın bulaşmasında önemlidir (Anderson ve ark. 1987). Avrupa' nın kuzeyini istila eden BTV serotip 8 ile enfekte olan çok sayıda sığır üstelik klinik belirtiler de geliştirdiği için, müstesnadır (Elbers ve ark. 2008). Koyunlar ve bazı yabani ruminantlar, subklinik enfeksiyonlar veya hafif hastalıktan, akuta hatta fatal hastalığa kadar değişiklik gösteren, çeşitli klinik manifestasyonlar gösterirler. Koyunlarda enfeksiyon sonrası 3 -5 gün içerisinde genellikle viremi tespit edilir (Foster ve ark. 1991). Klinik belirtiler yüksek ateş, anormal biçimde hızlı soluma ve letarjiyi (uyuşukluk) kapsamaktadır. Makroskopik patolojik değişiklikler; özellikle

lenf nodülleri, akciğerler, kalp ve iskelet kaslarında yaygın ödem, hemorajiler ile ve/veya oronazal ve beslenme sistemlerindeki mukozal yüzeylerin nekrozu ile karakterize edilirler (Brewer ve MacLachlan 1994). Ruminantların şok organı olan akciğerler (Meyrick ve ark. 1989), özellikle BTV' nin yol açtığı damar sistemi geçirgenlik bozukluklarına karşı duyarlıdırlar. Mikroskopik lezyonlar; endotelyal hipertrofiyi, vasküler stazı ve doku infarksiyonu ile birlikte trombozu içermektedir. Akut enfeksiyondan ölmeyen hayvanlar kronik dermatit ile iki parmak arasında ve mukozal yüzeylerde veziküler ve erozyona yol açan lezyonlar geliştirebilirler (Brodie ve ark. 1998). Panlökopeni, enfeksiyondan 7 – 8 gün sonra maksimum düzeyine ulaşır ve tüm lenfositleri, özellikle CD8 T hücrelerini etkiler (Ellis ve ark. 1990).

BTV' nin neden olduğu hastalığın şiddeti, konakçının yaşı ve sağlık durumuna göre değişir (Parsonson 1992). Kuvvetli güneş radyasyonlarının etkisinde kalma kadar, aynı zamanda meydana gelen enfeksiyonlardan dolayı bağışıklık yetersizliği de hastalık manifestasyonlarını daha da kötüleştirebilmektedir (Brodie ve ark. 1998).

2.4.2. Hücre tropizmi, yayılma ve rezervuar

BTV, inokülasyon yerlerini süzen lenf düğümlerinde ilk replikasyondan sonra, sekonder yerlere, genellikle endotelyum ve mononükleer fagositlerde replike olduğu akciğerler ve dalağa yayılmaktadır (Barratt-Boyes ve MacLachlan 1994). BTV lenf yoluyla (Barratt-Boyes ve MacLachlan 1994) veya/ve kan yoluyla (Brodie ve ark. 1998) yayılabilmektedir. BTV, hem in vivo hem de in vitro monositleri enfekte eder. Enfeksiyöz BTV, in vivo, monositlerden (minimum 10^5 hücre) geçici olarak (< 1 hafta) tekrar elde edilebilir (Brodie ve ark. 1998, Whetter ve ark. 1989). Monositler, düşük frekansta (2 x 10^5 periferal kan mononükleer hücresi başına 4 NS2 antijen-pozitif monosit) in vivo olarak BTV antijenlerini de ifade etmektedir (Whetter ve ark. 1989). Monositlerin yaklaşık % 15' i in vitro kültürde 36 saat sonra BTV VP7' yi ifade ederler (Barratt-Boyes ve ark. 1992) ve in vitro düşük miktarlarda enfeksiyöz BTV oluştururlar (Whetter ve ark. 1989). Bunun tersine, aktif olmayan T lenfositleri, mitojenlerce aktive edilmedikçe (Barratt-Boyes ve ark. 1992), BTV replikasyonunu desteklemede etkili değillerdir (Whetter ve ark. 1989). İlginç bir şekilde, γδ T hücre hatları in vitro koşullarda verimli biçimde enfekte edilebilmektedir (Takamatsu ve ark.

2003) ve enfekte koyunlardan (enfeksiyondan 3- 13 gün sonra) kan γδ T hücreleri, deri fibroblastları ile birlikte kültüre edildiğinde enfeksiyöz BTV' yi üretmeye sevk edilmişlerdir (Takamatsu ve ark. 2003). Bununla birlikte, monositlerin ve muhtemelen olgunlaşmamış T hücrelerinin BTV' nin patogenezinde in vivo nasıl ilgili oldukları karışıktır. Ancak bir o kadar da önemli, enfeksiyöz BTV, replike olmadığı ancak hücre membranı invajinasyonlarında mevcut olduğu eritrositlerin intraselüler veziküllerinde de bulunabilmektedir (MacLachlan ve ark. 1994, Whetter ve ark. 1989). Enfeksiyöz BTV' nin eritrositlerle ilişkisi enfeksiyondan sonra çok erken (24 saat) tespit edilmekte olup (Brodie ve ark. 1998), viremi boyunca sürmektedir (MacLachlan ve ark. 1994, Shad ve ark. 1997).

Sonuç olarak, ruminantlarda BTV enfeksiyonu, iyileşen hayvanların homolog BTV serotipi ile reenfeksiyona karşı immun olmalarına rağmen, yüksek titreli nötralizan antikorların varlığında sürebilen uzun süren hücre ile ilişkili viremiyle karakterize edilmektedir. Koyun ve sığırlarda, enfeksiyöz BTV 35-60 gün süresince kanda tespit edilebilmekte (Barratt-Boyes ve MacLachlan 1994) ve 160 gün kadar süresince viral yapılar tespit edilebilmektedir (Katz ve ark. 1994). Eritrositlerle birleşen partiküllerin erken immün tasfiyeden korunduğu ortaya atılmıştır. Bunun yanında, enfeksiyondan sonra 145 güne kadar BTV RNA' nın tespiti, eritrositlerin sığırların BTV' nin doğal rezervuar konakçıları vazifesi görmesine imkan veren kritik mekanizmasının olmasının mümkün olduğu izlenimini veren, ruminant eritrositlerinin ömrü ile dikkati çekecek derecede benzerdir (Brewer ve MacLachlan 1994). Bir başka araştırmada, BTV RNA' sının 222 güne kadar bile tespit edilebileceğini göstermiştir (Bonneau ve ark. 2002).

BT, enzootik bölgelerde genellikle kışlama denilen bir fenomen olan uzun durgunluk süresinden sonra (8 – 12 ay) sonbaharın sonlarına doğru ortaya çıkmaktadır (Takamatsu ve ark. 2003). Bununla birlikte, BTV' nin nakledilmesiyle ilgili konvansiyonel modeller, eğer olumsuz kış koşulları 100 günden daha fazla sürüyorsa, virusun gelecek yıla kadar yaşayamayacağı izlenimini uyandırmaktadır. *Culicoides* vektörünün larvalarında BTV persistansı, göz ardı edilememesine rağmen (White ve ark. 2005), çok mümkün olmadığı düşünülmektedir (Mellor 1990). Bazı yazarlar, tatarcık sokmasıyla alınan, persistan olarak enfekte γδ T hücrelerinin Dorset koyunlarında enfeksiyondan sonra 9 hafta kadar uzun süreyle BTV' nin nakledilmesini

kolaylaştırabildiğini kabul etmişlerdir (Takamatsu ve ark. 2003). Bununla birlikte, bu bulgu, farklı bir koyun ırkı olan Merinos koyununda kullanılan başka bir araştırmayla doğrulanmamıştır (Lunt ve ark. 2006).

2.4.3. BTV' ye selüler yanıt

Viral hemorajik hastalıklar, sadece hücrelere direkt viral hasarın sonucu değil, aynı zamanda şiddetli ve bazen düzenlenmemiş inflamatuvar süreçlerin de sonucudur. BTV, p38 MAP kinaza bağımlı sitoskeletal yeniden düzenlemeyle ilgili in vitro endotelyal elektrik direncini azaltmaktadır (Chiang ve ark. 2006). Buna ilaveten, BTV enfeksiyonları pek çok hücre tipinde hücre ölümüne ve önemli inflamatuvar hücre yanıtına neden olurlar (Schwartz-Cornil ve ark. 2008).

2.4.3.1. Hücre ölümü

Memeli hücrelerinde, BTV hücre hatlarında (Mortola ve ark. 2004), mikrovasküler koyun ve sığır endotelyal hücrelerinde (DeMaula ve ark. 2001) ve WC1 ile aktive γδ T hücrelerinde (Takamatsu ve ark. 2003) hücre ölümüne (apoptozis ve/veya nekroz) neden olmaktadır. Memeli hücre hatlarında BTV kapsidinin soyulması apoptozisi başlatmak için zorunludur, fakat BTV replikasyonu zorunlu değildir (Mortola ve ark. 2004). Viral dış kapsid proteinleri VP2 ve VP5 ile hücre penetrasyon proteini VP5' in bir kombinasyonu ile ekstraselüler muamele, NF-κB' nin aktivasyonunu da içine alan apoptozisi başlatmak için yeterlidir (Mortola ve ark. 2004). Bununla birlikte, virus replikasyonunu destekleyen insekt hücreleri (Mortola ve ark. 2004), γδ T hücre hatları (Takamatsu ve ark. 2003) ve aktive olmuş kan lenfositleri (Barratt-Boyes ve ark. 1992) gibi bazı hücre tipleri BTV' ye karşı sitopatik efekt göstermez. Viroporin aracılı viral çıkış mekanizmasına karşı tomurcuklanma, bu farklılığı kısmen açıklayabilmektedir (Wirblich ve ark. 2006).

2.4.3.2. Sitokinler ve prostanoid indüksiyon

Sığır ve koyun mikrovasküler endotelyal hücrelerinin enfeksiyonu, interlökin 1

(IL-1), IL-8, IL-6, siklooksijenaz-2 ve indüklenebilir nitrik oksid sentazın transkripsiyonunu uyarırlar (DeMaula ve ark. 2002). Bu mediyatörler şiddetli viral hemorajik ateşlerin patogeneziyle ilgili bulunmuşlardır. Koyun ve sığırların BTV ile enfeksiyonu, prostasiklin ve tromboksanın plazmatik artışına neden olur (DeMaula ve ark. 2002). Tromboksan güçlü bir prokoagülan faktördür, oysa ki prostasiklin etkili bir vazodilatör ve platelet agregasyon inhibitörüdür. Sığırlarda, mikrovasküler hasar ve tromboza neden olan BTV' ye karşı daha düşük duyarlılığı açıklayabilen, çok yüksek bir prostasiklin/tromboksan oranı vardır (DeMaula ve ark. 2002).

BTV, aynı zamanda koyunlarda (Foster ve ark. 1991), sığırlarda (MacLachlan ve Thompson 1985) ve farelerde (Jameson ve ark. 1978) in vivo güçlü bir IFN tip I tetikleyicisidir. BTV serotip 8' in bir suşunun, UV ışınına maruz bırakıldığında bile, farelerde in vivo son derece etkili bir uyarıcı olduğu gösterilmiştir (Jameson ve ark. 1978). Pek çok BTV serotip suşunun, hücre koşullarına bağlı olarak IFN uyarma yeteneklerinde farklılıklar olabileceği dışında, IFN uyarıcıları olduğu bildirilmiştir (Fulton ve Pearson 1982). Fare embriyo hücrelerini (Huismans 1969), insan lökositlerini (Jameson ve Grossberg 1978), erişkin koyun lökositlerini (Rinaldo ve ark. 1975) içine alan geniş bir yelpazede hücre tipleri, in vitro BTV uyarısından sonra IFN tip I üretirler. BTV çift iplikçikli RNA' sı da farelerde IFN' u indüklemiştir (Eksteen ve Huismans 1972). Bununla birlikte, indüksiyonda rolü olan kesin viral komponent bilinmemektedir (Schwartz-Cornil ve ark. 2008).

2.5. BTV' ye Karşı İmmün Yanıtlar

Monozigot koyunlara antikorların (Jeggo ve ark. 1984) ve T hücrelerinin (Jeggo ve ark. 1985) transferiyle, hem humoral hem de selüler immün efektör mekanizmalarının BTV enfeksiyonu ve hastalığına karşı koyunları koruyabildiği gösterilmiştir (Schwartz-Cornil ve ark. 2008).

2.5.1. BTV' ye karşı humoral immünite

Pasif serum transfer araştırmaları, BTV spesifik antikorların in vivo antikor-aracılı viral nötralizasyonun rolünü akla getiren serotip spesifik tarzda koruma

sağlayabileceğini göstermiştir (Jeggo ve ark. 1984). Bununla birlikte, antikorların in vivo BTV enfeksiyonuna nasıl engel olduğu tam olarak bilinmemektedir. Çok değişik sistemleri kullanarak hem sığırlar hem de koyunlarda antikorlarla bağlantılı hücrelerin aracılık ettiği sitotoksisitenin (ADCC) ve komplementin yardımcı olduğu antikorlarla bağlantılı hücrelerin aracılık ettiği sitotoksisitenin varlığını kanıtlamak için yapılan teşebbüsler sürekli olarak başarısız olmuştur (Jeggo ve ark. 1983).

Biricik BTV proteinleri olan VP2 ve VP5' in serotip spesifiteyle ilgili majör protein olan VP2 ile birlikte nötralizan antikorlarını indüklediği gösterilmiştir (Lobato ve ark. 1997, Roy ve ark. 1990). Ya eksiksiz partiküllerden izole edilen ya da in vitro ekspresyonla üretilen VP2 ile inoküle edilen koyunlar, virus-nötralize edici antikorlar meydana getirip, homolog BTV serotipiyle çalençe karşı dirençli bulunmuşlardır (Huismans ve ark. 1987, Roy ve ark. 1990). VP2' deki iki hidrofilik domen, AA 199-213 (1. bölge) ve AA 321-346 (2. bölge), multiple konformasyon-bağımlı nötralizasyon epitopları içermektedir (DeMaula ve ark. 2000). Nötralizasyon bakımından mutasyonlar, serotipler arasında en düşük AA özdeşlik seviyesinin de bulunduğu (Maan ve ark. 2007) bu iki bölgede kümelenmiş mutantlardan kurtulurlar (DeMaula ve ark. 2000). İlginç bir şekilde aynı orijinal BTV serotip 17 VP2 proteininin 1. bölgesindeki mutasyonlar, farklı nötralizasyon özellikleri gösteren birlikte sirküle eden 2 suş meydana getirmiştir (Wilson ve ark. 2008).

VP2' nin VP5 ile ya da çift-kabuklu virus benzeri partiküller oluşturmak için kor proteinleriyle birlikte ekspresyonu, tek başına VP2 ile karşılaştırıldığında, inoküle edilen koyunların nötralizasyon antikor yanıtını artırmıştır (Lobato ve ark. 1997, Roy ve ark. 1990, Roy ve ark. 1992, Roy ve ark. 1994). VP5, muhtemelen VP2 üzerine konformasyonal etkisi yüzünden BTV' nin nötralizasyonunu geliştirmiştir (Cowley ve Gorman 1989, Mertens ve ark. 1989). Ayrıca VP5, VP5' in nötralize edici monoklonal antikorları tanımlanmamasına rağmen, doğrudan nötralizan antikorları indükleyebilmektedir (Lobato ve ark. 1997).

Nötralizan antikorlar, iki serotiple koyunların seri enfeksiyonları hayvanları üçüncü bir serotiple çalençe karşı koruyabilmesine rağmen, genellikle sadece homolog virusa karşı korumaktadır (Lobato ve ark. 1997). Serotiplere bağlı olarak antikorlar, VP2' deki sekansların benzerlikleriyle ilişkili olarak sınırlı sayıda diğer serotiplerle enfeksiyona karşı koruyabilirler (Maan ve ark. 2007). VP2 tarafından sağlanan

nötralizan antikorların seviyesi koyunlar arasında büyük ölçüde değiştiği için (Roy ve ark. 1990), outbred bir tür, aşı stratejileri, VP2 ve VP5 antijenlerinin her ikisinin dahil edilmesinden yararlanacaktır (Schwartz-Cornil ve ark. 2008).

2.5.2. BTV' ye karşı hücresel immunite

Nötralizan antikorların düzeyi her zaman canlı BTV ile aşılamadan sonraki koruma derecesi ile uygunluk sağlamaz (Jeggo ve ark. 1984) ve bazı inaktive aşı preparatları nötralizan antikorların algılanabilir seviyelerinin yokluğunda koruma sağlayabilirler (Stott ve ark. 1979). Ayrıca monozigot koyunlara BTV-spesifik sitotoksik T lenfositlerinin (CTL) adoptif tranferinin, CTL' nin korumaya katıldığını gösteren, kısmi koruma sağladığı gösterilmiştir (Jeggo ve ark. 1984, Jeggo ve ark. 1985).

2.5.2.1. Fare ve koyunlarda sitotoksik T hücresi yanıtı

BTV' ye karşı kros-koruyucu immün yanıtın sitotoksik T lenfositlerini gerektirdiğinin delili, hem laboratuvar fare modellerinde (Jeggo ve Wardley 1982, Jones ve ark. 1996) hem de koyunlardan (Jeggo ve ark. 1985, Takamatsu ve Jeggo 1989) elde edilmiştir.

Farelerde, CTL yanıtının istatiksel analizi, non-strüktürel protein peptidlerinin, minör kor iç kapsid proteini VP3 ve son olarak iç kapsid proteini VP7 ve dış kapsid proteinleri VP2 ve VP5 tarafından takip edilen homotipik ve heterotipik CTL tanınmanın predominant kaynağı olduğunu göstermiştir (Jones ve ark. 1996). Serotipler arasında epeyce değişen dış kapsid proteinleri VP2 ve VP5, heterotipik CTL tarafından tanınmamıştır (Jones ve ark. 1996). Ayrıca, Baculovirus aracığıyla ifade edilen NS2, NS1, NS3, VP1, VP4 ve VP6, sadece NS2 halinde homolog proteini ifade eden bir vaksinya virusuna karşı kısmen koruyucu olan, farelerde bir CTL yanıtına yol açmıştır (Jones ve ark. 1997).

Koyunlarda BTV-spesifik kros-reaktif CTL tanımlanmış olup (Jeggo ve ark. 1985), CTL hatlarının homolog ve heterolog virus tipleriyle enfekte deri fibroblastlarında viral replikasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Takamatsu ve Jeggo

1989). BTV antijenlerini ifade eden rekombinant vaksinya virusları, VP2 ve NS1' in majör CTL immünojenleri olduğunu ve NS1-spesifik CTL' nin kros-reaktif olmasına karşılık, VP2-spesifik CTL' nin kros-reaktif olmadığını göstermiştir (Andrew ve ark. 1995). Ayrıca, non-strüktürel protein NS1 rekombinant vaksinya virusları ile immünize edilen tüm Merinos koyunlarının CTL ile tanınırken, VP2, VP3, VP5 ve VP7 sadece bir koyunun CTL ile tanınmıştır (Janardhana ve ark. 1999). NS2 farelerde CTL' ni indüklerken, diğer proteinlerin (NS2, NS3, VP4, VP6) CTL epitoplarını içermediği ortaya çıktı (Jones ve ark. 1997). Bu yüzden, CTL' nin protein hedeflerinde bireyler ve konakçı türleri arasında önemli farklar mevcuttur (Schwartz-Cornil ve ark. 2008).

2.5.2.2. 'Yardımcı' T hücresi yanıtları

Başlıca 'helper' serotip-spesifik determinantlar VP2' de ve bazı VP5' lerde bulunurken, majör serotip kros-reaktif determinantlar kor yapısal proteinleri içinde bulunmaktadır (Takamatsu ve ark. 1992). Koyunlar VP7' yi kodlayan capripox virusla aşılandığı zaman; klinik korunma, virus hala replike olmasına rağmen, heterotipik bağışıklanmaya karşı elde edildi (Wade-Evans ve ark. 1996). Korunmayı indükleyen VP7' yle ilgili immün efektörler muhtemelen CD4 T hücreleriydi, fakat onların direkt fonksiyonel katkısı değerlendirilmedi. Ayrıca, VP7, in vitro priming teknikleri kullanarak antikor üretimi esnasında immünodominanttır, fakat antikorlar nötralize edici olmayıp, muhtemelen koruyucu değillerdir (Collen ve ark. 1992).

2.6. Patoloji ve Post-mortem Bulgular

BT virusundan ölmüş olan bir hayvanın post-mortem görünüşü (genellikle bir koyun) dikkat çekici değildir ve genellikle sadece patognomonik (tanıtsal) lezyonların bulunmayışı bakımından dikkate değerdir. Görülen lezyonlar, genellikle, takip eden ödem, hemoraji, tromboz, iskemi ile sindirim sistemi, müsküler sistem, kardiyovasküler sistem ve solunum sistemini içine alan çok sayıda dokunun nekrozu ile birlikte mikrovasküler sistemde yol açılan şiddetli hasarla ilişkilidirler. Pulmoner arterin tabanındaki tunika mediadaki hemorajiler, BT virus enfeksiyonu için

patognomonik olarak tanımlanmıştır, fakat bu lezyonların görülmesi güç olabilmekte ve koyunların bazı başka enfeksiyonlarında (Rift Valley fever, heartwater ve pulpy kidney disease) da kaydedilmektedir. Koyunlarda görünüşe göre ölümlerin çoğu, ekseriya özofagus kaslarının kısmi paralizine bağlı kusmuğun inspirasyonu ile ilişkilendirilen sekonder (bronş loblarıyla ilgili) pnömoninin sonucu olarak meydana gelmektedir (Mellor 2001, http://www.animalhealthaustralia.com.au/).

2.7. Teşhis ve Ayırıcı Teşhis

Mavidilden etkilenmiş koyunlarda hastalığın klinik belirtiler ve lezyonlara dayanan tahmini bir teşhisi çoğu kez yapılabilmektedir. Bununla birlikte, pek çok ruminant türünün büyük bir kısmında ve aslında koyunların çoğunda BTV enfeksiyonu, genellikle subklinik olur ve laboratuvar doğrulaması (ya virus izolasyonu ile ya da seroloji ile identifikasyon) gereklidir. Aşağıdaki numunelerin istenmesi mümkündür:

1. Virus izolasyonu için kan kullanılacaksa; heparin veya etilen-diamin tetra-asetik (EDTA) gibi antikoagülanların içinde ateşli hayvanlardan mümkün olduğu kadar erken toplanmış ve dondurulmadan soğukta (4°C) saklanmış olmalıdır.*
2. Virus izolasyonu için dokular kullanılacaksa veya enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ya da polymerase chain reaction (PCR) ile antijen tespiti yapılacaksa, dalak ve lenf nodülleri tercih edilir. Bu dokular otopside toplanıp muhafaza edilmeli ve 4ºC de referans laboratuvara nakledilmelidir.
3. Serolojik testler için serum elde edilir. Numuneler tercihen çift olarak 14- 28 günler arasında alınmalı ve - 20ºC de dondurularak tutulmalıdır.

BTV enfeksiyonunun doğrulanması aşağıdakilerden bir yada birkaçının aracılığıyla yapılmaktadır:

1. Arzedilen örneklerden grup-spesifik, antijen-tespit edici ELISA ya da PCR temelli testler aracılığı ile doğrudan virus identifikasyonu,
2. Memede olan farelerde veya embriyolu tavuk yumurtalarında, hücre kültürüne adaptasyonu takiben enfeksiyöz virusun izolasyonu ve grup-spesifik agar jel immünodifüzyon (AGID) veya antijen-deteksiyon ELISA ve daha sonra serotip-spesifik virus-nötralizasyon veya revers-transkripsiyon (RT)-PCR testleriyle ilk

identifikasyon,

3. Grup-spesifik antikor-tespit edici ELISA, AGID ve komplement fikzasyon (CF) testleriyle ya da serotip-spesifik virus-nötralizasyon testiyle BT virus-spesifik antikorların identifikasyonun yapılmaktadır (Mellor 2001, Hamblin 2004).

Diyagnostik laboratuvarların istenilen sonucu elde etmek için mevcut en uygun test metotlarını kullanması gereklidir ve bu yüzden onlar test yararlık ve kısıtlamalarının açık bir yaklaşımına sahip olmalıdırlar. BTV antikor varlığı yönünden serumların test edilmesi aşağıdaki amaçlar yönünden gerekli olabilir:

a) canlı hayvanlar, hayvan ürünleri ve genetik materyallerin güvenli uluslararası ticaretini kolaylaştırmak için,

b) serolojik sürveyans (tarama) için,

c) aşılama kampanyalarını ölçmek için,

d) saha suşlarının serotip identifikasyonu için (Hamblin 2004).

OIE Manual (OIE 2000), uluslararası ticaret için öngörülmüş iki testin, yani, agar jel immunodifüzyon (AGID) (Pearson ve Jochim 1979) ve kompetitif enzyme-linked immunosorbent assay (c-ELISA)' in (Jeggo ve ark. 1992) ana hatlarını açıklamaktadır. Bu testlerin her ikisi de serogrup-spesifiktir. Serogrup-spesifik antikoru ölçmede kullanılan diğer yöntemler, komplement fikzasyon testi (CFT)' ni (Boulanger ve ark. 1967), indirekt veya blocking ELISA' yı (Anderson 1984, Jochim 1985), floresan antikor (Pini ve ark. 1968) ve dot immunoblotting' i (Gupta ve ark. 1990) içine almaktadır. Serotip identifikasyonu için hemaglütinasyon inhibisyon (HI) testinin kullanımı bildirilmesine rağmen (Van Der Walt 1980), serum nötralizasyon (SN) belki de en sık kullanılan tip-spesifik testtir (Hemiman ve ark. 1983, Luedke 1985).

Aşağıdaki koyun hastalıkları mavidilin ayırıcı teşhisinde göz önünde tutulmalıdır (Hamblin 2004):

- kabuklu ağız (contagious pustular dermatitis)
- akut fotosensitizasyon
- ayak çürümesi, ayak apsesi ve diğer ayak hastalıkları yüzünden topallık
- akut haemonchosis (depresyon ve submandibular ödemle birlikte)
- yüz ekzeması (facial eczema)
- Oestrus ovis enfestasyon
- pnömoni

• bitki zehirlenmesi
• Akabane disease (deforme kuzular görüldüğünde)
• Epizootic Hemorrhagic Disease (EHD) virusu ile enfeksiyon
• salmonellosis.
• sheep pox
• foot – and – mouth disease
• peste des petits ruminants/rinderpest.

2.8. Tedavi

Destekleyici tedavi sayılmazsa, mavidilin spesifik bir tedavisi yoktur. Etkilenen hayvanlar özenle bakılıp, kulübelere veya ahırlara yerleştirilmeli, ekstrem sıcaklık ve direkt güneş radyasyonundan korunmalıdır. Bukal lezyonların beslenmeyi güçleştirdiği aşama esnasında az miktarlarda yumuşak taze yiyecek verilmelidir. Sekonder bakteriyel enfeksiyonlar antibiyotik terapisi ile kontrol altına alınabilirler. Konvalesans esnasında ruminal aktivite sürdürülmeli ya da uyarılmalıdır ve bu, tam sağlıklı iyileşme gerçekleşince düşürülmelidir (Mellor 2001)

2.9. Önlem ve Kontrol

Bilinen enfekte bölgelerden virustan yoksun bölgelere ruminantların ve onların jerm plazmalarının ithali kısıtlanmalıdır. Eğer hayvanların ithaline izin verilirse, hayvanlar hareketten önce herhangi bir vireminin sonlanmasını sağlamak için yeterli bir sürece insekt-geçirmez bir yerde karantina altına alınmalıdır. Jerm plazmalar, sadece verici hayvanların örneklerin alındığı esnada enfekte olmadıkları teyit edilebilirse, ithal edilmelidir.

Önceden hastalığın olmadığı bir ülke veya bölgede mavidilin ortaya çıkmasını takiben, virusun daha da bulaşmasını sınırlamak ve eradikasyonu mümkün olduğu kadar çabuk yapmak için girişimler yapılmalıdır. Kontrol önlemlerinin, şüpheli mavi dil tanısının yapılır yapılmaz ve tanının doğrulanmasını beklemeksizin yürürlüğe konulması önemlidir. Epizootik koşullarda aşağıdaki önlemler alınmalıdır:

• Dağ silsileleri ve geniş su alanları gibi topoğrafik özellikleri dikkate alarak

enfeksiyon bölgesinin şekli çizilmelidir,

• Enfekte bölgelerin içine ve dışına, içerideki tüm ruminantların hareketleri önlenmelidir,

• Ruminantlar, yüksek meralara taşınmalı ya da, eğer mümkünse, özellikle *Culicoides* vektörlerinin en önemli aktivite zamanı olan alacakaranlıktan tan vaktine kadar olan süre esnasında insekt-geçirmez binalarda barındırılmalıdırlar. Binaların içerisinde ve hayvanların üzerinde insekt uzaklaştırıcılarının kullanımı, insekt ısırıklarından korunmayı artırabilir.

• Vektör azaltma önlemleri uygulanmalıdır, örneğin, hayvan çiftlikleri ile şüpheli *Culicoides* beslenme yerlerine ve civarına insektisid uygulanması, ıslah edilen su yönetimi ve atıkların imha edilmesi vasıtasıyla beslenme yerlerinin eliminasyonu.

• Mümkün olduğunca erken enfekte hayvanları saptamak için bütün duyarlı koyunların günlük klinik muayenesi. Enfeksiyonun sürmekte olduğu hayvanlar, kesilmeli ya da virusun vektörler aracılığıyla girişini ve daha da yayılımını önlemek için insekt-geçirmez binalarda barındırılmalıdırlar.

• Duyarlı koyunlar, neden olan virus serotiplendirilip, uygun monovalan aşı hazırlanıncaya kadar, polivalan aşılarla derhal aşılanabilir. Bütün aşılanmış hayvanlar tespit edilmelidir.

• Salgından sorumlu olan virus serotipi mümkün olan en kısa sürede belirlenmeli ve uygun bir monovalan aşı üretilip koyunlara verilmelidir.

• OIE tüm hastalık vakalarından hemen haberdar edilmelidir. Mavidil salgınlarının hemen hemen her yıl meydana geldiği enzootik durumlarda ve bölgelerde, koyunların, mavi dil virusunun bilinen tüm lokal serotiplerine karşı etkili, canlı, atenüe polivalan aşılarla düzenli olarak yılda bir kez aşılanması tavsiye edilmektedir. Bununla birlikte, erken gebelik döneminde aşılanan koyunlar abort yapabilmekte ya da sakat kuzular doğurabilmektedirler (Mellor 2001).

2.9.1. Mavidil virusuna karşı aşılar

Mavidile karşı aşı geliştirmek için çok çaba gösterilmiştir. Şu anda ticari olarak elde edilebilen ruminantlarda mavidile karşı koruyucu aşılar, ya atenüe ya da inaktif olabilmektedir. Aşıların koruyucu aktivitesi, muhtemelen B ve T hücresi aracılığıyla

koruyucu immünitedeki VP2 dış proteininin anahtar rolü yüzünden, serotip spesifiktir. Bu yüzden, multiple BTV serotiplerinin mevcut olabileceği endemik bölgelerde birkaç serotipe karşı etkili aşılar gerekli olabilir. Ayrıca, mavidile karşı aşılar güvenli olmalı ve ticareti kolaylaştırmak için, aşılanmış ve enfekte hayvanlar arasında ayırım yapmaya izin vermelidir [DIVA (Differentiating Infected from **Vaccinated** Animals) aşılar]. Bu 3 ihtiyaçtan (multi-serotipler, güvenlik ve DIVA özellikleri) dolayı, BTV' ye karşı aşılama güç ve tartışmalı bir mesele olabilmektedir (Schwartz-Cornil ve ark. 2008).

2.9.1.1. Atenüe aşılar

Onderstepoort Biological Product (Güney Afrika) tarafından üretilen atenüe aşılar, Afrika' nın güneyindeki koyunlarda BT' ı kontrol etmek için uzun zamandan beri ve çok yakın geçmişte Korsika, Balear Adaları ve İtalya' da kullanılmaktadır. Bu aşılar, en azından bir yıl süreyle tek enjeksiyondan sonra kuvvetli koruma sağlamakta olup, az masrafla hazırlanabilirler (Savini ve ark. 2008). Bununla birlikte, bu aşılar, özellikle bazı duyarlı ırklarda olmak üzere, her zaman güvenilir değildir (Veronesi ve ark. 2005). Hakikaten onların atenüasyonunu kontrol etmek güçtür. Enjeksiyondan sonra hafif klinik belirtiler, abortlar, geçici olarak baskılanmış süt üretimi ve semen kalitesinde düşme meydana getirebilirler (Savini ve ark. 2008). Ayrıca bu aşı, aşılanmış koyunlarda iki haftanın üzerinde viremiye yol açtığı için, virulansının ve/veya modifiye virulanslı yeni BTV suşlarına yol açan yabani-tip virus genleri ile yeniden düzenlenmenin reversiyonu açısından potansiyeli olan vektörlere bulaşabilmektedir (Savini ve ark. 2008). Sonuç olarak, atenüe aşılar DIVA aşılar değillerdir. Bütün bu sebeplerden dolayı, başka aşı stratejileri gereklidir (Schwartz-Cornil ve ark. 2008).

2.9.1.2. İnaktif aşılar

İnaktif aşılar, eğer uygun şekilde hazırlanmışlarsa, güvenilir ve koruyucu bir immünite meydana getirebilirler (Savini ve ark. 2008). Bununla birlikte, tek bir aşılama, nötralizan antikorların sadece geçici olarak ortaya çıkarılmasını uyarabilir ve

genellikle birkaç ay süren immünite sağlamak için yetersizdir (özellikle sığırlarda). Her şeye rağmen, iki enjeksiyonla güçlü ve uzun süreli bir immüniteye yol açılabilmektedir (Savini ve ark. 2008). DIVA inaktif BT aşıları teorik olarak mümkündür, fakat henüz geliştirilmemiştir. İnaktif aşıların üretilmeleri masraflı ve kullanımları kısıtlı olmasına rağmen, halen mevcut güvenirlik/etki uyuşumu en iyi olan aşılardır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi, ülkelerin ölü aşılar kullanmalarını tavsiye etmiş (Enserink 2008) ve bu aşılar 2005' den bu yana bazı Avrupa ülkelerinde (Fransa ve İtalya dahil) kullanılmışlardır (Savini ve ark. 2008). Bununla birlikte, mevcut inaktif aşılar bazı serotiplere yönlendirilirler (Schwartz-Cornil ve ark. 2008).

2.9.1.3. Virus benzeri partiküller

BTV yapısal proteinleri, BTV genetik informasyonu olmadan BTV antijeni sunan, virus benzeri partiküller (VLP) olarak kendiliğinden bir araya geldiği insekt hücrelerinde Baculoviruslar tarafından şifrelenen rekombinant proteinler olarak meydana getirilebilmektedir (Roy ve ark. 1992). Bunların bu yüzden doğal olarak güvenilir oldukları düşünülmektedir ve bunlar, yakınlarda yapılan bir çalışmayla laboratuvarda üretilen VLP yığınlarının çok miktarda Baculovirusu indüklediği gösterilmesine (Hervas-Stubbs ve ark. 2007) rağmen, herhangi bir inaktivasyon işlemi gerektirmezler. Klinik yığınlar Baculovirusların varlığı ve sahada insekt vektörlerinde potansiyel replikasyon riskleri yönünden dikkatle kontrol edilmelidir. Her şeye rağmen, VLP, birkaç viral suştan VP2' nin indüklenebilmesinden bu yana, multivalan BT aşılarının üretilmesiyle ümit verici aşı araçlarıdır (Roy ve ark. 1994). VLP' nin homolog BTV ile bulaştırmaya karşı korumada ve kısmen laboratuar deneylerinde heterolog BTV ile bulaştırmaya karşı korumada etkili olduğu gösterilmiştir (Roy ve ark. 1992, Roy ve ark. 1994). VLP' nin yapısal uzun vadeli stabilitesini, üretim/saflaştırma maliyetlerini ve sahada etkinliklerini değerlendirmek için ilave çalışmalar beklenmektedir (Schwartz-Cornil ve ark. 2008).

2.9.1.4. Rekombinant vektörler

Eğer rekombinant vektörler güvenilir, ucuz, DIVA, multi-serotip içerikleri

yönünden esneklerse ve tek seferde uzun vadeli koruyucu immünite sağlıyorlarsa, gelecekteki aşılar olarak geliştirilebilirler. Bu amaçları gerçekleştirmek için yol hala uzun olmasına rağmen, poxvirus-türevli vektörleri kullanarak bazı hazırlayıcı ve gelecek vaat eden araştırmalar yayınlanmıştır. Gerçekten, ilk çalışma VP2 ve VP5 proteinlerini kodlayan vaksinya virusunun ko-enjeksiyonunun (21 gün aralıklarla, 3 enjeksiyon) koyunlarda koruyucu immünite oluşturabileceği gösterilmiştir (Lobato ve ark. 1997). Çok yakın geçmişte, VP2 ve VP5 yönünden optimum hale getirilmiş sentetik genleri ifade eden canarypox temelli bir vektör (22 gün aralıkla, 2 enjeksiyon), yüksek düzeyde nötralizan antikorlara, enfekte koyunların serumlarıyla karşılaştırıldığında VP7' ye karşı farklı bir reaktiviteye (DIVA) ve homolog bağışıklamaya (BTV-17) karşı güçlü bir korunmaya yol açmıştır; böyle bir non-replikatif canarypox vektörü, diğer rekombinant aşılarla dünyanın her tarafında yaygın bir şekilde ve güvenli olarak kullanılmaktadır (Boone ve ark. 2007). Bir de, VP2, VP7, NS1 ve NS3' ü kodlayan replikatif bir capripox (tek enjeksiyon), koyunlarda kısmen koruyucuydu (Perrin ve ark. 2007, Wade-Evans ve ark. 1996). Böylece, rekombinant vektörler DIVA özellikleriyle koruyucu immünite sağlayabilmektedirler, ancak etkili uzun vadeli koruma için hala birkaç enjeksiyon gerektiren etkileri, inaktif aşılarınkine güçbela ulaşmaktadır. Yüksek seviyede ekzojen protein sentezi sağlayan ve güçlü anamneztik kros koruyucu immünite hasıl eden rekombinant vektörlerin, saha uygulamaları için uygun bir gelişime sahip olmaları beklenmektedir (Schwartz-Cornil ve ark. 2008).

2.10. Mavidil Virusu' nun Dünyada ve Türkiye' de Dağılımı

BTV' nun geleneksel olarak, bazı bölgelerde (yani; Kuzey Amerika' nın batısı, Çin ve Kazakistan) 50° kuzey civarına kadar uzayabilmesine rağmen, yaklaşık 35° güneyden 40° kuzeye kadar yayılan geniş bir kuşakta dünyanın dört bir yanında bulunduğu farz edilmektedir (Dulac ve ark. 1989, Zhang ve ark. 1999, Lundervold ve ark. 2003). Genellikle bu dağılım, BTV' nin *Culicoides* vektörlerinin dağılımının ve

vektörlerde ve vektörler aracılığı ile nakilde BTV replikasyonu için gerekli olan sıcaklığın bir yansımasıdır (Mellor ve ark. 2008).

Avrupa' da bir süre önceye kadar yukardaki koşullar görünüşte sadece Portekiz, Güneybatı İspanya, Anadolu Türkiyesi ve Kıbrıs' a bitişik birkaç Yunan Adası' nın bazı kesimlerinde görülüyordu, çünkü; 1990 yılından önce buraları deneyimli BTV' na sahip olan biricik bölgelerdi. 1956–1960 yılları arasında BTV-10 Kuzey Afrika' dan Portekiz ve güneybatı İspanya' ya girip, yaklaşık olarak 180000 koyunun ölümüne neden olurken (Manso-Ribeiro ve Noronha 1958, Campano Lopez ve Sanchez Botija 1958, Gorman 1990), 1979–1980 yılları esnasında BTV-4 özetle Rodos ve Midilli Yunan Adaları' na girmiştir (Vassalos 1980, Dragonas 1981). Kıbrıs' ın, BTV' nin düzenli olarak bulunduğu Avrupa' nın biricik bölgesi olduğu görülmüştür (Sellers 1975). Bununla birlikte, 1990 yılının sonlarında Avrupa, BT' ın epidemiyolojisinde dramatik bir değişikliğe şahit olmuştur (Mellor ve ark. 2008).

BTV, Türkiye' de ilk kez 1977 yılında Batı Anadolu Bölgesi' ndeki Aydın ilinde bildirildi (Yonguç ve ark. 1982). BTV-4' e bağlı salgın 1979' a kadar persiste kalıp, Çanakkale, Balıkesir, Manisa, Denizli' yi içine alan batı Anadolu illerini ve Antalya artı Karadeniz sahilindeki Kocaeli' yi kapsayacak şekilde yayıldı (Ertürk ve ark. 2004). Salgının 1980' nin sonuna kadar sona erdiği, esas olarak yerel olarak hazırlanmış atenüe bir aşı kullanımıyla kontrol edildiği düşünülmesine rağmen, aşılanmamış olan sığırlarda BTV aktivitesinin serolojik kanıtı en azından 1982 ve muhtemelen 1988' e kadar sürmüştür (Burgu ve ark. 1992). Türkiye' nin Anadolu bölgesindeki bu salgınlar esnasında hiçbir zaman ülkenin Avrupa bölgesinden BTV salgınları bildirilmemiştir. 1999 Temmuz' unda Bulgaristan ve Yunanistan karasına sınır oluşturan iki ildeki (Edirne ve Kırklareli) hayvanları içine alan Trakya' da bir BTV istilası bildirilmiştir (Anonymous 1999b). Ondan sonra Ekim ve Kasım 1999' da Anadolu' nun batı kesimlerindeki dört ilde (İzmir, Aydın, Manisa ve Denizli: Anon 1999d) varsayılan salgında ilk kez BT bildirilmiştir. 2000 Ağustos' unda batı Anadolu (İzmir)' da BT tekrar bildirildi, fakat bu defa BTV-16 serotipi izole edildi (Anonymous 2000c). 2003 ' de Trakya' daki 5 ilde ve Anadolu' daki 24 ilde (batıda 6, kuzeydoğuda 8 ve güneydoğuda 10 ilde) sığırlarda serolojik bir araştırma yapıldı. Bazı bölgelerde % 90' a kadar seroprevalans oranları tespit edildi. BTV-4, -9 ve -16' ya karşı serum nötralizasyon testleri, her üç serotipin 2003' de Anadolu' da aktif

olduğunu ve BTV-9 ve -16' nın Avrupa Türkiyesi (Trakya)' nde de aktif olduğunu göstermiştir (Avrupa Birliği (EU) Projesi Final Raporu QLK2-CT-2000-00611' e bakılabilir). Kontrol; klinik sürveyans, hayvan hareketlerinin kısıtlanması ve BTV-4' e karşı lokal olarak hazırlanmış atenüe virus aşısının kullanımı yoluyla yerine getirilmiştir (Mellor ve Wittmann 2002).

2.11. Koyunlarda BTV Enfeksiyonu Üzerine Dünya' da ve Türkiye' de Yapılan Araştırmalar

Hindistan' ın Rajasthan, Haryana, Uttar Pradesh ve Andhra Pradesh eyaletlerindeki çiftlikler ve mezbahalardan toplanan 669 kan serumu örneği BTV' ye karşı antikorlar yönünden AGPT ile kontrol edilerek; koyunlarda %11.6, sığırlarda %3.7, keçilerde ise %3 seropozitivite oranlarıyla birlikte, yerli koyun ırklarının yabancı koyun ırklarına göre daha düşük antikor prevalanslarına sahip oldukları belirlenmiştir (Bandyopadhyay ve Mallick 1983).

Gibbs ve ark. (1983) yedi Karayip ve iki Güney Amerika ülkesindeki sığır, koyun ve keçilerden elde ettikleri toplam 6250 kan serumu örneğini mavidil virusuna karşı antikorlar yönünden AGID testine tabi tutarak, toplam antikor prevalanslarını sığırlarda %70, koyunlarda %67 ve keçilerde %76 olarak belirlemişlerdir.

Brako ve ark. (1984), 1982 yılında Louisiana (ABD)' nın güneybatı ve güneydoğusunda bulunan sağlıklı koyun sürülerinden topladıkları kan serumu örneklerini BHV-1, BVDV, PIV-3, goat respiratory syncytial virus (GRSV) antikorları yönünden mikronötralizasyon testi (MNT) ile, bovine leukemia virus (BLV) ve bluetongue virus (BTV) antikorları yönünden de immünodifüzyon ile teste tabi tutarak, 158 koyun kan serumunun 21' inin (%13.3) seropozitif olduğunu belirlemişlerdir.

Goyal ve ark. (1988), ABD' de 379 sağlıklı koyundan topladıkları kan serum örneklerini AGID testini kullanarak BTV antikorları yönünden teste tabi tutmuşlar ve bütün koyunların BTV antikorları yönünden seronegatif olduğunu bildirmişlerdir.

Stott ve ark. (1989), Meksika' nın 6 eyaletindeki koyunlardan elde ettikleri kan serumu örneklerini AGID kullanarak BTV antikorları yönünden teste tabi tutmuşlar ve %9 seropozitivite oranı belirlemişlerdir.

Mehrotra ve ark. (1991), Hindistan' ın Tamil Nadu eyaletinden topladıkları 53 koyun kan serumunu BTV antikorları yönünden AGPT ile teste tabi tutarak, 10 serumu (%18.8) pozitif olarak belirlemişlerdir.

Akhtar ve ark. (1997), Pakistan' ın Kuzey Batı Sınır Eyaleti' nin kuzey kesimlerindeki 38 koyun sürüsünden topladıkları 380 kan serumu örneğini c-ELISA ile teste tabi tutarak, 184' ünde (%48.4) BTV seropozitif reaksiyonlar elde etmişlerdir.

Di Ventura ve ark. (2004) Arnavutluk' ta 2002 yılında gerçekleştirdikleri serolojik sürveyans çalışmalarında, 857 sığır ile 870 koyun ve keçiden serum örneklerini c-ELISA ile mavi dil virus antikorları yönünden teste tabi tutarak, toplam seroprevansı sığırlarda %18.9, koyun ve keçilerde %4.4 bulmuşlardır.

2002 yılında Bosna' da koyun sürülerinde mavi dil klinik semptomları kaydedilmesi üzerine; toplam 9599 serum örneği (koyun: 8967; sığır: 632), c-ELISA ve standart agar gel immünodifüzyon (AGID) testlerini kullanarak mavi dil virus antikorlarının varlığı yönünden teste tabi tutulmuşlardır. C-ELISA' nın 187 örnekte (%1.94), AGID testinin 141 örnekte (%1.53) BTV-seropozitif reaksiyonlar gösterdiği ve pozitif serumların tamamının Bosna-Hersek' in nehir bölgelerinden toplandığı bildirilmiştir (Velić ve ark. 2004).

Lundervold ve ark. (2004), Kazakistan' da BTV enfeksiyonu hakkında ilk serolojik araştırma sonuçlarını bildirmişlerdir. Araştırıcılar, ülkelerinin hemen hemen her tarafındaki 279 sığır, 542 koyun, 137 keçi ve 513 yabani saiga antilopundan topladıkları kan örneklerini ELISA ile analiz etmişler ve sığırlarda %25.4, koyunlarda %21.4, keçilerde %25.5 ve saiga' larda %0 seroprevalans tespit etmişlerdir.

Ravishankar ve ark. (2005), Hindistan' ın Kerala eyaletinin 14 farklı bölgesindeki 109 koyun ve 901 keçi olmak üzere toplam1010 hayvandan topladıkları kan serumu örneğini dot ELISA ile teste tabi tutmuşlar ve koyunlarda %8.25, keçilerde %5.3 seroprevalans tespit etmişlerdir.

Jafari Shoorijeh ve ark. (2008) İran' ın Batı Azerbaycan Eyaleti' ndeki

koyunlarda BTV enfeksiyonunun dağılımını ve seroprevalansını tanımlamak amacıyla yaptıkları çalışmalarında; 1153 koyun serumundan 400' ünün (%34.7) BTV' ye karşı antikorlar içerdiğini ve 184 sürüden 172' sinin (%93.5) BTV seropozitif koyunları içerdiğini kompetitif ELISA ile belirleyerek, enfeksiyonun eyalette yaygın olduğu sonucuna varmışlardır.

Burgu ve ark. (1984) Tahirova Devlet Üretme Çiftliği' ndeki 52 koyunda MNT ile gerçekleştirdikleri serolojik taramada, bütün serumların BTV antikorları yönünden seronegatif olduğunu rapor etmişlerdir.

Bolat (1986), Türkiye'de Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerindeki 1290 koyundan elde ettiği kan serumu örneklerini SNT ve AGID testleri ile inceleyerek, 273 koyunu (%21) BTV' ye karşı seropozitif olarak belirlemiştir.

Öztürk ve ark. (1987), Konya Çiftlik Hayvanları Araştırma Merkezi' nden elde ettikleri 86 koyun serum örneğini incelemişlerdir. Araştırıcılar, bu serumları BTV SA_4 tipine karşı nötralizan antikorların varlığını belirlemek için SNT ile incelemişler ve %36.04 seropozitiflik tespit etmişlerdir.

Girgin ve Yonguç (1988), SNT ile Batı Anadolu bölgelerindeki koyunların %46'sında ve keçilerin %44'ünde BTV' una karşı nötralizan antikor varlığı tespit etmişlerdir.

Burgu ve ark. (1992) Türkiye' nin Güney, Güneydoğu ve Ege bölgelerindeki illerden örnekledikleri koyun ve sığırlarda, mavidil seropozitiflik oranını koyunlarda %25.5, sığırlarda ise %15.5 olarak belirlemişlerdir.

Yavru ve ark. (1999), Bala Tarım İşletmesinden 115 adet sağlıklı koyundan topladıkları serum örneklerini MNT ile incelemişler ve 29'unu (%25.21) seropozitif bulmuşlardır.

Bulut ve ark. (2006), Türkiye' nin Konya, Burdur illeri ve bu illerin civarlarındaki çiftlik hayvanlarından topladıkları toplam 562 adet koyun ve keçi kan serumu örneğini ELISA ve serum nötralizasyon testi (SNT) ile mavidil virus antikorları yönünden test etmişlerdir. Konya' dan elde edilen 315 koyun serum örneğinden 54' ünü (%17.1) ve Burdur' dan elde edilen 66 koyun serum örneğinden 1' ini (%1.5) seropozitif olarak belirlemişlerdir.

Türkiye' nin güneydoğusundaki 82 Kursaklı Ceylan, 684 koyun ve 100 sığırda Mavidil virusuna spesifik antikorların ortaya konulması amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada; ceylan, koyun ve sığırlarda seropozitivite oranları, sırasıyla, %40.2, %29.5 ve %88 olarak saptanmıştır (Gür 2008).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kan örnekleri

Bu araştırmada Konya bölgesindeki özel hayvancılık işletmelerinde bulunan klinik olarak sağlıklı, aşılanmamış 460 adet koyundan, serum hazırlamak amacıyla kan örnekleri toplandı.

3.2. Metot

3.2.1. Kan serum örneklerinin hazırlanması

Kan örnekleri, katkısız vakumlu sistem kan alma tüplerine (vacutainers) kuyruk veninden alındı. Örnekler bir gece boyunca +4ºC' de tutuldu ve 30 dk süresince 2500-3000 rpm' de santrifüj edilmesinden sonra serumlar alındı ve 30 dk süreyle 56ºC' de bir su banyosuna konuldu, soğumaya bırakıldı ve daha sonra ihtiyaç duyuluncaya kadar –20ºC' de saklandı.

3.2.2. Kompetitif enzyme linked immunosorbent assay (cELISA)

Hazırlanan koyun kan serumları kompetitif ELISA (c-ELISA) tekniği ile mavidil virusu (bluetongue virus, BTV) antikorları yönünden kontrol edildi. Bu amaçla, VMRD Inc. (Pulman, ABD) firması tarafından geliştirilmiş ticari c-ELISA kiti kullanıldı. Test, kit prosedürüne göre uygulandı. Her bir test pleytine bilinen pozitif ve negatif kontroller dahil edildi. Bütün örnekler iki nüsha çalışıldı. Her bir gözün optik dansitesi (OD), ELISA mikropleyt okuyucu (Anthos II, Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria) kullanarak 620 nm dalga boyunda belirlendi. Test edilen serum örneklerinin OD' si negatif kontrolün OD değerinin %50' sinden daha düşükse pozitif, serum örneklerinin OD' si negative kontrolün OD değerinin %50' sine eşit veya daha büyükse negatif olarak kabul edildi.

3.2.2.1. Genel bilgiler

Kompetitif enzyme-linked immunosorbent assay (c-ELISA), ruminant serumlarında bluetongue virus antikorlarını saptamaktadır. Örnek serum bluetongue virus antikoru, horseradish peroxidase (HRP) ile işaretlenmiş bluetongue virus-spesifik monoklonal antikorun plastik gözlere kaplanmış bluetongue viral antijenine

bağlanmasını inhibe etmektedir. HRP ile işaretli monoklonal antikor konjugatının bağlanması, enzim substratının eklenmesiyle tespit edilir ve takip eden renk ürün gelişmesiyle miktarı belirlenir. Güçlü renk gelişimi, HRP ile işaretli monoklonal antikor bağlanmasının hemen hemen hiç bloke edilmediğini ve bu yüzden örnek serumlarda bluetongue virus antikorunun bulunmadığını gösterir. Solid faz üzerindeki antijene monoklonal antikor bağlanmasının inhibisyonu yüzünden zayıf renk gelişimi, örnek serumlarda bluetongue virus antikorlarının varlığını gösterir.

3.2.2.2. Kit bileşenleri

Komponent	**Katalog No (287-5)**
A Antijenle Kaplanmış Pleytler	5 pleyt
B Pozitif Kontrol	4 ml
C Negatif Kontrol	4 ml
D Antikor-Peroksidaz Konjugat	16 ml
E 50 X Yıkama Solüsyonu Konsantre	60 ml
F Substrat Solüsyonu	30 ml
G Durdurma Solüsyonu	30 ml

Bunlar, örnek identifikasyonları ve sonuçları kaydetmek için Setup Record (Şk. 3.1)' a yerleştirilir.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Tarih:……Hasta No:……Kit Seri No:…….. …. Katalog No: 287-5

Şekil 3.1. Setup Record

3.2.2.3. Gerekli fakat test kitine dahil edilmeyen materyaller

Tek ve çok kanallı ayarlanabilir hacimli pipetler ve tek kullanımlık plastik uçlar. Deney tüpleri veya antijen kaplı olmayan transfer pleytleri. 620, 630 veya 650 nm filtreli ELISA mikropleyt okuyucu ya da spektrofotometre. Deiyonize veya distile su. Kağıt havlular. Çok kanallı pipet rezervuarları. Mezür. El ile idare edilen multikanal yıkama aleti veya otomatik pleyt yıkayıcı. Saat.

3.2.2.4. Muhafaza ve stabilite

Bütün ayıraçlar dondurulmadan 2-7°C' de muhafaza edilir. Ayıraçlar talimata göre muhafaza edildiğinde son kullanma tarihine kadar stabil kalırlar. Kutunun üzerinde yazılan son kullanma tarihini geçmiş test kiti kullanılmaz.

3.2.2.5. C-ELISA için ön hazırlık

a) Ayıraçları ısıtma**:** Teste başlamadan önce serum örnekleri, ayıraçlar ve pleytler oda sıcaklığına getirilir.

b) Kontrolleri ve numuneleri yerleştirme: Test edilecek serum örneklerine bakmadan, Pozitif ve Negatif Kontrolleri iki kopye halinde kullanılır. Pleytlerin tamamı kullanıldığında, en iyisi pleytin farklı kısımlarındaki gözlere kontrolleri koymaktır. Kontroller her pleytte kullanılmalıdır. İlişikteki Setup Record' un bir fotokopisi üzerine kontrol ve serum örneklerinin numaraları girilir.

c) Pleytleri hazırlama: Pleytler folyo poşetlerinden (**A**) çıkarılır. Eğer

uygulanabilirse: kullanılmayan herhangi bir strip poşete tekrar konulup sımsıkı kapatılır. Çerçevede kullanılacak stripler ve Setup Record ile uyumu sürdürmek için her bir stripin üstündeki sayı yerleştirilir. Stripler, yıkama esnasında çerçeveden düşebilme ihtimaline karşı her zaman işaretlenmelidir.

d) Konjugat hazırlama: Antikor-Peroxidase Konjugatı (**D**) kullanıma hazırdır. Hiçbir sulandırma gerekli değildir.

e) Yıkama solüsyonunu hazırlama: 49 kısım deiyonize veya distile suyla 1 kısım Konsantre 50 X Yıkama Solüsyonu (**E**) sulandırılarak, 1X Yıkama Solüsyonu hazırlanır. Göz başına yaklaşık 1 ml gereklidir. Rezervuarlar, tubing, pipetleme için ekstra miktar ayrılır.

f) Serum örneklerini hazırlama: Serum örnekleri sulandırılmadan test edilir.

3.2.2.6. Test prosedürü

1) Kontrolleri ve serum örneklerini yükleme: 25 µl' lik bir pipet seti kullanarak, kontroller ve serum örnekleri Setup Record' a göre Antijenle Kaplanmış Pleyt (**A**)' e transfer edilir. Örneklerin gözlerin dibini kapladığından emin olmak için toplam 14 vuruş olmak üzere yüklü test pleytinin uzun kenarlarının her birine 7 kez sertçe vurulur. Örneklerin gözden göze sıçramaması için itina gösterilir. Pleyt, kapağı kapatılmadan oda sıcaklığında (21-25°C) 15 dk inkübe edilir.

2) Konjugat ekleme: 15 dk inkübasyondan sonra, her bir göze 25 µl Antikor-Peroxidase Konjugat (**D**) ilave edilir. Toplam 14 vuruş olmak üzere pleytin uzun kenarının her birine 7 kez sertçe vurularak pleyt içeriği karıştırılır. Kapağı kapatılmadan oda sıcaklığında (21-25°C) 15 dk daha inkübe edilir.

3) Gözleri yıkama: İkinci 15 dk inkübasyondan sonra, pleyt 3 kez yıkanır:

Eğer otomatik bir yıkayıcı kullanılırsa, pleyt yıkama aletine yerleştirilir

ve her defasında gözleri 1X Yıkama Solüsyonu ile doldurularak pleyt 3 kez yıkanır.

Eğer elle yıkama yapılırsa, gözlerin içeriği lavaboya boşaltılır ve her defasında temiz bir bölgeye vurularak, tersine çevrilmiş pleyt temiz bir kağıt havlunun üzerinde 4 kez sertçe çarpılarak kalan serumlar ve kontroller uzaklaştırılır. Dağıtıcılı (Manifoldlu) repeating şırınga kullanılarak her bir göz 1X Yıkama Solüsyonu ile hemen doldurulur, şişe ya da çok kanallı pipet yıkanır. Yıkama Solüsyonu boşaltılır ve tersine çevrilmiş pleyt yukardaki gibi temiz bir kağıt havlunun üzerine sertçe çarpılır. Yıkama işlemi 2 kez daha tekrarlanır (toplam 3 yıkama).

4) Substrat solüsyonunu ekleme: Her bir göze 50 µl Substrat Solüsyonu (**F**) eklenir. Substratın gözlerin dibini kapladığından emin olmak için toplam 14 vuruş olmak üzere yüklü test pleytinin uzun kenarlarının her birine 7 kez setçe vurulur. Kapağı kapatılmadan oda sıcaklığında (21-25°C) 15 dk inkübe edilir. Pleyt direkt güneş ışığına bırakılmaz. Gözler boşaltılmaz.

5) Durdurma solüsyonunu ekleme: Her bir göze 50 µl Durdurma Solüsyonu (**G**) eklenir. Toplam 14 vuruş olmak üzere pleytin uzun kenarlarının her birine 7 kez sertçe vurarak göz içeriği karıştırılır. Gözler boşaltılmaz.

6) Test sonuçlarının okunup kaydedilmesi: Durdurma Solüsyonu' nu ekledikten hemen sonra, pleyt bir pleyt okuyucusunda okunmalıdır. Optik dansite 620, 630 veya 650 nm dalga boyunda okunmaya ayarlanır. Okuyucu on air' de durdurulup pleytler okunur. Bazı okuyucular durdurmak için pleytin üzerinde boş bir göze ihtiyaç duyarlar. Bu durumda, bu göze hiçbir ayıraç eklenmemelidir.

7) Artan bütün kit ayıraçları muhafaza için tekrar 2-7°C' ye taşınır.

3.2.2.7. Testin geçerliliği

- Negatif kontrollerin ortalaması, 0.300' den daha büyük ve 2.000' den daha

küçük bir optik dansite vermelidir.

• Pozitif kontrollerin ortalaması, Negatif Kontroller' in ortalamasından daha küçük ya da % 50 (yarısı)' ne eşit bir optik dansite vermelidir.

3.2.2.8. Sonuçların değerlendirilmesi

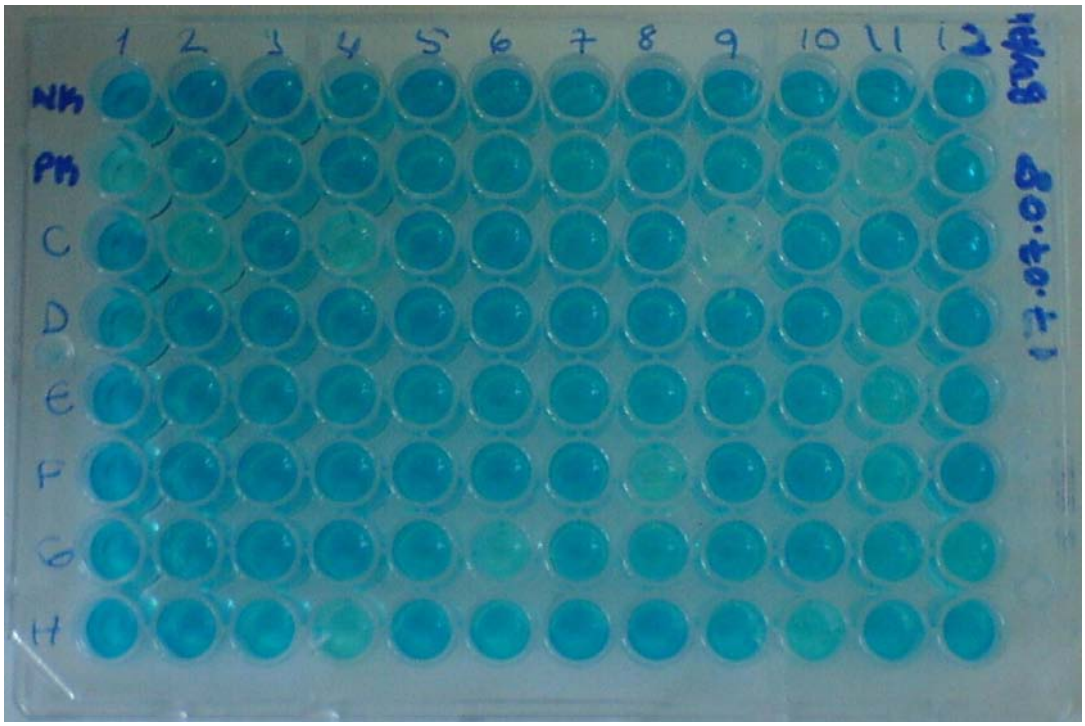
• Test serumları, Negatif Kontroller' in ortalamasının % 50' sinden daha küçük bir optik dansite gösterirlerse, pozitiftirler.

• Negatif Kontroller' in ortalamasının % 50' sinden daha büyük ya da % 50' sine eşit optik dansite gösteren test serumları, negatiftirler.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Konya bölgesinde kapalı işletme modeli uygulanan, özel hayvancılık işletmelerinde bulunan klinik olarak sağlıklı, aşılanmamış 460 adet koyundan tesadüfi örnekleme metodu ile kan örnekleri alındı. Toplanan kan serumu örnekleri, ticari

kompetitif-ELISA ile BTV' ye karşı antikor varlığı yönünden incelendi (Şekil 4.1). Araştırma sonucunda, 460 koyun serumunun 46' sında (%10) BTV' ye özgü antikor varlığı saptandı (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1. ELISA sonuçları (Reaksiyon durdurulduktan sonra)

Çizelge 4.1. C-ELISA testi sonuçları

Serum No	Sonuç	Optik Dansite
1	-	0,321
2	+	0,309
3	+	0,111
4	-	0,327
5	-	0,372
6	+	0,111
7	+	0,155
8	+	0,267
9	+	0,276
10	-	0,778
11	-	0,485

12	-	0,887
13	+	0,259
14	-	0,935
15	-	0,768
16	+	0,236
17	+	0,311
18	-	0,823
19	-	0,749
20	-	0,776
21	-	0,760
22	-	0,656
23	-	0,742
24	-	0,738
25	-	0,784
26	-	0,699
27	-	0,665
28	-	0,791
29	-	0,820
30	-	0,738
31	-	0,742
32	-	0,788
33	-	0,735
34	-	0,836
35	-	0,685
36	+	0,337
37	-	0,755
38	+	0,266
39	-	0,709
40	-	0,745
41	-	0,759
42	-	0,840
43	-	0,713
44	-	0,708
45	-	0,698
46	-	0,801
47	-	0,881
48	-	0,753
49	-	0,768
50	-	0,745
51	-	0,724
52	-	0,674
53	-	0,689
54	-	0,662
55	-	0,727

56	-	0,551
57	-	0,810
58	-	0,706
59	-	0,670
60	-	0,677
61	-	0,624
62	-	0,572
63	-	0,685
64	-	0,748
65	-	0,790
66	-	0,697
67	-	0,725
68	-	0,705
69	-	0,617
70	-	0,661
71	-	0,705
72	-	0,626
73	-	0,679
74	-	0,626
75	-	0,716
76	-	0,681
77	-	0,632
78	-	0,551
79	-	0,691
80	-	0,624
81	-	0,637
82	-	0,666
83	-	0,611
84	-	0,621
85	-	0,632
86	-	0,708
87	-	0,683
88	-	0,584
89	-	0,719
90	-	0,691
91	-	0,741
92	-	0,699
93	-	0,566
94	-	0,662
95	-	0,675
96	-	0,644
97	-	0,465
98	-	0,647
99	-	0,623

100	-	0,651
101	-	0,466
102	-	0,534
103	-	0,670
104	-	0,571
105	-	0,606
106	-	0,705
107	-	0,677
108	-	0,562
109	-	0,637
110	-	0,567
111	-	0,622
112	-	0,696
113	-	0,710
114	-	0,770
115	-	0,673
116	-	0,491
117	-	0,609
118	-	0,606
119	-	0,693
120	-	0,585
121	+	0,250
122	-	0,621
123	-	0,703
124	-	0,667
125	-	0,620
126	+	0,150
127	-	0,694
128	-	0,699
129	-	0,686
130	-	0,616
131	+	0,265
132	-	0,648
133	-	0,704
134	-	0,718
135	-	0,634
136	-	0,562
137	-	0,683
138	-	0,675
139	-	0,681
140	-	0,467
141	-	0,735
142	-	0,741
143	-	0,565

144	-	0,626
145	+	0,297
146	-	0,575
147	-	0,653
148	-	0,802
149	-	0,897
150	-	0,862
151	-	0,927
152	-	0,794
153	-	0,710
154	-	0,784
155	-	0,610
156	-	0,886
157	-	0,790
158	-	0,810
159	-	0,819
160	-	0,804
161	-	0,793
162	-	0,831
163	-	0,804
164	-	0,811
165	-	0,949
166	-	0,920
167	-	0,748
168	-	0,935
169	-	0,908
170	-	0,905
171	-	0,758
172	-	0,782
173	-	0,869
174	-	0,954
175	-	0,764
176	-	0,942
177	-	0,621
178	-	0,956
179	-	0,943
180	-	0,830
181	-	0,926
182	-	0,917
183	-	0,828
184	-	0,844
185	-	0,906
186	-	0,670
187	-	0,975

188	-	0,493
189	-	0,585
190	-	0,598
191	-	0,453
192	-	0,514
193	-	0,555
194	-	0,575
195	-	0,517
196	-	0,603
197	-	0,540
198	-	0,515
199	-	0,610
200	-	0,377
201	-	0,578
202	-	0,490
203	-	0,494
204	-	0,486
205	-	0,583
206	-	0,540
207	-	0,682
208	-	0,605
209	-	0,502
210	-	0,462
211	-	0,421
212	-	0,584
213	-	0,534
214	-	0,552
215	-	0,580
216	-	0,557
217	-	0,684
218	-	0,594
219	-	0,576
220	-	0,513
221	-	0,422
222	-	0,514
223	-	0,466
224	-	0,535
225	-	0,490
226	-	0,628
227	-	0,435
228	-	0,597
229	-	0,521
230	-	0,566
231	-	0,518

232	-	0,479
233	-	0,567
234	-	0,576
235	-	0,542
236	-	0,555
237	-	0,562
238	-	0,539
239	-	0,722
240	-	0,549
241	-	0,582
242	-	0,569
243	-	0,589
244	-	0,539
245	-	0,555
246	-	0,612
247	-	0,511
248	-	0,473
249	-	0,513
250	-	0,449
251	-	0,544
252	-	0,530
253	-	0,610
254	-	0,710
255	-	0,638
256	-	0,742
257	-	0,609
258	-	0,642
259	-	0,583
260	-	0,516
261	-	0,548
262	-	0,528
263	-	0,567
264	-	0,456
265	-	0,528
266	-	0,563
267	-	0,574
268	-	0,548
269	-	0,690
270	-	0,625
271	-	0,509
272	-	0,735
273	-	0,567
274	-	0,629
275	-	0,549

276	-	0,602
277	-	0,656
278	-	0,678
279	-	0,578
280	-	0,600
281	-	0,449
282	-	0,610
283	-	0,629
284	-	0,724
285	-	0,671
286	-	0,958
287	-	0,681
288	-	0,636
289	-	0,601
290	-	0,647
291	-	0,687
292	-	0,671
293	-	0,689
294	-	0,690
295	-	0,764
296	-	0,829
297	-	0,651
298	-	0,618
299	-	0,777
300	-	0,670
301	-	0,645
302	-	0,856
303	-	0,770
304	-	0,766
305	-	0,783
306	-	0,682
307	-	0,726
308	-	0,651
309	-	0,734
310	-	0,790
311	-	0,901
312	-	0,824
313	-	0,622
314	-	0,790
315	-	0,735
316	-	0,666
317	-	0,806
318	-	0,640
319	-	0,642

320	-	0,677
321	-	0,821
322	-	0,763
323	-	0,642
324	-	0,714
325	-	0,695
326	-	0,645
327	-	0,771
328	-	0,641
329	+	0,327
330	+	0,553
331	-	0,713
332	-	0,674
333	-	0,824
334	-	0,782
335	-	0,975
336	-	0,912
337	-	0,879
338	-	0,925
339	-	0,731
340	-	0,755
341	-	0,912
342	-	0,739
343	-	0,661
344	-	0,676
345	+	0,398
346	-	0,861
347	-	0,685
348	-	0,615
349	-	0,734
350	+	0,383
351	-	0,650
352	-	0,691
353	-	0,809
354	+	0,548
355	-	0,871
356	-	0,690
357	-	0,727
358	-	1,576
359	-	0,673
360	+	0,587
361	-	0,786
362	-	0,642
363	+	0,568

364	+	0,583
365	+	0,117
366	-	0,748
367	-	0,657
368	-	0,615
369	-	0,843
370	-	0,724
371	-	0,628
372	+	0,522
373	+	0,548
374	+	0,538
375	+	0,590
376	-	0,743
377	-	0,752
378	-	0,696
379	+	0,453
380	+	0,251
381	-	0,656
382	+	0,586
383	-	0,750
384	+	0,405
385	+	0,355
386	-	0,722
387	-	0,748
388	-	0,703
389	-	0.679
390	+	0,544
391	-	0,649
392	-	0,667
393	+	0,550
394	-	0,695
395	+	0,532
396	-	0,691
397	-	0,714
398	+	0,317
399	-	0,754
400	+	0,317
401	-	0,847
402	-	0,743
403	-	0,752
404	-	0,618
405	-	1,088
406	+	0,526
407	-	0,786

408	+	0,394
409	-	0,699
410	-	0,811
411	-	0,775
412	+	0,425
413	-	0,728
414	+	0,426
415	-	0,956
416	-	1,612
417	-	1,271
418	-	1,253
419	-	1,245
420	-	0,910
421	-	0,946
422	-	0,822
423	-	1,155
424	-	0,824
425	-	1,190
426	-	0,907
427	-	1,372
428	-	0,854
429	-	0,755
430	-	0,759
431	-	0,702
432	-	0,781
433	-	0,892
434	-	0,808
435	-	0,820
436	-	0,728
437	-	0,819
438	-	0,728
439	-	0,730
440	-	0,687
441	-	0,969
442	-	0,698
443	-	0,733
444	+	0,564
445	+	0,614
446	-	0,740
447	-	0,765
448	-	0,721
449	-	0,649
450	-	0,642
451	-	0,821

452	+	0,513
453	-	0,790
454	-	0,781
455	-	0,715
456	+	0,532
457	-	0,794
458	-	0,635
459	-	0,683
460	-	0,698

OIE Manual' ın (OIE 2000) uluslararası ticaret için öngörmüş olduğu AGID testi, c-ELISA ve serum nötralizasyon testi (SNT) BT enfeksiyonunun indirekt teşhisinde en sık kullanılan yöntemlerdir. c-ELISA ve AGID testleri serogrup-spesifik, SNT ise tip-spesifiktir (Hamblin 2004). AGID testinin sensitivite eksikliği (Gustafson ve ark. 1992, Pearson ve ark. 1992) ve ayrıca diğer *Orbivirus* serogruplarıyla, özellikle de *epizootic haemorrhagic* disease virusu (EHDV) ile gösterebildiği kros-reaksiyonlar (Pearson ve ark. 1992), testin süregelen kullanımını tartışmaya açık kılmaktadır (Hamblin 2004). Araştırıcıların BT serotipe özgü antikorları tespit etmede sıklıkla kullandıkları SNT' nin ise, diğer *Orbivirus* serogruplarıyla kros-reaksiyon göstermediği için son derece sensitif ve spesifik olduğu düşünülmektedir. Ancak bu test, zaman alıcı, ayıraçların pahalı olması ve test serumlarının kalitesinin hücreleri etkileyebilmesi nedeniyle rutin denemede genellikle kullanılmamaktadır (Hamblin 2004). Son zamanlarda, BT' nin control amaçlı teşhisinde tavsiye edilen c-ELISA' nın (OIE 2000) ise, AGID testinde olduğu gibi, EHDV ile kros reaksiyon göstermeksizin, virusa karşı duyarlı ve spesifik olduğu bildirilmiştir (Osburn 1994). Kompetitif ELISA, enfeksiyon ile canlı-atenüe bir aşıyla aşılama programı sonrasında gelişen antikorları ayırt edemez. Ancak daha hızlı ve ekonomik olması, bu testi, bir ülke veya bölgedeki aşılanmamış sığır ve koyunlarda BTV' nin dağılımını belirlemede ve enfekte olmayan hayvanlarda bir aşılama kampanyasının etkinliğini ölçmede tercih edilen metot haline getirmiştir (Hamblin 2004). BTV' nin Konya bölgesindeki koyunlarda c-ELISA ile

seroprevalansını ortaya koymak amacı ile yapılan bu çalışmada, aşılanmamış koyunlar örneklendiği için, tespit edilen bu seropozitivite oranı (%10) enfeksiyonun doğrudan göstergesi olarak kabul edilebilir.

Serogrup-spesifik antikorları belirlemede, CFT (Boulanger ve ark. 1967), indirekt veya blocking ELISA (Anderson 1984, Jochim 1985), floresan antikor (Pini ve ark. 1968) ve dot immunoblotting (Gupta ve ark. 1990) testleri de kullanılabilmektedir. BTV' nin serotiplerinin identifikasyonu için SNT ile birlikte hemaglütinasyon inhibisyon (HI) testi kullanılmaktadır (Van Der Walt 1980).

Ekonomik etkisi yüzünden Office International des Epizooties (OIE) A listesine kaydedilmiş bir hastalık olan BT (OIE 2000), Hindistan (Bandyopadhyay ve Mallick 1983, Mehrotra ve ark. 1991, Ravishankar ve ark. 2005), Pakistan (Akhtar ve ark. 1997), İran (Jafari Shoorijeh ve ark. 2008), Arnavutluk (Di Ventura ve ark. 2004), Bosna-Hersek (Velić ve ark. 2004), Kazakistan (Lundervold ve ark. 2004), ABD (Brako ve ark. 1984, Goyal ve ark. 1988), Meksika (Stott ve ark. 1989), Karayip ve Güney Amerika ülkeleri (Gibbs ve ark. 1983) gibi dünya ülkelerinde olduğu kadar, Türkiye' de de (Burgu ve ark. 1984, Bolat 1986, Öztürk ve ark. 1987, Girgin ve Yonguç 1988, Burgu ve ark. 1992, Yavru ve ark. 1999, Bulut ve ark. 2006, Gür 2008) özellikle koyun populasyonunda oldukça yaygındır.

Bandyopadhyay ve Mallick (1983), Hindistan' ın Rajasthan, Haryana, Uttar Pradesh ve Andhra Pradesh eyaletlerindeki çiftlikler ve mezbahalardan topladıkları 669 kan serumu örneğini BTV' ye karşı antikorlar yönünden AGPT ile kontrol ederek; koyunlarda %11.6, sığırlarda %3.7, keçilerde ise %3 seropozitivite oranı belirlemişlerdir. Ayrıca, yerli koyun ırklarının, yabancı koyun ırklarına göre daha düşük antikor prevalansına sahip olduklarını belirlemişlerdir. Mehrotra ve ark. (1991), Hindistan' ın Tamil Nadu eyaletinden topladıkları 53 koyun kan serumunu BTV antikorları yönünden AGPT ile teste tabi tutarak, 10 serum örneğini (%18.8) pozitif olarak belirlemişlerdir. Ravishankar ve ark. (2005), Hindistan' ın Kerala eyaletinin 14 farklı bölgesindeki 109 koyun ve 901 keçi olmak üzere toplam1010 hayvandan topladıkları kan serumu örneğini dot ELISA ile teste tabi tutmuşlar ve koyunlarda %8.25, keçilerde ise %5.3 seroprevalans tespit etmişlerdir. Akhtar ve ark. (1997), Pakistan' ın Kuzey Batı Sınır Eyaleti' nin kuzey kesimlerindeki 38 koyun sürüsünden topladıkları 380 kan serumu örneğini c-ELISA ile teste tabi tutarak, 184' ünde (%48.4)

BTV seropozitif reaksiyonlar elde etmişlerdir. Jafari Shoorijeh ve ark. (2008), İran' ın Batı Azerbaycan Eyaleti' ndeki koyunlarda BTV enfeksiyonunun dağılımını ve seroprevalansını tanımlamak amacıyla yaptıkları çalışmalarında; 1153 koyun serumundan 400' ünün (%34.7) BTV' ye karşı antikorlar içerdiğini ve 184 sürüden 172' sinin (%93.5) BTV seropozitif koyunları içerdiğini c-ELISA ile belirleyerek, enfeksiyonun eyalette yaygın olduğu sonucuna varmışlardır. Di Ventura ve ark. (2004) Arnavutluk' ta 2002 yılında gerçekleştirdikleri serolojik çalışmada, 857 sığır ile 870 koyun ve keçiden serum örneklerini c-ELISA ile BTV antikorları yönünden teste tabi tutarak, toplam seroprevansı sığırlarda %18.9, koyun ve keçilerde %4.4 bulmuşlardır. Velić ve ark. (2004), 2002 yılında Bosna' da koyun sürülerinde BT klinik semptomları kaydedilmesi üzerine, topladıkları 9599 serum örneğini (koyun: 8967; sığır: 632) c-ELISA ve AGID testlerini kullanarak BTV antikorlarının varlığı yönünden teste tabi tutmuşlardır. c-ELISA' nın 187 örnekte (%1.94), AGID testinin 141 örnekte (%1.53) BTV-seropozitif reaksiyonlar gösterdiğini ve pozitif serumların tamamının Bosna-Hersek' in nehir bölgelerinden toplandığını bildirmişlerdir. Lundervold ve ark. (2004), Kazakistan' da BTV enfeksiyonu hakkında ilk serolojik araştırma sonuçlarını bildirmişlerdir. Araştırıcılar, ülkelerinin farklı bölgelerinden topladıkları 279 sığır, 542 koyun, 137 keçi ve 513 saiga kan örneğini ELISA ile control etmişlerdir. Sığırlarda %25.4, koyunlarda %21.4, keçilerde %25.5 ve saiga' larda %0 seroprevalans tespit etmişlerdir. Brako ve ark. (1984), 1982 yılında Louisiana (ABD)' nın güneybatı ve güneydoğusunda bulunan sağlıklı koyun sürülerinden topladıkları kan serumu örneklerini BHV-1, BVDV, PIV-3, goat respiratory syncytial virus (GRSV) antikorları yönünden mikronötralizasyon testi (mNT) ile, bovine leukemia virus (BLV) ve bluetongue virus (BTV) antikorları yönünden ise immünodifüzyon ile teste tabi tutarak, 158 koyun kan serumunun 21' inin (%13.3) seropozitif olduğunu belirlemişlerdir. Goyal ve ark. (1988), ABD' de 379 sağlıklı koyundan topladıkları kan serum örneklerini AGID testi ile BTV antikorları yönünden teste tabi tutmuşlarlardır. Araştırma sonucunda, bütün koyunların BTV antikorları yönünden seronegatif olduğunu bildirmişlerdir. Stott ve ark. (1989), Meksika' nın 6 eyaletindeki koyunlardan elde ettikleri kan serumu örneklerini AGID kullanarak BTV antikorları yönünden teste tabi tutmuşlar ve %9 seropozitivite oranı belirlemişlerdir. Gibbs ve ark. (1983) yedi Karayip ve iki Güney Amerika ülkesindeki sığır, koyun ve keçilerden elde

ettikleri toplam 6250 kan serumu örneğini BTV' ye karşı antikorlar yönünden AGID testine tabi tutarak, toplam antikor prevalanslarını sığırlarda %70, koyunlarda %67 ve keçilerde %76 olarak belirlemişlerdir.

Türkiye' de BT enfeksiyonu ile ilgili ilk veriler 1944 yılına aittir (Anonymous 1980). Daha sonraki yıllarda uzun bir süre Türkiye' de varlığı bildirilmeyen BT enfeksiyonu 1977 yılının Ekim ayında Aydın ve çevresinde bulunan 7 ildeki koyunlarda görülmüştür (Yonguç ve ark. 1982). BTV enfeksiyonuyla ilgili daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda (Burgu ve ark. 1984, Bolat 1986, Öztürk ve ark. 1987, Girgin ve Yonguç 1988, Burgu ve ark. 1992, Yavru ve ark. 1999, Bulut ve ark. 2006, Gür 2008) koyunlarda seropozitiflik oranlarının %0 – 46 arasında olduğu saptanmıştır. Burgu ve ark. (1984) Tahirova Devlet Üretme Çiftliği' ndeki 52 koyunda mNT ile gerçekleştirdikleri serolojik taramada, bütün serumların BTV antikorları yönünden seronegatif olduğunu rapor etmişlerdir. Bolat (1986), Türkiye'de Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerindeki 1290 koyundan elde ettiği kan serumu örneklerini SNT ve AGID testleri ile inceleyerek, 273 koyunu (%21) BTV' ye karşı seropozitif olarak belirlemiştir. Öztürk ve ark. (1987), Konya Çiftlik Hayvanları Araştırma Merkezi' nden elde ettikleri 86 koyun serum örneğini incelemişlerdir. Araştırıcılar, bu serumları BTV SA_4 tipine karşı nötralizan antikorların varlığını belirlemek için SNT ile incelemişler ve %36.04 seropozitiflik tespit etmişlerdir. Girgin ve Yonguç (1988), SNT ile Batı Anadolu bölgelerindeki koyunların %46'sında ve keçilerin %44'ünde BTV' ye karşı nötralizan antikor varlığı tespit etmişlerdir. Burgu ve ark. (1992) Türkiye' nin Güney, Güneydoğu ve Ege bölgelerindeki illerden örnekledikleri koyun ve sığırlarda, BT seropozitiflik oranını koyunlarda %25.5, sığırlarda ise %15.5 olarak belirlemişlerdir. Yavru ve ark. (1999), Bala Tarım İşletmesinden 115 adet sağlıklı koyundan topladıkları serum örneklerini mNT ile incelemişler ve 29'unu (%25.21) seropozitif bulmuşlardır. Bulut ve ark. (2006), Türkiye' nin Konya, Burdur illeri ve bu illerin civarlarındaki çiftlik hayvanlarından topladıkları toplam 562 adet koyun ve keçi kan serumu örneğini ELISA ve serum nötralizasyon testi (SNT) ile mavidil virus antikorları yönünden incelemişlerdir. Konya' dan elde edilen 315 koyun serum örneğinden 54' ünü (%17.1) ve Burdur' dan elde edilen 66 koyun serum örneğinden 1' ini (%1.5) seropozitif olarak belirlemişlerdir. Gür (2008), Türkiye' nin güneydoğusundaki 82 adet kursaklı ceylan, 684 koyun ve 100 sığırda BTV' ye spesifik

antikorların varlığını ortaya koymak amacıyla gerçekleştirdiği çalışmada; ceylan, koyun ve sığırlarda seropozitivite oranlarını, sırasıyla, %40.2, %29.5 ve %88 olarak saptamıştır.

Bu çalışmada, Konya bölgesindeki özel hayvancılık işletmelerinde bulunan klinik olarak sağlıklı, aşılanmamış koyunlarda BTV' ye karşı c-ELISA ile %10 oranında bir seropozitiflik tespit edildi. Elde edilen bu oran (%10), Bandyopadhyay ve Mallick' in (1983), Brako ve ark.' nın (1984), Stott ve ark.' nın (1989), Ravishankar ve ark.' nın (2005) sırasıyla %11.6, %13.3, %9 ve %8.25 oranında saptadıkları pozitif antikor varlığına yakın bir değer olarak görülmekle birlikte, dünyada (Gibbs ve ark. 1983, Mehrotra ve ark. 1991, Akhtar ve ark. 1997, Lundervold ve ark. 2004, Jafari Shoorijeh ve ark. 2008) ve Türkiye' de (Bolat 1986, Öztürk ve ark. 1987, Girgin ve Yonguç 1988, Burgu ve ark. 1992, Yavru ve ark. 1999, Bulut ve ark. 2006, Gür 2008) yapılan çalışmalarla elde edilen seropozitiflik oranlarından düşük, bazılarından ise (Burgu ve ark. 1984, Goyal ve ark. 1988, Di Ventura ve ark. 2004, Velić ve ark. 2004, Bulut ve ark. 2006) yüksektir. Lundervold ve ark. (2003), vektör dağılımı ve çokluğunun, enfeksiyon oranları ve yeterliliğinin ve de vektörün konakçı tercihlerinin, farklı seropozitivite oranları tespit edilmesinde önemli olabileceğini bildirmişlerdir.

Öte yandan, bu çalışmada elde edilen %10 seropozitiflik oranının, çalışmanın yapıldığı Konya bölgesindeki koyunlarda önceden yapılan araştırmalarda (Öztürk ve ark. 1987, Yavru ve ark. 1999, Bulut ve ark. 2006) belirlenen seropozitivite oranlarından (sırasıyla %36.04, %25.1 ve %17.1) düşük olduğu gözlenmiştir. Öztürk ve ark. (1987), bir yetiştirme çiftliğinden elde ettikleri kan serumlarını örneklemişler ve aynı bölgedeki koyunlarda elde ettiğimiz seropozitiflik oranından (%10) daha yüksek bir seropozitiflik oranı (%36.04) bulmuşlardır. Ancak, bizim örneklerimiz Konya bölgesindeki kapalı işletme modeli uygulanan özel hayvancılık işletmelerinde bulunan çiftlik hayvanlarından alınmıştır. Diğer taraftan araştırma bölgesinde belirlediğimiz seropozitivite oranının aynı bölgede Yavru ve ark. (1999) ile Bulut ve ark.' nın (2006) sırasıyla %36.04 ve %25.1 olarak belirledikleri seropozitiflik oranlarından düşük çıkmasının nedeni, özellikle son birkaç yıldır Tarım Bakanlığı Konya İl Müdürlüğü' nün BTV' nin eradikasyonu kapsamında bölgede uyguladığı sıkı kurallara (hayvan hareketlerinin ve bir sürüye hayvanların girişinin kontrol altına alınması, koyunculuk işletmelerinin enfeksiyona rezervuar teşkil eden sığırcılık

işletmelerinden uzak yerlerde yüksek rakımlarda tesis edilmesi, hijyen kurallarına titizlikle uyulması, hastalık semptomları gösteren koyunların sağlıklı olanlardan ayrı tutulması, vs. gibi) bölgedeki özel koyunculuk işletmelerinin titizlikle uymasına bağlı olabilir. Ayrıca, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Konya İl Müdürlüğü' nün yine son birkaç yıldır KKKA (Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi) enfeksiyonu ile mücadele kapsamında yapılmasını öngördüğü ilaçlama program sonucunda, kullanılan insektisitlerin KKKA' nın vektörleri olan kenelerin yanında BT' nin vektörleri olan *Culicoides* türlerini de etkilediği ve bunların sayıca azalmaları sonucunda BTV enfeksiyonunun yayılımı üzerinde direkt olarak etkili olabileceği de gözönüne alınmalıdır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mavidil virus enfeksiyonunun Konya bölgesindeki koyunlarda seroprevalansını belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada, enfeksiyonun bölgedeki prevalansının azalmakta olduğu sonucuna varılmıştır. Enfeksiyonun yaygın olup olmaması; mevsimsel duruma, *culicoides* 'lerin uçma zamanına, aşılamaya bağlıdır. Teste tabi tutulan koyunların aşılanmış olmamasına rağmen bölgedeki koyunlarda saptanan enfeksiyon prevalansındaki bu azalma; Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Konya İl Müdürlüğü' nün son birkaç yıldır BT' nin eradikasyonu kapsamında öngördüğü uygulamalara (hayvan hareketlerinin ve bir sürüye hayvanların girişinin kontrol altına alınması, koyunculuk işletmelerinin enfeksiyona rezervuar teşkil eden sığırcılık işletmelerinden uzak yerlerde yüksek rakımlarda tesis edilmesi, hijyen kurallarına titizlikle uyulması, hastalık semptomları gösteren koyunların sağlıklı olanlardan ayrı tutulması, vs.) bölgedeki özel hayvancılık işletmelerinin sıkı sıkıya uymasına bağlı olabilir. Asıl önemlisi, yukarda da belirtildiği gibi, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Konya İl Müdürlüğü' nün KKKA' nın eradikasyonu kapsamında öngörülen ilaçlama programı sonucunda kullanılan insektisitlerin kenelerin yanında BTV' nin vektörü olan *Clucoides* türlerinin sayıca azalmalarına yol açmasına ve dolayısıyla BTV enfeksiyonunun yayılımı üzerinde direkt olarak etkili olabilmesine de bağlı olabilir. Bölgede kaydedilen enfeksiyon prevalansındaki bu azalmaya rağmen, bölgede ve ülkemizde enfeksiyonun tamamen eradike edilebilmesi için, yukarda bildirilen uygulamaların devam ettirilmesi yanında, bir an önce uygun aşı serotipinin belirlenerek aşılama kampanyaları başlatılmalıdır. Ülkemizde uygulanan aşılama programlarına rağmen hala enfeksiyonun tekrar tekrar ortaya çıkması, kullanılan aşı

serotipinin uygunluğu konusunda şüphe oluşturmaktadır. Bu nedenle tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de bir bölgedeki viral enfeksiyonlarla mücadele programında, etiyolojik ajanın tanısı yapılırken saha izolatlarının tespit edilmesi, tiplendirilmesi ve aşı suşunun buna göre seçilmesi büyük öneme sahiptir. Bu nedenle, PCR gibi ileri teknikler kullanarak sahadan mavidil virusunun identifiye edilmesi ve tiplendirilmesi yapılmalıdır ki, bunun aşı suşunun hazırlanmasında büyük önemi vardır.

6. KAYNAKLAR

Akhtar, S., Djallem, N., Shad, G., Thieme, O. 1997. Bluetongue virus in sheep flocks in North West Frontier Province, Pakistan. Prevent. Vet. Med., 29, 293-298.

Anderson, G. A., Stott, J. L., Gershwin, L. J., Osburn, B. I. 1987. Identification of bluetongue virus-specific immunoglobulin E in cattle. J. Gen. Virol., 68:2509–2514.

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.

Andrew, M., Whiteley, P., Janardhana, V., Lobato, Z., Gould, A., Coupar, B. 1995. Antigen specificity of the ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus. Vet. Immunol. Immunopathol., 47:311–322.

Anonymous. 1980. Epizootiology, diagnosis and control of bluetongue in Turkey. Bull. Off. Int. Epiz., 92, 7-8, 567-574.

Anonymous. 1999b. Disease outbreaks reported to the OIE in July–August 1999. Bull. Off. Int. Epizoot., 111: 379.

Anonymous. 2000c. Disease outbreaks reported to the OIE in September–October 2000. Bull. Off. Int. Epizoot., 112: 552.

Anonymous. 2007. Commission regulation (EC) No 1266/2007 of 26 October 2007 on implementing rules for Council Directive 2000/75/EC as regards the control, monitoring, surveillance and restrictions on movements of certain animals of susceptible species in relation to bluetongue. Official Journal of the European Union L 283, pp. 37–52.

Aytuğ, C.N. 1990. Enfeksiyon hastalıkları 2. Koyun-keçi hastalıkları ve yetiştiriciliği. Aytuğ, C.N., Alaçam, E., Özkoç, Ü., Yalçın, B.C., Türker, H ve Gökçen, H. (eds),

143-164, Tüm Vet. Hayv. Hiz. Yay. No:2, Teknografik Basımevi, İstanbul.

Bandyopadhyay, S.K., Mallick, B.B. 1983. Serological prevalence of bluetongue antibodies in India. Ind. J. Anim. Sci., 53, 12, 1355-1356.

Barratt-Boyes, S. M., MacLachlan, N. J. 1994. Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves. Vet. Microbiol., 40:361–371.

Barratt-Boyes, S. M., MacLachlan, N. J. 1995. Pathogenesis of bluetongue virus infection of cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc., 206:1322–1329.

Barratt-Boyes, S. M., Rossitto, P. V., Stott, J. L., MacLachlan, N. J. 1992. Flow cytometric analysis of in vitro bluetongue virus infection of bovine blood mononuclear cells. J. Gen. Virol., 73:1953–1960.

Barros, S.C., Ramos, F., Luis, A.V., Duarte, M., Henriques, M., Cruz, B., Fevereiro, M. 2007. Molecular epidemiology of bluetongue virus in Portugal during 2004-2006 outbreak. Vet. Microbiol., 124,25-34.

Bolat, Y. 1986. Elazığ, Diyarbakır ve Şanlıurfa illerinde koyunların mavidil hastalığının yayılması üzerine serolojik araştırmalar. S. Ü. Vet. Fak. Derg., 2, 103-112.

Bonneau, K. R., DeMaula, C. D., Mullens, B. A., MacLachlan, N. J. 2002. Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep. Vet. Microbiol., 88:115–125.

Boone, J. D., Balasuriya, U. B., Karaca, K., Audonnet, J. C., Yao, J., He, L., et al. 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, 25:672–678.

Boulanger, P., Ruckerbauer, G.M., Bannister, G.L., Gray, D.P. and Girand, A. 1967. Studies on bluetongue: III Comparison of two complement-fixation methods. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci., 31, 166-170.

Brako, E.E., Fulton, R.W., Nicholson, S.S., Amborski, G.F. 1984. Prevalence of bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhea, parainfluenza-3, goat respiratory syncytial, bovine leukemia and bluetongue viral antibodies in sheep. Am. J. Vet. Res., 45, 4, 813-816.

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.

Brodie, S. J., Wilson, W. C., O'Hearn, P. M., Muthui, D., Diem, K., Pearson, L. D. 1998. The effects of pharmacological and lentivirus-induced immune suppression on orbivirus pathogenesis: assessment of virus burden in blood monocytes and tissues by reverse transcription-in situ PCR. J. Virol., 72:5599–5609.

Bulut, O., Yavru, S., Yapkıç, O., Şimşek, A., Kale, M. and Avcı, 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., Öztürk, F., Akça, Y. 1984. Tahirova devlet üretme çiftliği koyunlarında viral enfeksiyonlar üzerine serolojik araştırmalar. A. Ü. Vet. Fak. Derg., 31, 167-179.

Burgu, İ., Urman, H. K., Akça, Y., Yonguç, A. D., Mellor, P. S., Hamblin, C. 1992. Serological survey and vector surveillance for bluetongue in southern Turkey. Proceedings of the 2nd International Symposium Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses. Walton, T. E., Osburn, B. I. (eds.), pp. 168–174, CRC Press, Boca Raton, FL.

Campano Lopez, A., Sanchez Botija, C. 1958. L'epizootie de fievre catarrhale ovine en Espagne (Blue Tongue). Bull. Off. Int. Epizoot., 50, 65–93.

Chiang, E. T., Persaud-Sawin, D. A., Kulkarni, S., Garcia, J. G., Imani, F. 2006. Bluetongue virus and doublestranded RNA increase human vascular permeability: role of p38 MAPK. J. Clin. Immunol., 26:406–416.

Collen, T., Mertens, P. P., Burroughs, J. N., Butcher, R. N., Anderson, J., Windsor, M., Takamatsu, H. 1992. Monoclonal antibodies produced against bluetongue and African horse sickness viruses by in vitro immunization show a bias for structural protein VP7. Bluetongue, African Horse Sickness and related Orbivirus. Walton, T. E., Osburn, B. I. (eds.), pp. 416–422, Proceedings of the 2nd International Symposium, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Cowley, J. A., Gorman, B. M. 1989. Cross-neutralization of genetic reassortants of bluetongue virus serotypes 20 and 21. Vet. Microbiol., 19:37–51.

DeMaula, C. D., Bonneau, K. R., MacLachlan, N. J. 2000. Changes in the outer capsid proteins of bluetongue virus serotype ten that abrogate neutralization by monoclonal antibodies. Virus Res., 67:59–66.

DeMaula, C. D., Jutila, M. A., Wilson, D. W., MacLachlan, N. J. 2001. Infection kinetics, prostacyclin release and cytokine-mediated modulation of the mechanism of cell death during bluetongue virus infection of cultured ovine and bovine pulmonar artery and lung microvascular endothelial cells. J. Gen. Virol., 82:787–794.

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, 296:330–337.

Di Ventura, M., Tittarelli, M., Semproni, G., Bonfini, B., Savini, G., Conte, A. and Lika, A. 2004. Serological surveillance of bluetongue virus in cattle, sheep and goats in Albania. Vet. Ital., 40, 3, 101-104.

Dragonas, P.N. 1981. Evolution of bluetongue in Greece. OIE Mon. Epizoot. Circ., 9, 10–11.

Dulac, G.C., Dubuc, C., Myers, D.J., Afshar, A., Taylor, E.A. 1989. Incursion of bluetongue virus type 11 and epizootic haemorrhagic disease of deer type 2 for two consecutive years in the Okanagan Valley. Can. Vet. J., 30, 351.

Eksteen, P. A., Huismans, H. 1972. Interferon induction by bluetongue virus and bluetongue virus ribonucleic acid. Onderstepoort J. Vet. Res., 39:125–131.

Elbers, A. R., Backx, A., Ekker, H. M., van der Spek, A. N., van Rijn, P.A. 2008. Performance of clinical signs to detect bluetongue virus serotype 8 outbreaks in cattle and sheep during the 2006-epidemic in The Netherlands. Vet. Microbiol., 129:156–162.

Elbers, A.R.W., Popma, J., Oosterwolde, S., van Rijn, P.A., Vellema, P. and van Rooij, E.M.A. 2008. A cross-sectional study to determine the seroprevalence of bluetongue virus serotype 8 in sheep and goats in 2006 and 2007 in the Netherlands. BMC Vet. Res., 4, 33.

Ellis, J. A., Luedke, A. J., Davis, W. C., Wechsler, S. J., Mecham, J. O., Pratt, D. L., Elliott, J. D. 1990. T lymphocyte subset alterations following bluetongue virus infection in sheep and cattle. Vet. Immunol. Immunopathol., 24:49–67.

Enserink, M. 2008. Animal disease. Exotic disease of farm animal tests Europe's responses. Science, 319:710–711.

Erturk, A., Tartar, N., Kabakali, O., Incoglu, S., Cizmeci, S. G., Barut, F.M. 2004. The

current situation of bluetongue in Turkey. Vet. Ital., 40:137–140.

Foster, N. M., Luedke, A. J., Parsonson, I. M., Walton, T. E. 1991. Temporal relationships of viremia, interferon activity, and antibody responses of sheep infected with several bluetongue virus strains. Am. J. Vet. Res., 52:192–196.

Fulton, R. W., Pearson, N. J. 1982. Interferon induction in bovine and feline monolayer cultures by four bluetongue virus serotypes. Can. J. Comp. Med., 46:100–102.

Gibbs, E.P., Greiner, E.C., Alexander, F.C., King, T.H., Roach, C.J. 1983. Serological survey of ruminant livestock in some countries of the Caribbean region and South America for antibody to bluetongue virus. Vet. Rec., 113, 19, 446-448.

Girgin, H., Yonguç, A.D. 1988. Türkiye'deki koyunların mavidil hastalığının serolojik, etiyolojik ve patolojik durumu üzerinde araştırmalar. Etlik Vet. Microbiol. Derg., 6, 13-24.

Gorman, B.M. 1990. The bluetongue viruses. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 162, 1–19.

Goyal, S.M., Khan, M.A., McPherson, S.W., Robinson, R.A., Boylan, W.J. 1988. Prevalence of antibodies to seven viruses in a flock of ewes in Minnesota. Am. J. Vet. Res., 49, 4, 464-467.

Gupta, Y., Chand, P., Singh, A. and Jain, N.C. 1990. Dot immunoblotting assay in comparison with enzyme linked immunosorbent assay fort he detection of BTV antibodies in sheep. Vet. Microbiol., 22, 365-371.

Gustafson, G.A., Pearson, J.E. and 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 serological investigation of bluetongue virus (BTV) in cattle, sheep and gazella subgutturosa subgutturosa in southeastern Turkey. Trop. Anim. Health Prod., 40, 3, 217-21.

Hamblin, C. 2004. Bluetongue virus antigen and antibody detection, and the application of laboratory diagnostic techniques. Vet. Ital., 40, 4, 538-545.

Hemiman, K.A.J., Boorman, J.P.T. and Taylor, W.P. 1983. BTV in Nigerian dairy

cattle herd. Serological studies and correlation of virus activity to vector ppulation. J. Hyg., 90, 177-193.

Hervas-Stubbs, S., Rueda P., Lopez, L., Leclerc, C. 2007. Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN. J. Immunol., 178:2361–2369.

http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/adns/index_en.htm

http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/index_en.htm

http://www.animalhealthaustralia.com.au/

http://www.konyatarim.gov.tr/hvynfaalad.asp?id=95

http://www.tuik.gov.tr/yillik/yillik.pdf

Huismans, H. 1969. Bluetongue virus-induced interferon synthesis. Onderstepoort J. Vet. Res., 36:181–185.

Huismans, H., van der Walt, N. T., Cloete, M., Erasmus, B. J. 1987. Isolation of a capsid protein of bluetongue virus that induces a protective immune response in sheep. Virology, 157:172–179.

in North West Frontier Province, Pakistan. Prev. Vet. Med., 29:293–298.

Jafari Shoorijeh, S., Ramin, A.G., Maclachlan, N.J., Osburn, B.I., Tamadon, A., Behzadi, M.A., Mahdavi, M., Araskhani, A., Samani, D., Rezajou, N., Amin-Pour, A. 2008. High seroprevalence of bluetongue virus infection in sheep flocks in West Azerbaijan, Iran. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., In Press.

Jameson, P., Grossberg, S. E. 1978. Production of interferon in human cell cultures by a new, potent viral inducer. Adv. Exp. Med. Biol., 110:37–53.

Jameson, P., Schoenherr, C.K., Grossberg, S.E. 1978. Bluetongue virus, an exceptionally potent interferon inducer in mice. Infect. Immun., 20, 321-323.

Janardhana, V., Andrew, M.E., Lobato, Z.I., Coupar, B. E. 1999. The ovine cytotoxic T lymphocyte responses to bluetongue virus. Res. Vet. Sci., 67:213–221.

Jeggo, M., Wright, P., Anderson, J., Eaton, B., Afshar, A., Pearson, J., Kirkland, P. And Ozawa, Y. 1992. Review of the IAEA meeting in Vienna on Standardisation of the competitive ELISA test and reagents for the diagnosis of bluetongue. In Bluetongue, African horse sickness and related orbiviruses (T.E. Walton and B.I. Osburn, eds). Proc. Second International Symposium, Paris, 17-21 June 1991. CRC Press, Boca Raton, 547-560.

Jeggo, M.H., Wardley, R.C. 1982. Generation of cross-reactive cytotoxic T lymphocytes following immunization of mice with various bluetongue virus types. Immunology, 45:629–635.

Jeggo, M.H., Wardley, R.C., Brownlie, J. 1985. Importance of ovine cytotoxic T cells in protection against blue tongue virus infection. Bluetongue and related orbiviruses. Barber, T.L., Jochim, M.M. (eds.), pp. 447–487, New York, Alan R. Liss.

Jeggo, M.H., Wardley, R.C., Taylor, W.P. 1983. Host response to bluetongue virus. Double-stranded RNA Viruses. Compans, R.W., Bishop, D. H. L. (eds.), pp. 353–359, Elsevier, New York , USA.

Jeggo, M.H., Wardley, R.C., Taylor, W.P. 1984. Role of neutralising antibody in passive immunity to bluetongue infection. Res. Vet. Sci., 36:81–86.

Jochim, M.M. 1985. An overview of diagnostics for bluetongue. Prog. Clin. Biol. Res., 178, 423-433.

Johnson, D. J., Ostlund, E. N., Stallknecht, D. E., Goekjian, V. H., Jenkins-Moore, M., Harris, S. C. 2006. First report of bluetongue virus serotype 1 isolated from a white-tailed deer in the United States. J. Vet. Diagn. Invest., 18:398–401.

Jones, L.D., Chuma, T., Hails, R., Williams, T., Roy, P. 1996. The non-structural proteins of bluetongue virus are a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants. J. Gen. Virol., 77:997–1003.

Jones, L.D., Williams, T., Bishop, D., Roy, P. 1997. Baculovirus-expressed nonstructural protein NS2 of bluetongue virus induces a cytotoxic T-cell response in mice which affords partial protection. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 4:297–301.

Katz, J., Alstad, D., Gustafson, G., Evermann, J. 1994. Diagnostic analysis of the prolonged bluetongue virus RNA presence found in the blood of naturally infected cattle and experimentally infected sheep. J. Vet. Diagn. Invest., 6:139–142.

Lobato, Z.I., Coupar, B.E., Gray, C.P., Lunt, R., Andrew, M.E. 1997. Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens. Vet. Immunol. Immunopathol., 59:293–309.

Luedke, A.J. 1985. WHO/FAO Working Team Report: Virology. Prog. Clin. Biol. Res., 178, 665-668.

Lundervold, M., Milner-Gulland, E. J., O'Callaghan, C. J., Hamblin, C., Corteyn, A

and Macmillan, A. P. 2004. A serological survey of ruminant livestock in Kazakhstan during post-Soviet transitions in farming and disease control. Acta Vet. Scand., 45:211–224.

Lundervold, M., Milner-Gulland, E.J., O'Callaghan, C.J., Hamblin, C. 2003. First evidence of bluetongue virus in Kazakhstan. Vet. Microbiol. 92, 281–287.

Lunt, R. A., Melville, L., Hunt, N., Davis, S., Rootes, C. L., Newberry, K. M., et al. 2006. Cultured skin fibroblast cells derived from bluetongue virus-inoculated sheep and field-infected cattle are not a source of late and protracted recoverable virus. J. Gen. Virol., 87:3661–3666.

Maan, S., Maan, N.S., Samuel, A.R., Rao, S., Attoui, H., Mertens, P.P. 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., 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., Thompson, J. 1985. Bluetongue virus-induced interferon in cattle. Am. J. Vet. Res., 46:1238–1241.

Manso-Ribeiro, J., Noronha, F.M.O. 1958. Fievre catarrhale du mouton au Portugal (Blue Tongue). Bull. Off. Int. Epizoot., 50, 46–64.

Mehrotra, M.L., Singh, R. and Shukla, D.C. 1991. Seroepidemiology and isolation of virus from an outbreak of bluetongue (BT) in Tamil Nadu. Indian J. Anim. Sci., 61, 12, 1282-1283.

Mellor, P.S. 1990. The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 162: 143–161.

Mellor, P.S. 2001. Bluetongue virus. The Encyclopedia of Arthropod-Transmitted Infections. Service, M. D. (ed), pp. 78-83, CABI Publishing, Wallingford, Oxon, GBR.

Mellor, P.S., Boorman, J. 1995. The transmission and geographical spread of African horse sickness and bluetongue viruses. Ann. Trop. Med. Parasitol., 89:1–15.

Mellor, P.S., Carpenter, S., Harrup, L., Baylis, M., Mertens, P.P. 2008. Bluetongue in Europe and the Mediterranean Basin: History of occurrence prior to 2006. Prev.

Vet. Med., 87, 1-2, 4-20.

Mellor, P.S., Wittmann, E.J. 2002. Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998–2001. Vet. J., 164:20–37.

Mertens P.P.C., Maan S., Samuel A., Attoui H. 2004. Orbivirus, Reoviridae. Virus taxonomy, VIIIth report of the ICTV. Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (eds.), pp. 466–483, Elsevier/Academic press, London, UK.

Mertens, P.P., Pedley, S., Cowley, J., Burroughs, J.N., Corteyn, A.H., Jeggo, M.H., et al. 1989. Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus seroytpe. Virology, 170, 561-565.

Meyrick, B., Hoover, R., Jones, M. R., Berry, L. C. Jr., Brigham, K. L. 1989. In vitro effects of endotoxin on bovine and sheep lung microvascular and pulmonary artery endothelial cells. J. Cell. Physiol., 138:165–174.

Monath, T. P., Guirakhoo, F. 1996. Orbiviruses and Coltiviruses. Virology. Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. (eds.), pp. 1735-1766, Lippincott, Raven, Boston, Massachusetts, USA.

Mortola, E., Noad, R., Roy, P. 2004. Bluetongue virus outer capsid proteins are sufficient to trigger apoptosis in mammalian cells. J. Virol., 78:2875–2883.

Office International des Épizooties (OIE). 2000. Bluetongue. In Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. OIE, Paris, 153-167.

Osburn, B.I. 1994. The impact of bluetongue virus on reproduction. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 17, 189-196.

Öztürk, F., Yavru, S., Eröz, S. 1987. Koyunlarda mavi dil enfeksiyonu üzerine seroepizootiolojik araştırmalar. S. Ü. Vet. Fak. Derg., 6, 37-40.

Parsonson, I. 1992. Overview of bluetongue virus infection in sheep. Bluetongue, African horsesickness, and related orbiviruses. Walton, T., Osburn, B. (eds.), pp. 713–724, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Parsonson, I.M. 1990. Pathology and pathogenesis of bluetongue infections. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 162, 119–141.

Pearson, J.E. and Jochim, M.M. 1979. Protocol fort he immunodiffusion test for bluetongue. Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn., 22, 463-471.

Pearson, J.E., Gustafson, G.A., Shafer, A.L. and 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., Bréard, E., Sailleau, C., Promé, S., Grillet, C., et al. 2007. Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: evaluation of immune responses and protection in small ruminants. Vaccine, 25:6774–6783.

Pini, A., Ohder, H., Whiteland, A.P. and Lund, L.J. 1968. Studies on fluorescent and neutralising antibodies to the bluetongue virus in sheep. Arch. fur ges Virus., 25, 129-136.

Purse, B. V., Mellor, P. S., Rogers, D. J., Samuel, A. R., Mertens, P. P., Baylis, M. 2005. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. Nat. Rev. Microbiol., 3:171–181.

Ravishankar, C., Krishnan Nair, G., Mini, M. and Jayaprakasan, V. 2005. Seroprevalence of bluetongue virus antibodies in sheep and goats in Kerala State, India. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 24, 3, 953–958.

Rinaldo, C.R.Jr., Overall, J.C.Jr., Glasgow, L.A. 1975. Viral replication and interferon production in fetal and adult ovine leukocytes and spleen cells. Infect. Immun., 12:1070–1077.

Roy, P., Bishop, D.H., LeBlois, H., Erasmus, B.J. 1994. Long-lasting protection of sheep against bluetongue challenge after vaccination with virus-like particles: evidence for homologous and partial heterologous protection. Vaccine, 12:805–811.

Roy, P., French, T., Erasmus, B. J. 1992. Protective efficacy of virus-like particles for bluetongue disease. Vaccine, 10:28–32.

Roy, P., Urakawa, T., Van Dijk, A. A., Erasmus, B. J. 1990. Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep. J. Virol., 64:1998–2003.

Saegerman, C., Berkvens, D., Mellor, P. S. 2008. Bluetongue Epidemiology in the European Union. Emerging Infect. Dis., 14:539–544.

Savini, G., Maclachlan, N. J., Sanchez-Vizcaino, J. M., Zientara, S. 2008. Vaccines against bluetongue in Europe. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 31:101–120.

Schwartz-Cornil, I., Mertens, P. P. C., Contreras, V., Hemati, B., Pascale, F., Bréard,

E., Mellor, P. S., MacLachlan, N. J., Zientara, S. 2008. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. Vet. Res., 39:46

Sellers, R.F. 1975. Bluetongue in Cyprus. Aust. Vet. J., 51, 198–203.

Shad, G., Wilson, W. C., Mecham, J. O., Evermann, J. F. 1997. Bluetongue virus detection: a safer reversetranscriptase polymerase chain reaction for prediction of viremia in sheep. J. Vet. Diagn. Invest., 9:118–124.

Stott, J. L., Osburn, B. I., Barber, T. L., Sawyer, M. M. 1979. Immunological response of sheep to an experimental inactivated BTV vaccine. J. Am. Vet. Med. Assoc., 175:611–615.

Stott, J.L., Blanchard-Channell, M., Osburn, B.I., Riemann, H.P., Obeso, R.C. 1989. Serologic and virologic evidence of bluetongue virus infection in cattle and sheep in Mexico. Am. J. Vet., 50, 3, 335-340.

Tabachnick, W. J. 1996. *Culicoides variipennis* and bluetongue-virus epidemiology in the United States. Annu. Rev. Entomol., 41:23–43.

Takamatsu, H., Burroughs, J. N., Wade-Evans, A. M., Mertens, P. P. 1992. Analysis of bluetongue virus serotype-specific and cross reactive ovine T-cell determinants in virus structural proteins. Bluetongue, African horse sickness and related orbiviruses. Walton, T. E., Osburn, B. I. (eds.), pp. 491–497, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Takamatsu, H., Jeggo, M. H. 1989. Cultivation of bluetongue virus-specific ovine T cells and their crossreactivity with different serotype viruses. Immunology, 66:258–263.

Takamatsu, H., Mellor, P. S., Mertens, P. P., Kirkham, P. A., Burroughs, J. N., Parkhouse, R. M. 2003. A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector. J. Gen. Virol., 84:227–235.

Van Der Walt, N.T. 1980. A haemagglutination and haemagglutination-inhibition test for bluetongue virus. Onderstepoort J. Vet. Res., 47, 113-117.

Vassalos, M. 1980. Cas de fie`vre catarrhale du mouton dans l'Ile de Lesbos (Gre`ce). Bull. Off. Int. Epizoot., 92, 547–555.

Velić, L., Velić, R., Bajrović, T., Dukić, B and Ćamo, D. 2004. Bluetongue in Bosnia: comparisons of competitive enzyme-linked immunosorbent assay and standard agar gel immunodiffusion tests. Vet. Ital., 40, 4, 562-563.

Veronesi, E., Hamblin, C., Mellor, P. S. 2005. Live attenuated bluetongue vaccine viruses in Dorset Poll sheep, before and after passage in vector midges (Diptera: Ceratopogonidae). Vaccine, 23:5509–5516.

Wade-Evans, A. M., Romero, C. H., Mellor, P., Takamatsu, H., Anderson, J., Thevasagayam, J., et al. 1996. Expression of the major core structural protein (VP7) of bluetongue virus, by a recombinant capripox virus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic bluetongue virus challenge. Virology, 220:227–231.

Whetter, L. E., Maclachlan, N. J., Gebhard, D. H., Heidner, H. W., Moore, P. F. 1989. Bluetongue virus infection of bovine monocytes. J. Gen. Virol., 70:1663–1676.

White, D. M., Wilson, W. C., Blair, C. D., Beaty, B. J. 2005. Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects. J. Gen. Virol., 86:453–462.

Wilson, W. C., Bernard, K. A., Israel, B. A., Mecham, J. O. 2008. Bluetongue virus serotype 17 sequence variation associated with neutralization. DNA Seq., 237–240.

Wirblich, C., Bhattacharya, B., Roy, P. 2006. Nonstructural protein 3 of bluetongue virus assists virus release by recruiting ESCRT-I protein Tsg101. J. Virol., 80:460–473.

Yavru, S., Öztürk, F., Gürhan, İ., Şimşek, A., Ünver, G., Duman,R.,Yapkıç, O. 1999. Koyunlarda Solunum Yolu Viruslarının Serolojik Olarak Araştırılması. Hayv. Araş. Derg., 9, 1-2, 53-60.

Yonguç, A. D., Taylor, W. P., Csontos, L., Worrall, E. 1982. Bluetongue in western Turkey. Vet. Rec., 111:144–146.

Zhang, N., MacLachlan, N.J., Bonneau, K.R., Zhu, J., Li, Z., Zhang, K., Zhang, F., Xia, L., Xiang,W. 1999. Identification of seven serotypes of bluetongue virus from the People's Republic of China. Vet. Rec., 145, 427–429.