

2008_881

TÜBİTAK

TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Tarım, Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Grubu
Agriculture, Forestry & Veterinary Research Grant Group

101599

**TÜRKİYE'DE MAVİDİL VİRUS MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ
VE PROFLAKTİK YAKLAŞIMLAR:
FARKLI İNAKTİVASYON YÖNTEMLERİNİN KAPSİT PROTEİNLERİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

TUBİTAK

TOVAG – 1050241

KESİN RAPOR

**Prof. Dr. Aykut ÖZKUL, Ankara Üniversitesi
Prof. Dr. Faruk BOZOĞLU, ODTÜ
Dr. Arife ERTÜRK, TKB, MVKAEM
Dr. Elvin ÇALIŞKAN (GÜNGÖR), TKB, MVKAEM**

ANKARA - 2008

İÇİNDEKİLER

SIRA NO	BAŞLIK	SAYFA
1	ÖZET	4
2	ABSTRACT	5
3	GİRİŞ	6
4	GEREÇ VE YÖNTEM	9
4.1.	Konvansiyonel Uygulamalar	9
4.1.1.	Hücre Kültürü	9
4.1.2.	Viruslar	9
4.1.3.	Enfeksiyozite Güç Tayini	9
4.1.3.1.	Mikro Titrasyon	9
4.1.3.2.	Plak Test	10
4.1.4.	Virus Nötralizasyon (VN) Testi	11
4.2.	Moleküler Epidemiyoloji	11
4.2.1.	Viral Genom Ekstraksiyonu ve DNA Amplifikasyonu	11
4.2.2.	RT-PCR Ürünlerinin Klonlanması	12
4.2.3.	Nükleotid Dizi Analizi	12
4.2.4.	Nükleotid Dizilerinin Çoklu Karşılaştırması ve In Silico Transkripsiyon	13
4.2.5.	Filogenetik Analizler	13
4.3.	Virus İnaktivasyon Çalışmaları	13
4.3.1.	Virusların Kimyasal İnaktivasyonu	13
4.3.2.	Virusların Yüksek Hidrostatik Basınç (YHB) ile İnaktivasyonu	14
4.4.	YHB'nin Virion Üzerine Etkisinin Araştırılması	15
4.4.1.	Virusun Üretilmesi	15
4.4.2.	Virus Partiküllerinin Konsatrasyonu	15
4.4.3.	Virus Saflaştırılması	15
4.4.3.1.	Ultrasantrifügasyon	16
4.4.3.2.	İzoelektrik Odaklama	16
4.4.3.3.	İyon Değişimi Kromatografisi	16
4.4.4.	Virusa YHB Uygulanması	16
4.4.5.	YHB Uygulanan BTV-9'un Karakterizasyonu	17
4.4.5.1.	Viral Enfektivitenin Sorgulanması	17
4.4.5.1.1.	Adsorbsiyon Kinetiği	17
4.4.5.1.2.	Penetrasyon Kinetiği	17
4.4.5.1.3.	Tek Basamaklı Çoğalma Eğrisi	17

4.4.5.1.4.	Plak apının Belirlenmesi	18
4.4.5.2.	Viral Protein Yapının Sorgulanması	18
4.4.5.2.1.	Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisi	18
4.4.5.2.2.	SDS-PAGE	18
4.4.5.3.	Viral Genomun Sorgulanması	18
4.5.	Aşılama alışması	19
4.5.1.	Aşı Viruslarının oğaltılması ve İnaktivasyonu	19
4.5.1.1.	Binariyeten İmin (BEI) ile İnaktivasyon	19
4.5.1.2.	Al(OH) ₃ ile Virusların Yoğunlaştırılması	19
4.5.1.3.	Virusların PEG ile Presipitasyonu ve YHB ile İnaktivasyonu	20
4.5.1.4.	Aşıların Bileşimi ve Uygulama	20
4.5.2.	Uygulama Gruplarının Düzene	20
5.	BULGULAR	22
5.1.	Konvansiyonel Uygulamalar	22
5.2.	Moleküler Epidemiyoloji	22
5.3.	İnaktivasyon alışmaları	28
5.3.1.	Kimyasal İnaktivasyon	28
5.3.2.	YHB ile İnaktivasyon	28
5.3.3.	Protein Yapının Fonksiyonel Analizi	29
5.3.3.1.	Tek Basamaklı oęalma Eğriyi	29
5.3.3.2.	Adsorbsiyon Kinetiği	30
5.3.3.3.	Penetrasyon Kinetiği	31
5.3.3.4.	Plak Büyüklükleri	31
5.3.3.5.	FTIR Analizi	31
5.3.3.6.	SDS-PAGE Analizi	33
5.3.4.	Viral RNA Analizi	34
5.4.	Aşılama alışması	35
6	SONUÇ	37
6.1.	Viroloji ve Moleküler Epidemiyoloji	37
6.2.	Virusun YHB ile İnaktivasyonu ve YHB'nin Virion Üzerine Etkisi	38
6.3.	Aşılama alışması (İmmunoprofilaksi)	38
7	ÖNERİLER	40
8	KAYNAKLAR	41
	EKLER	45

1. ÖZET

Mavidil ruminant türlerinde sokucu sinekler tarafından nakledilen ekonomik olarak önemli bir virus hastalığıdır. Çalışmada, 1998-2001 yılları arasında ülkemizde izole edilen 26 adet mavidil viruslarının moleküler epidemiyolojisi, farklı fiziksel ve kimyasal ajanlarla inaktivasyon dinamiğinin ortaya konması ve ruminant türlerinde profilaktik ürün olarak kullanılabilir inaktif trivalan aşı üretim olasılığının araştırılması amaçlanmıştır. Yapılan çalışmada, sadece 21 adet BTV izolatının NS3/3A kodlayan gen (S10) bölgelerinin dizi analizi yapılmış ve elde edilen diziler dünya gen bankasına gönderilerek, kabul numaraları alınmıştır. Bu virusların yapılan filogenetik analizlerinde özellikle 23 ve 26 nolu virusların ilgili gen bölgesi düzeyinde diğer BTV viruslarından farklı olduğu, diğer tüm virus izolatlarının birbirlerine çok daha yakın olduğu tespit edilmiştir. Tüm dünyadan elde edilen BTV S10 dizileri ile yapılan UPGMA analizleri sonrasında ise virusların orijin olarak bölgesel diğer viruslara enzerlik gösterdiği bir başka coğrafyaya ait viruslarla ayırt edilebilecek bir yakınlıklarının olmadığı tespit edildi.

Inaktivasyon çalışmalarında model olarak seçilen BTV-9 ve BTV-16 viruslarının standart binaryetilenimin (BEI) konsantrasyonu ve değişken yüksek hidrostatik basınç (YHB) değerlerindeki inaktivasyon dinamikleri değerlendirildi. BEI ile muamele sonrasında virusların 8 saatten itibaren enfektivitelerini %100 oranında yitirdikleri saptandı. YHB uygulaması ile özellikle 4°C'de yapılan 242 Mpa değerindeki uygulamanın yaklaşık 15-20 dakika içinde virusların inaktivasyonuna neden olduğu gözlemlendi. YHB uygulamasının viral protein yapılarında önemli bir deformasyon veya değişikliğe neden olmadığı, diğer taraftan virusun dsRNA yapısındaki genomunu degrade ederek inaktivasyona neden olduğu sonucuna varıldı. Diğer taraftan inaktivasyona neden olmayan basınç değerlerinde (140, 170 Mpa) ise virus çoğalma kinetiği ve plak ölçütlerinin basınçlanmamış virusla benzer değerler göstermesi, viral proteinlerin zararsızlığı konusunda önceki bilgileri destekledi.

Aşılama çalışmasında iki grup olarak ayrılan toplam 18 hayvan BEI ve YHB ile inaktive edilmiş BTV-4, BTV-9 ve BTV-16 serotipleri ile simultane olarak aşılandı. Her iki grupta da 3'er adet koyun aşılanmaksızın temas kontrolde bırakıldı. Aşılamalar 30 gün arayla 2 kez yapıldı ve her iki gruptaki tüm hayvanlar (aşılı ve temas kontrol) aşılamının 70. gününde enfektif BTV-4, BTV-9 ve BTV-16 virusları ile eprüve edildi. Koruyucu nötralizan antikor titresi 1/8 olarak belirlendi. Kombine aşılamının en iyi BTV-4 eprüvasyonuna karşı koruma sağladığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Mavidil virusu, moleküler epidemiyoloji, Yüksek Hidrostatik Basınç, Aşılama.

2. ABSTRACT

Bluetongue is an important arboviral disease of ruminant species transmitted by blood sucking midges. In this study, molecular epidemiology of 26 BTV's isolated in Turkey between 1998-2001, investigation of inactivation dynamics using physical and chemical agents and production of killed trivalent BTV vaccine for prophylaxis of the disease were aimed. In the first step, NS3/3A coding gene (S10) sequences were analyzed in 21 BTV isolates. The sequences obtained were submitted to GenBank and accession numbers for each S10 sequence were given by the GenBank. Phylogenetic analysis of the isolates was revealed that all viruses except Nrs 23 and 26 were homologous. Local sequences were also compared to those obtained from global BTV isolates using UPGMA method. This study also revealed that the viruses studied in this research were belonged to close geography to and closely related to those from Greece.

BTV-9 and BTV-16 viruses were used as model in inactivity studies. Inactivation was carried out using two different technique, namely chemical (e.g. binaryethyleneimine; BEI) and physical (e.g. high hydrostatic pressure; HHP) and inactivation dynamics were analyzed by means of various conventional techniques. Both viruses completely lost their infectivity with BEI at 8 hours post treatment. On the other side, HHP treatment caused inactivation within 15-20 min after 242 Mpa pressure at 4°C. It was detected that HHP was not cause of disintegration of viral proteins, however, caused degradation of viral dsRNA genome leading to inactivation. On the other hand, growth characteristics and plaque sizes of the viruses were not affected by pressure applied non-inactivating values, such as 140 and 170 MPas. This result also supported that HHP did not destroy virus structure.

Vaccination trial was performed in two groups of sheep as 12 in each. Groups were simultaneously vaccinated with BTV-4, BTV-9 and BTV-16 inactivated either BEI or HHP. 3 sheep in each group were left as unvaccinated contact controls. Vaccinations were performed twice with 30-day intervals. At 70 day post vaccination, all animals (vaccinated and un-vaccinated contact controls) in groups were challenged separately with virulent BTV-4, BTV-9 and BTV-16. Protective antibody titer was determined as 1/8 after virus neutralization test. Finally, the best protection was seen against BTV-4 challenge after combined inactivated BTV vaccination in the study.

Key Words: Bluetongue virus, molecular epidemiology, High Hydrostatic Pressure, Vaccination.

3. GİRİŞ

Çiftlik hayvanlarının önemli bir enfeksiyonu olan mavidil (Bluetongue, BT) Amerika (Hourrigan ve Klingsporn, 1975), Afrika (Anon., 2004d; Parsonson, 1992), Güney Asya, Kuzey Avustralya (Erasmus, 1990) ve özellikle Güney Avrupa'da yaygındır (Anon., 2004b; Anon., 2004c; Breard ve ark 2005). Hastalık son olarak Kıta Avrupa'sının daha önce hiç etkilenmemiş kuzey bölgelerinde görülmüştür (Anon., 2004a; Mellor ve Witmann, 2002).

Mavidil, *Culicoides* cinsi sokucu sinekler ile nakledilen, evcil ve bazı yabancı ruminantların kongesyon, ödem ve hemoraji ile karakterize, özellikle dişi ve erkeklerin üreme organlarına yerleşerek döl veriminde azalma, abort ve kongenital anomaliler nedeniyle önemli ekonomik kayıplara neden olan bir enfeksiyondur (Murphy ve ark., 1999; Mellor, 2000). 'Biting-Midges (Sokucu sinekler)' olarak isimlendirilen *Culicoides*'lerin 1000 kadar türü tanımlanmış ve yapılan çalışmalar ile 57 türünün Türkiye'de varlığı tespit edilmiştir (Dik, 1997). Türkiye'de *C. imicola*'nın mavidil enfeksiyonunu naklettiği bildirilmiştir (Mellor, 1995). Mavidil hastalığının yayılışı vektörlere bağlı olduğundan, hastalık en çok, böcek popülasyonunun maksimum seviyeye eriştiği sıcak yaz ortalarında ve genellikle yağışlı mevsimlerde görülmektedir.

BTV birçok ruminant türünde enfeksiyon oluşturmaya rağmen, en belirgin klinik semptomlar koyunlarda görülür (Erasmus, 1975). BTV enfeksiyonu evcil ve bazı yabancı ruminantlarda görülen ve kongesyon, ödem, hemoraji ile karakterize bir enfeksiyondur. Koyunlarda mukoza lezyonları yanında ayak lezyonları beraberinde de seyreder. Enfekte hayvanlarda virus özellikle üreme organlarına yerleşerek döl veriminde azalma, abort ve kongenital malformasyonlara neden olarak büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Erasmus 1990; Murphy ve ark., 1999). Sığırlarda ve keçilerde ise genellikle *subklinik* enfeksiyona neden olur (Brewer, 1992; Koumbati ve ark., 1999). Bu durum, konakçı türlerin endotel hücrelerinin enfeksiyona karşı vermiş oldukları yanıtta farklılıktan ileri gelir (DeMaula ve ark., 2002). Böylelikle sığırlarda viremik statünün 12-14 haftaya kadar uzayarak özellikle virulent suşların rezervuar konumundaki enfekte sığırlarda kışı geçirebilmeleri ve sokucu sineklerin aktive oldukları döneme taşınabilmelerine olanak tanımaktadır (Erasmus 1990).

Mavidil hastalığı, çiftlik hayvanlarının uluslararası ticaretinde büyük bir öneme sahip olduğundan Organization Internationale des Epizooties tarafından A listesinde sınıflandırılmıştır (Gibbs, 1994; OIE, 1996).

Mavidil etkeni (BTV) Reoviridae ailesinin orbivirus cinsinde Bluetongue virus grubu içerisinde sınıflandırılmış olup, 24 serotipi vardır (Roy, 2002). Virion büyüklüğü 60-80 nm'dir. Virion zarsız olup, kübik simetrik nükleokapsit 2 katmanlıdır. Dış kapsit düzenli yayılmış VP2

ve VP5 yapısal proteinlerden meydana gelmiştir. Dış kapsitin altında çekirdek adı verilen iç kapsit ve genom bulunur. İç kapsit düzenli yayılmış VP1, VP3, VP4, VP6 ve VP7 yapısal proteinleri ile NS1, NS2 ve NS3 yapısal olmayan proteinlerden meydana gelmektedir. Her iki katman da ikozahedral simetri sergiler. (Knudson ve Monath, 1990; Mertens, 1999). VP1, VP4 ve VP6 küçük yapılı, VP3 ve VP7 büyük yapılı polipeptidlerdir.

BTV genomu çift iplikçikli, pozitif polariteli, linear yapıda büyüklüğü 19.2 kb olan RNA taşır ve 10 segmentlidir (Roy, 2002). Segment 1-4, Segment 6, Segment 9 ve Segment 7 yapısal proteinleri (VP1-VP7) kodlar. Diğer üç segment (Seg-5, Seg-8 ve Seg-10) yapısal olmayan proteinleri sırasıyla; NS1, NS2 ve NS3/NS3A kodlamaktadır (Mertens ve ark., 1984).

En küçük genom segmenti olan Seg-10, iki yapısal olmayan protein olan NS3 ve NS3A'yı kodlamaktadır. NS3, 229 aminoasitten; NS3A ise 216 aminoasitten oluşmuştur. Bu proteinler öncelikle virülensin belirlenmesinde önemlidirler. Sitotoksik bir etkiye sahiptirler ve hücre membranlarında hasar oluşturabilirler (Martin, 1998; Niekerk, 2001). NS1 ve NS2 enfekte memeli hücrelerinde tespit edilirken, NS3/NS3A insect hücrelerinde fazla oranda bulunur. (Guirakhoo ve ark., 1995). NS3 ve NS3A proline'den zengin bir amino ucu, iki glikoprotein bölgesi ve iki hidrofobik bölgeden meydana gelmiştir. İki hidrofobik kısım (HI ve HII) sitotoksiteyi sağlamaktadır. Protein fonksiyonlarını etkileyecek yapısal değişiklikler sonucunda virusun aminoasit sekansında farklılıklar görülebilmektedir. NS3/NS3A proteinleri hücreden progeni virionların dışarıya çıkmasında ve virusun hücreler arası transferinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca konak hücrenin annexin II protein kompleksiyle ilişki kurarak virülensin ortaya çıkmasında etkili olmaktadır (Hyatt, 1993; Beaton, 2002).

Dış kapsitte yer alan VP2, memeli hücrelerinde mavidil virusunun hücreye adsorbsiyon ve penetrasyonunda önemli rol oynamaktadır. Serotip spesifik antijendir ve serotipin belirlenmesinde etkili olmaktadır. Nötralizan epitoplara içermektedir. Nötralizasyon ve hemaglutinasyonda önemli aktiviteye sahiptir (McColl, 1991).

Türkiye'de varlığı 1944 yılından beri bilinen bu enfeksiyonla ilgili olarak yakın zamanda yapılan çalışmalarda Ege Bölgesi ve Trakya'da mavidil virusunun izolasyonu gerçekleştirilmiştir. 1999 yılında Trakya Bölgesinde sahadan BTV izolasyonu gerçekleştirilmiş ve BTV-9 olarak tanımlanmıştır. BTV'ü 1998 yılından beri Güney ve Batı Anadolu da aktif olarak bulunmaktadır. Türkiye'de 1999-2000 yılındaki salgında tip 9 ve tip-16 izolasyonu ve identifikasyonu yapılmıştır (Ertürk ve ark, 2004). Enfeksiyonun Türkiye'deki varlığının yanında, özellikle son 3 yıldır gerek balkanlar (Anon., 1999; Anon., 2004a) ve gerekse Kuzey Afrika orijin kabul edilmek suretiyle İspanya, Fransa ve İtalya (Anon., 2004b; Anon., 2004c) üzerinden kıta Avrupa'sının iç kısımlarına doğru tehditkar ilerleyişi gözlenmektedir (Mellor ve Witmann, 2002).

ve VP5 yapısal proteinlerden meydana gelmiştir. Dış kapsitin altında çekirdek adı verilen iç kapsit ve genom bulunur. İç kapsit düzenli yayılmış VP1, VP3, VP4, VP6 ve VP7 yapısal proteinleri ile NS1, NS2 ve NS3 yapısal olmayan proteinlerden meydana gelmektedir. Her iki katman da ikozahedral simetri sergiler. (Knudson ve Monath, 1990; Mertens, 1999). VP1, VP4 ve VP6 küçük yapılı, VP3 ve VP7 büyük yapılı polipeptidlerdir.

BTV genomu çift iplikçikli, pozitif polariteli, linear yapıda büyüklüğü 19.2 kb olan RNA taşır ve 10 segmentlidir (Roy, 2002). Segment 1-4, Segment 6, Segment 9 ve Segment 7 yapısal proteinleri (VP1-VP7) kodlar. Diğer üç segment (Seg-5, Seg-8 ve Seg-10) yapısal olmayan proteinleri sırasıyla; NS1, NS2 ve NS3/NS3A kodlamaktadır (Mertens ve ark., 1984).

En küçük genom segmenti olan Seg-10, iki yapısal olmayan protein olan NS3 ve NS3A'yı kodlamaktadır. NS3, 229 aminoasitten; NS3A ise 216 aminoasitten oluşmuştur. Bu proteinler öncelikle virülensin belirlenmesinde önemlidirler. Sitotoksik bir etkiye sahiptirler ve hücre membranlarında hasar oluşturabilirler (Martin, 1998; Niekerk, 2001). NS1 ve NS2 enfekte memeli hücrelerinde tespit edilirken, NS3/NS3A insect hücrelerinde fazla oranda bulunur. (Guirakhoo ve ark., 1995). NS3 ve NS3A proline'den zengin bir amino ucu, iki glikoprotein bölgesi ve iki hidrofobik bölgeden meydana gelmiştir. İki hidrofobik kısım (HI ve HII) sitotoksiteyi sağlamaktadır. Protein fonksiyonlarını etkileyecek yapısal değişiklikler sonucunda virusun aminoasit sekansında farklılıklar görülebilmektedir. NS3/NS3A proteinleri hücreden projeni virionların dışarıya çıkmasında ve virusun hücreler arası transferinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca konak hücrenin annexin II protein kompleksiyle ilişki kurarak virülensin ortaya çıkmasında etkili olmaktadır (Hyatt, 1993; Beaton, 2002).

Dış kapsitte yer alan VP2, memeli hücrelerinde mavidil virusunun hücreye adsorbsiyon ve penetrasyonunda önemli rol oynamaktadır. Serotip spesifik antijendir ve serotipin belirlenmesinde etkili olmaktadır. Nötralizan epitoplara içermektedir. Nötralizasyon ve hemaglutinasyonda önemli aktiviteye sahiptir (McColl, 1991).

Türkiye'de varlığı 1944 yılından beri bilinen bu enfeksiyonla ilgili olarak yakın zamanda yapılan çalışmalarda Ege Bölgesi ve Trakya'da mavidil virusunun izolasyonu gerçekleştirilmiştir. 1999 yılında Trakya Bölgesinde sahadan BTV izolasyonu gerçekleştirilmiş ve BTV-9 olarak tanımlanmıştır. BTV'u 1998 yılından beri Güney ve Batı Anadolu da aktif olarak bulunmaktadır. Türkiye'de 1999-2000 yılındaki salgında tip 9 ve tip-16 izolasyonu ve identifikasyonu yapılmıştır (Ertürk ve ark, 2004). Enfeksiyonun Türkiye'deki varlığının yanında, özellikle son 3 yıldır gerek balkanlar (Anon., 1999; Anon., 2004a) ve gerekse Kuzey Afrika orijin kabul edilmek suretiyle İspanya, Fransa ve İtalya (Anon., 2004b; Anon., 2004c) üzerinden kıta Avrupa'sının iç kısımlarına doğru tehditkar ilerleyişi gözlenmektedir (Mellor ve Witmann, 2002).

Anabilim dalımızın da ortağı olduğu ve Avrupa Topluluğu 5. çerçeve programı tarafından bir proje kapsamında 3 yıl süreyle yapılan saha çalışmalarında, hastalığın dominant vektörü olan *C.imicola*'nın daha çok güney ve batı Anadolu bölgelerinde olduğu, Trakya'da ise bu sokucu sineğe sadece Gelibolu yarımadasında rastlandığı saptanmıştır. Trakya'nın kalan gölgelerinde ise en sık tespit edilen tür *C.obseletus* olarak kayıtlara girmiştir. Diğer taraftan, yıllar bazında yapılan serolojik kontrollerde ise en belirgin bulgu, BTV4'e karşı yapılan aşılamalara rağmen koyunlarda yeterli düzeyde bağışıklık tesis edilemediği ve sığırlarda da önemli oranda serokonversiyon olduğu gözlenmiştir. Daha önce gerek Ege ve gerekse Trakya'da yapılan izolasyonlara paralel olarak yıllar bazında değişken BTV9 ve BTV16 serokonversiyonları tespit edilmiştir.

Mavidil enfeksiyonundan korunma amacıyla dünya genelinde uzun yıllardır canlı attenüe virus aşılı kullanılmaktadır. Mono veya polivalan olarak kullanıma sunulan bu aşılıların en büyük dezavantajları olan i) aşı virus/larının viremisi, ii) kan emici sineklerdeki biyolojik siklus sırasında meydana gelen virulens artışları ve iii) aşılanan hayvanlardaki eş zamanlı vahşi virus superenfeksiyonları sırasındaki antijenik değişim (antigenic shift) olasılıkları bir süredir ciddi boyutlarda araştırılmaktadır. Tüm araştırmaların ortak sonucu bu kadar önemli bir virus enfeksiyonundan korunmada yeni jenerasyon rekombinant aşılılar (Virus-like particles - VLP) ile inaktif polivalan virus aşılıların üretimine ilgili çalışmalar süratle devam etmektedir (Murray ve ark, 1996; Roy ve ark, 1994).

Enfeksiyöz birimlerin inaktivasyonuna ilgili olarak Yüksek Hidrostatik Basınç (YHB) kullanımı uzun yıllardır denenmesine rağmen, özellikle virusların YHB'dan etkileniş detayları son 10 yıldır incelenmektedir (Gaspar ve ark., 2002). Diğer taraftan yüksek basınca maruz bırakılmış Şap virusunun profilaktik özellikleri ilk kez Ishimaru, ve ark., tarafından incelenmiştir (2004).

Bu araştırma, TC Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü ile üniversite işbirliğinde yerel BTV suşlarımızın antijenik ve genetik karakterizasyonlarının yapılması ve bunlardan klonlanacak prototip virusların 2 farklı yöntemle inaktive edilmesi ile doğal konakçılarında polivalan bağışıklama yetenekleri ve/veya güçlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. KONVANSİYONEL UYGULAMALAR

4.1.1. Hücre Kültürü:

Virus serotiplerinin üretilmesi ve enfektivite güç tayinleri, inaktivasyon denemeleri ve enfektivite parametrelerinin (tek basamaklı çoğalma eğrisi, penetrasyon kinetiği) in vitro sorgulanmasında, virus nötralizasyon (VN) testlerinde VERO-AFFSA hücre kültürü kullanıldı. Söz konusu hücrenin kültivasyonu için %10 fetal dana serumu (FDS) içeren DMEM/F12 (Biochrom, Almanya) kullanıldı.

4.1.2. Viruslar:

Araştırmada Viroloji Anabilim dalı koleksiyonunda bulunan referans BTV-4, BTV-9 ve BTV-16 virusları yanı sıra Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Viral Teşhis laboratuvarı tarafından, embriyolo tavuk yumurtası (ETY) inokulasyonları ile izole edilen ve daha sonra BHK-21 hücre hattına adapte edilen 26 adet BTV izolatları kullanıldı. Bu izolatların anabilim dalı laboratuvarlarında VERO-AFFSA hücrelerine adaptasyonu gerçekleştirildi. Araştırma kapsamına alınan BTV izolatlarının detaylı dökümü tablo 4.1. de sunuldu.

4.1.3. Enfeksiyozite Güç Tayini:

Farklı amaçlar için mikrotitrasyon ve plak test tekniklerinden yararlanıldı.

4.1.3.1. Mikro Titrasyon:

Virusların araştırma başında ve aşılama amacıyla üretildikten sonra genel enfeksiyoziteleri hakkında ortalama fikir sahibi olmak ve Virus Nötralizasyon testlerinde kullanılacak virusun standardizasyonu amacıyla kullanıldı. Bunun için, viruslar DMEM/F12 içinde 10 katlı olarak sulandırıldı. Hazırlanan her sulandırmadan 96-göz hücre kültürü tabletinin (Greiner, Almanya) 4 adet gözüne 100 µL oranda ilave edildi. Virus (100 µL saf virus) ve hücre (100 µL serumlu DMEM/F12) kontrol gözleri de sisteme ilave edildikten sonra, test sırasında kullanılan tüm gözlere 3×10^5 hücre/mL olacak şekilde hazırlanan VERO-AFFSA hücresinden 50 µL hacimde konuldu. Test virus kontrol gözlerinde %100 cpe tespit edildiği anda mikroskopik olarak değerlendirildi.

Tablo 4.1. Araştırmaya dahil edilen BTV izolatlarına ilişkin detaylar

SIRA NO	İZOLASYON TARİHİ	İL	İZOLASYON YERİ	HÜCRE	PASAJ SAYISI
1	1999	MUĞLA DALAMAN	ETY	VERO	P5
2	1998	İZMİR MENEMEN	ETY	VERO	P2
3	1998	AYDIN BOZDOĞAN	ETY	VERO	P3
4	1999	İZMİR MENEMEN	ETY	VERO	P2
5	1998	MUĞLA DALAMAN	ETY	VERO	P6
6	1998	AYDIN KIRIKLAR	ETY	VERO	P3
7	1999	AYDIN YENICE	ETY	VERO	P2
8	1999	ANTALYA MANAVGAT	ETY	VERO	P2
9	1999	İZMİR TIRE	ETY	VERO	P4
10	1998	AYDIN	ETY	VERO	P3
11	1999	ANTALYA MANAVGAT	ETY	VERO	P2
12	1998	AYDIN	ETY	VERO	P3
13	1998	EDİRNE	ETY	VERO	P1
14	1998	EDİRNE	ETY	VERO	P1
15	1998	ÇORLU	ETY	VERO	P1
16	2000	EDİRNE	ETY	VERO	P1
17	2000	MUĞLA	ETY	VERO	
18	2005	ANTALYA	ETY	VERO	P3
19	1998	DENİZLİ	ETY	BHK-21	P4
20	1999	AYDIN	ETY	BHK-21	P5
21	1999	ANTALYA	ETY	BHK-21	Y3-P3
22	1999	MUĞLA MİLAS	ETY	BHK-21	P4
23	1999	İÇEL	ETY	BHK-21	P6
24	1999	AYDIN KIRIKLAR	ETY	BHK-21	P5
25	1999	AYDIN BOZDOĞAN	ETY	BHK-21	P5
26	1999	ANTALYA SERİK	ETY	BHK-21	P4

4.1.3.2. Plak Test:

Tek basamaklı çoğalma ve penetrasyon kinetikleri ile basınçlama sonrası enfektivite değerlendirmelerinde bu teknik kullanıldı. Temel hedef birim hacimdeki enfektif viral partiküllerin tespit edilmesi idi. VERO-AFFSA hücreleri 24-göz hücre kültürü tabletlerinde

monolayer üretildikten sonra, daha önce açıklandığı şekilde 10 katlı olarak hazırlanan virus sulandırmalarının her birinden 2 adet tablet gözüne olacak şekilde 200 µL hacimde inokule edildi. Viral adsorbsiyon için 1 saat inkube edildikten sonra %1.6 oranında Carboxymethyl cellulose (CMC, Sigma, St Louis, USA) içeren DMEM/F12 medyumunu ile hücre yüzeyleri kaplandı. BTV-4 için yapılan testlerde post inokulasyon (pi) 4, BTV-9 ve BTV-16 için yapılan testlerde ise pi 6 günde hücreler %10 formaldehit solusyonu ile 30 dakika fikze edildi. Yıkama işlemini takiben %0.75 Christal Violet (Merck, Almanya) ile 20 dakika boyandı ve oluşan plaklar sayıldı. Enfektif partiküllerin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı;

$$\text{POU/mL} = \text{Sayılan Ortalama Plak} \times \text{Sulandırma Katsayısı} \times 5$$

4.1.4. Virus Nötralizasyon (VN) Testi:

Serotip spesifik bağışık yanıtın sorgulanması amacıyla kullanıldı. Serum örnekleri DMEM/F12 medyumunu ile 2 katlı olarak 96-gözlü hücre kültürü tabletinde sulandırıldıktan sonra, daha önce titrasyonu yapılan ve bu derler üzerinden 100DKID₅₀ oranında sulandırılan virusdan eşit hacimde tablet gözlerine konuldu ve nötralizasyon amacıyla 1 saat 37°C'de beklenildi. Süre sonunda test sırasında kullanılan tüm gözlere 3x10⁵ hücre/mL olacak şekilde hazırlanan VERO-AFFSA hücresinden 50 µL hacimde konuldu. Test virus kontrol gözlerinde %100 cpe gözlemlendiği anda mikroskopik olarak değerlendirildi. 100 DKID₅₀ virusu en az %50 oranında durduran serum sulandırması ortalama nötralizan antikor değeri olarak kabul edildi.

4.2. MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİ:

4.2.1. Viral Genom Ekstraksiyonu ve DNA Amplifikasyonu:

BTV izolatları ve araştırma laboratuvarımız stoklarında bulunan BTV-4 aşı suşu, BTV-9 ve BTV-16 bilinen viruslarına ait RNA genomları daha önceki proje döneminde belirtilen yöntem kullanılarak ekstrakte edildi. Elde edilen RNA yapıların tesadüfi hegzamer dizinleri kullanılmak suretiyle Moloney Murine Leukemia Virus Reverz Transkriptaz (RT; Fermentas, Litvanya) enzimi ile cDNA kopyaları sentezlendi. cDNA sentezi için kullanılan protokol aşağıda sunuldu;

BTV RNA	3 µL
dNTP	1 µL
Random hegzamer	1 µL
5X Reaksiyon Tamponu	2 µL
MMLV Reverse Transkriptaz	0,5 µL

DEPC su 2,5 µL → Toplam 10 µL

İlk basamakta ikincil RNA yapılarının denatürasyonu için 75°C'de 5-10 dakika süreyle yapılan termal muamele sonrasında reaksiyon tamponu MMLV-RT ve dNTP içeren ikinci karışım reaksiyona dahil edilerek 37°C'de 1 saat süreyle cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Elde edilen cDNA'lar takip eden basamakta kalıp olarak kullanılmak suretiyle, 10. segment (S10) içinden dizayn edilen ve tüm BTV serotiplerini tanıyan (jenerik) primerler kullanılarak in vitro olarak çoğaltıldı. PCR için kullanılan reaksiyon karışımı ve termal döngü değerleri aşağıda sunuldu;

cDNA	3 µL
Taq DNA Pol	0,5 µL
dNTP	1 µL
Primer-F	0,8 µL
Primer-R	0,8 µL
10x Reaksiyon Tamponu	3 µL
MgCl ₂	2,4 µL
DNase free su	18,5 µL → Toplam 30 µL

Örnekler bu reaksiyon karışımı içinde 96°C'de 4 dakika ön denatürasyona tabi tutulduktan sonra 35 döngü olacak şekilde 56°C'de 50 sn bağlanma, 72°C'de 1 dk uzaman ve 95°C'de 50 sn denaturasyon amaçlı ısı basamakları uygulandı. 35 döngünün tamamlanmasından sonra nihai uzama için 72°C'de 10 dakika süreyle reaksiyon sonlandırıldı. BTV S10 düzeyinde tasarlanan jenerik primer dizinleri aşağıda gösterildi.

BTV-Gen Forward 5' TGC TAT CCG GGC TGA TCC AAA- 3'

BTV-Gen Revers 5' TAG CGC CGC GTA CCC TCC -3'

Elde edilen DNA ürünleri (822 bp) jelde görüntüledikten sonra ya jelden ya da direkt PCR reaksiyonu karışımından uygun sistemler kullanılarak temizlenmiştir.

4.2.2. PCR Ürünlerinin Klonlanması:

Yukarıda anlatıldığı şekilde temizlenen PCR ürünleri pGEM-T Easy vektör (Promega, USA) sistemine T4 DNA ligaz yardımıyla yerleştirilerek ve E.coli DH5α da klonlandı. Gece boyu yapılan inkubasyon işleminden sonra elde edilen kolonilerden yaklaşık 10-15 adedi doğru insert içeriği yönünden PCR ile kontrol edildi. Doğru plazmidi taşıyan 2'şer adet hücre LB Broth'da üretilerek plazmidler purifiye edildi ve dizileme analizi için kullanıldı.

4.2.3. Nükleotid Dizi Analizi:

Anabilim dalı laboratuvarında kurulu bulunan Beckman Coulter CEQ8000 Genetik Analiz sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla üretilen plazmidler, DTCS kiti (Beckman

Coulter, USA) ile ddNTP-WellRed problu siklus terminasyon esasına göre reaksiyona tabi tutuldu. Reaksiyon sonrası elde edilen DNA ürünleri Etanol presipitasyon tekniği ile bağlanmamış boya fazlarından temizlendi ve elde edilen son ürün cihazın sahip olduğu kapiller sistemi tarafından cihaza yüklenerek veriler izlendi. Verilerin değerlendirilmesinde yine üretici firma tarafında geliştirilen program kullanıldı. Bu reaksiyonlara ait dizin verileri ekte sunuldu.

4.2.4. Nükleotid Dizinlerinin Çoklu Karşılaştırması ve *In Silico* Transkripsiyonu:

Her iki amaçla da DNASTar Lasergene v7.0 programından yararlanıldı. Genetik analiz sisteminden fasta formatında alınan dizinler bu program yardımıyla bir biri ile karşılaştırıldı ve Dünya Gen Bankasına girilmiş BTV S10 dizinleri ile karşılaştırıldı. Böylelikle elde edilen her dizinin olası serotipik ayrımı da gerçekleştirilmiş oldu. İzolatların serotip düzeyinde identifikasyonuna ilgili tablo aşağıda sunuldu. İzolatlar arasındaki nükleotid homolojisi ve genetik ilişki filogenetik olarak tespit edildi. Elde edilen nükleotid dizinleri temelinde S10 geni tarafından kodlanan tahmini aminoasit dizinleri de yine Lasergene v7.0 ile transkribe edildi ve tüm bireyler için çoklu olarak karşılaştırıldı (multiple alignment).

4.2.5. Filogenetik Analizler:

Araştırmada ortaya konan 21 adet NS3/3A kodlayan segment 10 dizileri ile birlikte Gen Bankasından indirilen bölgesel 31 ve global 106 adet BTV izolatına ait S10 nükleotid dizisi filogenetik olarak karşılaştırıldı. Evrimsel geçmiş analizi bu diziler kullanılarak "*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA)*" metodu ile sorgulandı (lit). Elde edilen optimal ağaç ortalama dal uzunluğu = 2.88193728 ile gösterildi. Bootstrap testinde (1000 tekrar) gruplanan taxa'lardaki (girilen veri) tekrarlanabilir ağaçların oranı sayısal olara dalların yanında gösterildi (lit). Evrimsel farklılıklar Poisson düzeltme tekniği ile hesaplandı (3). Filogenetik analizler MEGA4 programı ile control edildi (4).

4.3. VİRUS İNAKTİVASYON ÇALIŞMALARI

4.3.1. Virusların Kimyasal İnaktivasyonu:

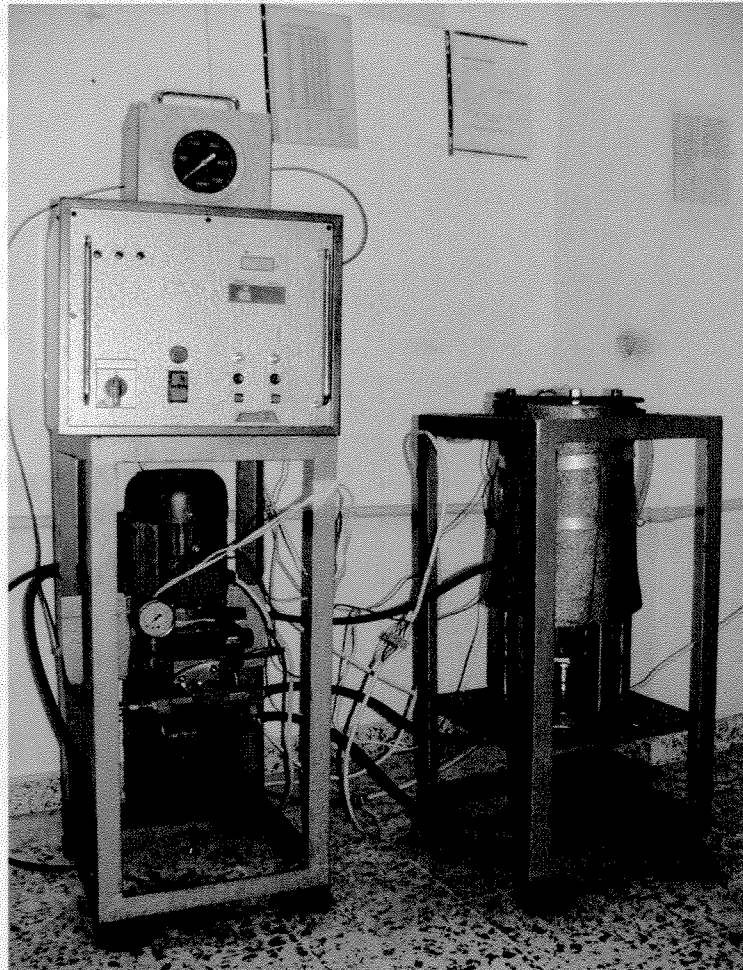
Araştırma kapsamında stoklanan viruslardan 2 tanesi (BTV-9 ve BTV-16) Binarietilenimin (BEI) ile oda derecesinde 24 saat süreyle inaktivasyona tabii tutuldu. Bu amaçla BEI son kullanım konsantrasyonu 5mM olacak şekilde 0.175 M NaOH çözeltisi içinde hazırlandı.

İnaktivasyon süreci dahilinde her saat başı inaktivasyon karışımından 1 mL hacimde örnek alınarak duyarlı hücre hattında (VERO-AFFSA) enfektivite titrasyonu gerçekleştirildi. Virusların inaktivasyon kinetiği şekil de verildi.

4.3.2. Virusların Yüksek Hidrostatik Basınç ile İnaktivasyonu:

Bu amaçla ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarında kurulu bulunan Yüksek Hidrostatik Basınç (YHB) cihazından yararlanıldı (Resim 4.1.). Anabilim dalında üretilen ve stoklanan 2 virus (BTV-9 ve BTV16) 0.2 mL hacmindeki ependorf tüplere hermetik olarak yerleştirildikten sonra basınç cihazına yerleştirildi ve 2 farklı ısı (4°C ve 25°C) ve 3 farklı basınç değerinde (140 MPa, 176 MPa ve 242 MPa) 20 ve 40 dakika süreyle basınca maruz bırakıldı. Virusların YHB uygulaması paralelinde tespit edilen inaktivasyon kinetikleri her basınç ve zaman parametresi için ayrı ayrı enfektiviteleri tespit edilerek gözlemlendi.

Resim 4.1: ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümünde yer alan Yüksek Hidrostatik Basınç (YHB) cihazı.



4.4. YHB'İN VİRİON ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yüksek basınçla yapılan muamele sonrasında oluşan virus inaktivasyonunun mekanizması hakkında bilgi edinilmesi amacıyla virus proteinleri ve virus nükleik asiti analiz edildi. Tüm bu analizler için prototip virus olarak sadece BTV-9 kullanıldı. Özellikle protein yapı analizlerinde virus purifikasyonu ve konsantrasyonu gerçekleştirildi. Virus proteinleri SDS-PAGE ve FTIR-spektroskopi yöntemleriyle analiz edildi. Diğer taraftan viral nükleik asit yine purifiye partiküllerden izole edilerek agaroz jel elektroforeze tabi tutuldu ve virus RNA segmentlerinin kontrolü yapıldı. Bu tekniklerin detayları aşağıda sırasıyla verildi.

4.4.1. Virusun Üretilmesi:

Virus saflaştırması amacıyla denenen tüm teknikler için ihtiyaç duyulan virus bu şekilde üretildi. Bu amaçla 3 adet 750 cm² roller hücre kültürü flask'da üretilen Vero hücre kültürleri 0.01 moi değerinde sulandırılmış BTV-9 ile enfekte edildi. Dördüncü gün sonunda % 90 seviyesine ulaşan cpe belirlendiği anda kültürler donduruldu ve çözüldü. Yapılan çalışmalarda üretilen virusun büyük kısmının (yaklaşık %80) hücrede kalma olasılığını ortaya koyması sebebiyle bu virusların da elde edilmesi amacıyla hücre lizatı 4000 rpm'de yapılan santrifügasyon işlemi ile hücre pelleti ve süpernatant olacak şekilde ayrıldı. Süpernatant temiz bir beher içine alınırken, elde edilen pelletler 2 mM Tris-HCl ile resüspanse edildi ve 3 kez dondurulup çözüldü. Son çözülme işleminden sonra elde edilen nihai sıvı yüksek devirde santrifüj edildi. Süpernatant pozisyonundaki sıvı alınarak daha önce temizlenen süpernatant üzerine ilave edildi.

4.4.2. Virus Partiküllerinin Konsantrasyonu:

Bu amaçla Polietilen glikol (PEG, MW 6000; Applichem, Almanya)presipitasyonu tekniğinden yararlanıldı. Stok olarak %30 konsantrasyonda hazırlanan ve otoklavda steril edilen PEG bir önceki basamakta hücreden ayrılan virus süspansiyonu içine son konsantrasyonu %8 olacak şekilde damla damla ilave edildi. Emülsifiye olan son karışım, 4°C'de 30 dakika süreyle düşük devirde manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı ve aynı şartlarda karıştırılmaksızın gece boyunca inkube edildi. Inkubasyon süresi sonunda elde edilen emülsiyon 8000 g'de 45 dakika süreyle santrifüj edildi. Oluşan pellet başlangıç virus hacminin 1:50'si olacak şekilde 2 mM Tris HCl ile resüspanse edildi.

4.4.3. Virus Saflaştırması:

Bu amaçla üç farklı fiziksel yöntem kullanıldı. Literatürde de üzerinde daha çok durulan ultrasantrifügasyon tekniği yanında viral partiküllerin izoelektrik odaklaması ve iyon değişimi kromatografisi uygulamaları da FTIR-spektroskopisi öncesinde denendi.

4.4.3.1. Ultrasantrifügasyon: Virus partiküllerinin saflaştırılması amacıyla primer olarak kullanılan teknik 2 basamaklı yüksek devirli santrifügasyondur. İlk basamakta % 30'luk sukroz yastığı üzerine yayılan virus PEG presipitatu Beckman Coulter (USA) ultrasantrifüj yardımıyla 85000 g'de 4 saat süreyle 50iK rotor yardımıyla santrifüj edildi. Elde edilen pellet 2 mM Tris HCl'de resüspanse edildikten sonra ikinci basamak ultrasantrifügasyona geçildi. Santrifüj tüpü 6 mL % 66'lık sukroz ve 10 mL %40'lık sukroz ile iki faz oluşturacak şekilde doldurulduktan sonra bir önceki basamakta elde edilen virus pelleti % 40'lık sukroz yastığı üzerine dikkatlice yayıldı. Tüpler ısı probu yardımıyla kapatıldıktan sonra 85000 g'de 4 saat süreyle 4°C'de çevrildi. Süre sonunda iki farklı yoğunluktaki sukroz yastığı arasında elde edilen virus pelleti, daha önce belirtilen değerlerde YHB'a tabi tutularak kontrol virusla birlikte FTIR analizi için saflaştırılmış virus örneği olarak kullanıldı.

4.4.3.2. İzoelektrik Odaklama: Bu amaçla daha önce PEG ile presipite edilen BTV-9, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim dalı laboratuvarında kurulu bulunan Rotofor (BioRad, USA) sisteminde pH3-10 aralığındaki amfolite karşı elektro-separasyona tabi tutuldu. Yaklaşık 2000W elektrik gücünde yapılan separasyon sonrasında her pH aralığında toplanan proteinler özel tüplere vakum yardımıyla toplandı. Elde edilen her pH aralığındaki protein profili SDS-PAGE tekniği ile analiz edildi.

4.4.3.3. İyon Değişim Kromatografisi: Değişik kimyasal yüklere sahip iyonların sırayla iyonik olarak dengelenmiş (equilibrated) sephadex boncuklar üzerine tutturulması esasına dayanan bir tekniktir. PEG ile konsantre edilen virus BioRad (USA) kromatografi kolonundan 100 damla/dakika olacak şekilde sirkülasyon pompası yardımıyla geçirilmiştir. Bu geçiş sırasında sephadex boncuklara tutunan virus partikülleri, bir sonraki basamakta aynı kolondan 2 N NaCl çözeltisi geçirilmek suretiyle ayrılmış ve spektrofotometre yardımıyla fraksiyon toplayıcının hangi tüplerine yerleştirildiği belirlenmiştir. Elde edilen fraksiyonlar daha önce olduğu gibi SDS-PAGE tekniği yardımıyla analiz edilmiştir.

4.4.4. Virus İnaktivasyonu:

Bu amaçla ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümünde kurulu bulunan Yüksek Hidrostatik Basınç (YHB) aleti kullanıldı. Daha önceki bölümlerde anlatıldığı şekilde yapıldı. Ortam ısısının

4°C'ye soğutulduğu şartlarda 40 dakika süreyle uygulanan 242 MPa basınçlama işlemi ile virus inaktivasyonu gerçekleştirildi.

4.4.5. İnaktive Edilen BTV-9'un Karakterizasyonu

4.4.5.1. Viral Enfektivitenin Sorgulanması

4.4.5.1.1. Adsorbsiyon Kinetiği: Basınçlama sonrasında viral ataçmandan sorumlu proteinlerin yapısında ve dolayısıyla işlevinde bir değişiklik olup olmadığının sorgulanması amacıyla şimdiye kadar denenmemiş bir deney tasarlandı. Viral enfektivitenin kaybolmadığı basınç-zaman (242 MPa, 40 dakika) değerine tabi tutulan virus örneği ile basınçlanmamış BTV-9 100 pfu/mL olacak şekilde DMEM içinde sulandırıldı ve 6-göz tabletlerde üretilen Vero hücrelerine 1 mL hacimde inokule edildi. Daha sonra süratle 0, 2.5, 5, 10, 15, 20,30 ve 45 dakika süreyle 4°C'de adsorbsiyona tabi tutuldular. Belirlenen bu sürelerde inokulasyon materyali geri alındı, hücre yüzeyleri soğuk DMEM ile yıkandı ve elde edilen adsorbsiyon sonrası sıvılar titre edildi. Böylelikle daha önceden belirlenen sürelerde, basınçlanmış ve basınçlanmamış virustan ne kadarının adsorbe olduğu belirlendi.

4.4.5.1.2. Penetrasyon Kinetiği: Virus enfektivitesinin değerlendirmesinde önemli bir parametre olarak sıklıkla kullanılan bir analiz yöntemidir. Basınçla muamele edilmiş ve edilmemiş BTV-9 100 pfu/mL olacak şekilde sulandırılarak, her birisi 12 adet petri kutusunda üretilmiş Vero hücrelerine inokule edildi ve petrilere süratle 4°C'de inkubasyona terk edildi. Sırasıyla 5, 10, 15, 20, 30 ve 45. dakikalarda gerek basınçlanmış ve gerekse basınçlanmamış BTV-9 ile enfekte edilen 2'şer adet hücre petrisi inkubasyondan alınarak inokule edilen virüsler aspire edildi. Bunu takiben her virüsle enfekte hücrelerden bir adedi 40 mM Sitrik asit ile 2 dakika muamele edilirken diğeri aynı süre ile PBS'le muamele edildi. İşlem sonunda petrilere %1.6 CMC ilave edilerek 37°C'de inkubasyona terk edildi. İnokulasyon sonrası 4. günde %10 formol ile fikze edilen hücreler, %0.35'lik Kristal viyole solüsyonu ile boyandı ve oluşan plaklar sayılarak kaydedildi.

4.4.5.1.3. Tek Basamaklı Çoğalma Eğrisi: Gerek basınçlanmış ve gerekse basınçlanmamış BTV-9'lar 0.01 moi olacak şekilde bir seri Vero hücre kültürüne adsorbsiyonlu teknikte inokule edildi. İnokulasyon sonrasında 60. saate kadar başlangıçta her 6 saatte takibeden sürelerde ise 12-24 saatte bir enfekte edilen hücre kültürlerinin süpernatantları ayrı ve hücreleri ayrı olmak üzere toplandı ve -80°C'de saklandı. Devam eden süreçte her zaman noktasında toplanan kültür süpernatantları ve enfekte hücreler paralel

titrasyona tabi tutuldu. Böylelikle hücreye bağımlı ve hücreden bağımsız virus üretiminin profili tespit edildi. Titrasyon amacıyla plak testten yararlanıldı teknik temel olarak adsorbsiyon ve penetrasyon kinetiğinde anlatıldığı şekilde yapıldı.

4.4.5.1.4. Plak Çapının Belirlenmesi: Testler sırasında basınçlanmış ve basınçlanmamış virusların standart inkubasyon (5 gün) sürelerinde oluşturdukları plakların çapları karşılaştırıldı.

4.4.5.2. Protein Yapının Bütünlüğünün Sorgulanması

4.4.5.2.1. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi: Bruker Confocheck sistem ile gerçekleştirilen FTIR analizinde sistem standardizasyonu amacıyla önce su ve DMEM test edildi ve standart pikin elde edilmesi saplandı. Bu işlemde sonra basınca maruz bırakılmış ve bırakılmamış viruslar sırasıyla 20 µL hacimde sıvı örnek hücrelerine yerleştirildi ve sistemin örneği analiz etmesi beklendi. Bütün analizler Aquaspec numune hücresi kullanılarak gerçekleştirildi.

4.4.5.2.2. Sodium Dodecylsulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE): Yukarıda bahsedilen yöntemlerden farklı sukroz konsantrasyonlarına karşı ultrasantrifügasyon tekniği ile saflaştırılan BTV-9 pelleti 2 parçaya ayrıldı. Bir bölüm pellet 242 MPa'da YHB'a tabi tutulurken, diğer kısım basınçlanmadan kontrol olarak tutuldu. Her iki grup pelletler 20 µL 2x Loading buffer içinde 5 dakika kaynatılıp soğutulduktan sonra %5 stacking jel üzerine 10 µL hacimde yüklendi. Broad range protein marker (Fermentas, Litvanya) paralelinde elektrik akımı ile ayrıştırılan örnekler Gümüş nitrat ile boyandı ve görüntülendi.

4.4.5.3. Viral Genomun Sorgulanması

4.4.5.3.1. RNA Ekstraksiyonu ve Agaroz Jel Elektrofrezisi: Değişik değerlerde (140 MPa, 176 MPa ve 242 MPa) 20 dakika süreyle YHB'a tabi tutulmuş ve basınçlanmamış BTV-9'lara ait dsRNA (çift iplikçikli RNA) Guanidin tiyosiyanat, asit fenol (pH 5.5) Kloroform/Izoamil alkol (48:1) karışımı ile ekstrakte edildi. Elde edilen RNA'lar (30 µL) 6x yükleme tamponu ile agaroz jele yüklendi. Bu amaçla % 0.8'lik agaroz jel hazırlandı ve 10 µL RNA örneği 2 µL 6x yükleme boyası ile karıştırılarak submarine jele yüklendi ve 4 V/cm sabit potansiyelle 30 dakika süreyle koşturuldu. Jel, etidyum bromid ile boyanarak dsRNA segmentlerinin varlığı araştırıldı.

4.5. AŞILAMA ÇALIŞMASI (Immunoprofilaksi)

Aşıların hazırlanmasında 2 farklı kimyasal (BEI ve Formaol ile) ve bir fiziksel (YHB ile) inaktivasyon gerçekleştirilmiştir. Araştırmada kullanılan virusların çoğaltılma, inaktivasyon ve uygulama protokolleri aşağıda verildi.

4.5.1. Aşı Viruslarının Çoğaltılması ve İnaktivasyonu: Daha önce yapılan karakterizasyon sonuçları esas alınarak yapılan değerlendirmelere göre aşı üretimi amacıyla aday olarak belirlenen 3 serotip (BTV-4, BTV-9 ve BTV-16), 750 cm² rolling hücre kültürü şişelerinde üretilen Vero hücrelerine adsorbsiyonlu teknikle inokule edildi. BTV-4 virusu için 3 ve BTV-9 ve BTV-16 viruları için ortalama 6 gün süren inkubasyon süreleri sonunda elde edilen viral yük mikrotitrasyon tekniği ile kontrol edildi. Titrasyon sonunda elde edilen değerler doğrultusunda, kimyasal inaktivasyon tabii tutulacak viruslar inaktivasyon sonrasında Al(OH)₃ jeli, YHB ile inaktive edilecek viruslar ise inaktivasyon öncesinde PEG presipitasyonu ile konsantre edildi. Bu tekniklerin uygulanış detayları aşağıda sunuldu;

4.5.1.1. Binary Ethylene Imine (BEI) ile İnaktivasyon:

BEI 20.5 gr

NaOH 7 gr

Distile su 1000 ml içinde eritildi. pH ayarı için %1 lik Betanaftol violetten 0.5 ml eklendi ve karışım esnasında oluşan mor renk portakal rengi oluncaya kadar 37°C su banyosunda bekletildi.

Nihai virus süspansiyonuna son oranı %3 olacak şekilde hazırlanan BEI solusyonundan eklenerek 26°C' de 24 saat bekletildi. Süre sonunda BEI'li virus süspansiyonuna %50 lik stok Sodium Thiosulfat çözeltisinden son hacim %4 olacak şekilde eklenerek BEI nin etkisi nötralize edildi. Son olarak inaktive edilen virus çözeltisine koruyucu amaçlı % 0.2 lik fenolden 0.1 ml/L oranında ilave edildi. Elde edilen son karışımdan 1 ml ayrıldı ve gerek viral inaktivasyonun ve gerekse BEI'nin nötralizasyonunun sağlıklı olarak gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi.

4.5.1.2. AL(OH)₃ ile virusların yoğunlaştırılması:

İnaktive edilen virus süspansiyonuna %10'luk AL(OH)₃ solusyonundan eklendi. Karışım 4-8°C'de 24 saat süreyle karıştırıldı ve 24 saat süreyle aynı ısı derecesinde beklemeye terk edildi. Süre sonunda dibe çöken AL(OH)₃ jelin üstündeki berrak kısım atıldı ve atılan miktar kadar yeni inaktif virus süspansiyonundan eklendi. Bir önceki uygulamaya benzer şekilde 4-8°C'de 24 saat süreyle tekrar karıştırıldı ve 24 saat süreyle aynı ısı derecelerde beklemeye bırakıldı. Üstteki berrak kısmın yarısı uzaklaştırılarak ve elde edilen son jel ve süpernatant yapı karışımı yoğunlaştırılmış inaktif virus süspansiyonu olarak aşı bileşimine katıldı.

4.5.1.3. Virusların PEG ile Presipitasyonu ve Yüksek Hidrostatik Basınç (YHB)

İnaktivasyonu:

YHB ile inaktivasyon işlemi öncesinde virusların Polietilen Glikol (PEG) ile konsantrasyonu işlemi gerçekleştirildi. Yoğunlaştırma işlemi basamakları aşağıda sunulduğu şekilde yapıldı;

Virus üremesi tamamlandıktan sonra kültür sıvısı 1000rpm de 5-7 dakika süreyle santrifüj edildi. Hücre pelleti derin dondurucu da (-20°C) saklanırken elde edilen süpernatanta, hacminin 1/4'ü oranında PEG6000 ilave edildi ve buzdolabında 1 gece bekletildi. Karışım 2300 rpm'de 45 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve elde edilen pellet orijinal süpernatant hacminin 1/100'ü olacak şekilde PBS ile resüspanse edildi. Konsantre virus 5 mL hacimde O-ring içeren dondurma tüplerine konularak Orta Doğu Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde bulunan cihaz kullanılarak YHB işlemine tabi tutuldu. Bu amaçla daha önceki bölümlerde detaylı anlatıldığı üzere, tüplere hermetik olarak konulan viruslar oda derecesinde 242 MPa'da 20 dakika süreyle YHB işlemi gerçekleştirildi. İşlem sonrasında sonrasında viruslar 1 ml hacimde porsiyonlanarak aşılama için kullanıldı.

İnaktivasyon ve konsantrasyon işlemleri tamamlanan BTV serotiplerinin aşı formuna sokularak kullanılmasından önce Vero hücre hatlarında 3 kör pasajları gerçekleştirildi. Böylelikle inaktivasyon işleminin sağlıklı olarak tamamlanıp tamamlanmadığı gözlemlendi.

4.5.1.4. Aşının Bileşimi ve Uygulaması:

İnaktivasyonu teyit edilen serotipler aşağıdaki formulasyon ile aşı formuna dönüştürülerek uygulamaya alındı.

Inaktive virus süspansiyonu	%45-46
Adjuvant (Mineral yağ)	%54-55

Bu oransal bileşim 30°C'de ve 2000rpm'de 2 saat süreyle karıştırılarak emülsifiye edildi. Karışım süspanse yağ adjuvantlı aşı olarak kullanıldı. Uygulama sırasında her serotipe ait aşı bileşiminden 1,5 mL alınarak simultane olarak hayvanlara deri altı verildi.

4.5.2. Uygulama Gruplarının Düzeni: Araştırma kapsamında hazırlanan inaktif aşılardan denenmesi amacıyla 9-12 aylık 24 adet koyunun kullanılması planlandı. Deney gruplarına dahil edilecek bu hayvanların çalışma öncesinde BTV serokonversiyon durumlarını tespit etmek için venöz kanları alındı. Alınan kanlar AÜ Veteriner Fakültesi Viroloji anabilim dalında kompetatif ELISA teknikniği ile BTV antikörleri yönünden kontrol edildi. BTV antikörü taşımadığı tespit edilen 24 adet hayvan 3 gruba ayrıldı. Gruplar ve uygulama farklılıkları aşağıda verildi;

Grup 1 → BEI ile inaktive edilmiş viruslar ile 30 gün ara ile 2 kez aşılandı

Grup 2 → YHB ile inaktive edilmiş viruslar ile 30 gün ara ile 2 kez aşılandı

Her grup kendi içinde 4 alt gruba bölündü. Gruplar içinde ilk 3 alt grupları oluşturan toplam 9 hayvan 0 ve 30. günlerde olmak üzere toplam 2 kez yukarıda bileşimleri verilen inaktif BTV serotipleri ile simultane olarak aşılandı. Ayrıca yine her grup içindeki 4. alt gruplara (G.1.4 ve G.2.4) aşılama yapılmadı ve bu hayvanlar uygulama süresince sürü içinde bırakılarak temas kontrol olarak değerlendirildi. İki ana grup içindeki alt gruplar ilk aşılama izleyen 70. günde tek serotiple eprüve edildi. Kısaca, alt grup 1'ler (G.1.1 ve G.2.1) BTV-4 ile, alt grup 2'ler (G.1.2 ve G.2.2) BTV-9 ile ve alt grup 3'ler (G.1.3 ve G.2.3) BTV-16 ile eprüve edilirken, alt grup 4'lerde ise eprüvasyon anına kadar serolojik kontrolleri yapılan bu hayvanların her birisine bir serotip verilmek üzere enfekte edildiler.

Aşılama denemesinin uygulamaya yönelik detayları tablo 4.2 de gösterildi.

Tablo 4.2. Aşılama çalışması için oluşturulan gruplar, aşılama takvimi ve eprüvasyon uygulamasına ilişkin detaylar.

GRUP & ALTGRUP	Hayvan Sayısı (#)	Kombine Aşı Uygulama		Eprüvasyon Serotipi
		0. gün	30. gün	
GRUP 1 (G1)				
G.1.1.	3	+	+	BTV-4
G.1.2.	3	+	+	BTV-9
G.1.3.	3	+	+	BTV-16
G.1.4.	3	-	-	BTV-4, -9, -16
TOPLAM	12			
GRUP 2 (G2)				
G.2.1.	3	+	+	BTV-4
G.2.2.	3	+	+	BTV-9
G.2.3.	3	+	+	BTV-16
G.2.4.	3	-	-	BTV-4, -9, -16
TOPLAM	12			

Araştırma kapsamına alınan her hayvandan 0, 30 ve 70 günlerde kan serumu alınarak VN testi ile serotip spesifik antikorlar yönünden değerlendirme yapıldı. Testler yapılırken tüm altgruplardaki hayvanlara ait serum örnekleri, sadece eprüvasyon yapılacak serotipe karşı nötralizasyon testine tabi tutuldu. Testlerin uygulanışı 4.1.4. nolu başlık altında tanımlandı.

5. BULGULAR

5.1. Konvansiyonel uygulamalar

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Viral Teşhis laboratuvarlarında izole edilen ve araştırma kapsamına alınan BTV izolatlarına ait BHK-21 hücre kültürü 3. pasaj şarjlarının VERO-AFFSA hücrelerine adaptasyonu 5. pasajdan itibaren tamamlandı ve virusların enfeksiyozite güçleri tespit edildi. Bu nedenle infektivite titrelerine ilgili bir veri elde edilemedi. İzolatlardan 5 adedinin (BTV_TR13-17) Vero hücre hattına adaptasyonu gerçekleştirilemedi. Plak test ile gerçekleştirilen enfeksiyozite tayinleri sonunda elde edilen değerler Tablo 5.1 de sunuldu. Yapılan değerlendirmelerde virusların enfeksiyozite güçlerinin $1.5 \times 10^1 - 7.5 \times 10^4$ PFU/mL arasında değiştiği gözlemlendi.

5.2. Moleküler Epidemiyoloji

Araştırmaya dahil edilen 26 adet izolattan 21 tanesinin S10 düzeyinde nükleotid analizleri gerçekleştirilebildi. Değişik uzunluklardaki bu dizinler dünya gen bankasına (GenBank) sunuldu. Gen bankası tarafından yapılan değerlendirmeler sonrasında, sunulan nükleotid dizinlerine GenBank tarafından kabul numaraları (Accession numbers) verildi. Bu numaralar Tablo 5.1 de ilgili kolonda gösterildi ve FASTA formatındaki dizinler rapora EK olarak verildi. Araştırma kapsamındaki 5 adet BTV izolatına ait dizin elde edilememesi, bu viruslardan elde edilen S10 DNA kopyalarının zayıflığına ve/veya kalitesinin düşüklüğüne bağlandı.

Elde edilen S10 dizinleri çoklu karşılaştırma yöntemi ile gerek nükleotid homolojileri ve gerekse amino asit kompozisyonları bakımından birbiri ile karşılaştırıldı. Yapılan değerlendirmelerde viruslar arası homolojinin %78.4-100 arasında değiştiği gözlemlendi (Şekil 5.1.). Nükleotid dizilerinden in silico transkripsiyon ile elde edilen amino asit dizisinin incelemesinde NS3/3A (S10 tarafından kodlanan) korunaklı yapısı bir kez daha gözlemlendi. En önemli farklılıklar 26. amminoasitte tespit edildi. İzolatların 11 tanesinde bu pozisyonda Lösin kodlanırken kalan tüm viruslarda aynı pozisyonda Valin rezidüsü bulundu. İkinci en büyük fark ise pozisyon 203'de saptandı. Virusların 5 adedi bu pozisyonda Prolin kodlarken geri kalan tüm viruslarda Lizin bulundu. Şekil 5.2.'de de görüleceği gibi varyasyonların büyük kısmı intraselüler ve özellikle ikinci intraselüler bölgede yoğunlaştı. İki glikolizasyon bölgesinin aynen korunduğu, herhangi bir virusta ilave glikolizasyon bölgesinin olmadığı saptandı. Mevcut tüm izolatlar içinde en aykırı aminoasit farklılıklarına sahip olan virus olarak BTV-TR23 tespit edildi. Bu izolat rezidü 45 de M (Metiyonin), rezidü 126 da I (İzolöysin), rezidü 154'de A (Alanin), rezidü 163'de M (Metiyonin), rezidü 177'de L (Löysin) ve rezidü

187'de G (Glisin) farklılıkları gösterdi. Söz konusu izolat verilen mutasyonlara bağlı olarak diğer virustan farklı olarak değerlendirildi.

İzolatlar ile daha önce gen bankasına farklı coğrafyalardan girilen BTV viruslarına ait S10 (NS3/3A) nükleotid dizileri arasındaki genetik ilişkinin ortaya konulması amacıyla filogenetik değerlendirme yapıldı. Bu değerlendirmeler hem izolatların kendi arasında, hem bölgesel ve hem de global BTV S10 dizileri düzeyinde gerçekleştirildi. Bu amaçla UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) analizi kullanıldı. Analiz sonuçları filogram ve dendrogram şeklinde gösterildi. Tüm bu epidemiyolojik analizler MEGA4 analiz programı kullanılarak gerçekleştirildi. Global virüslerle yapılan analizde, izolatlar grup A içinde yer aldı ki bu durum virüslerin tümünün ortak atadan geldiğini gösterdi. Bölgesel virüslerle yapılan değerlendirmelerde ise izolatlar C ve D grubu olmak üzere 2 farklı grupta toplandı. Bu gruplandırmalarda özellikle Yunanistan tarafından daha önce bildirilen virüslere yakınlıkları tespit edildi. Yine bölgesel değerlendirmelerde Afrika-Akdeniz ülkeleri orijinli virüslerin D grubu olarak toplandıkları belirlendi.

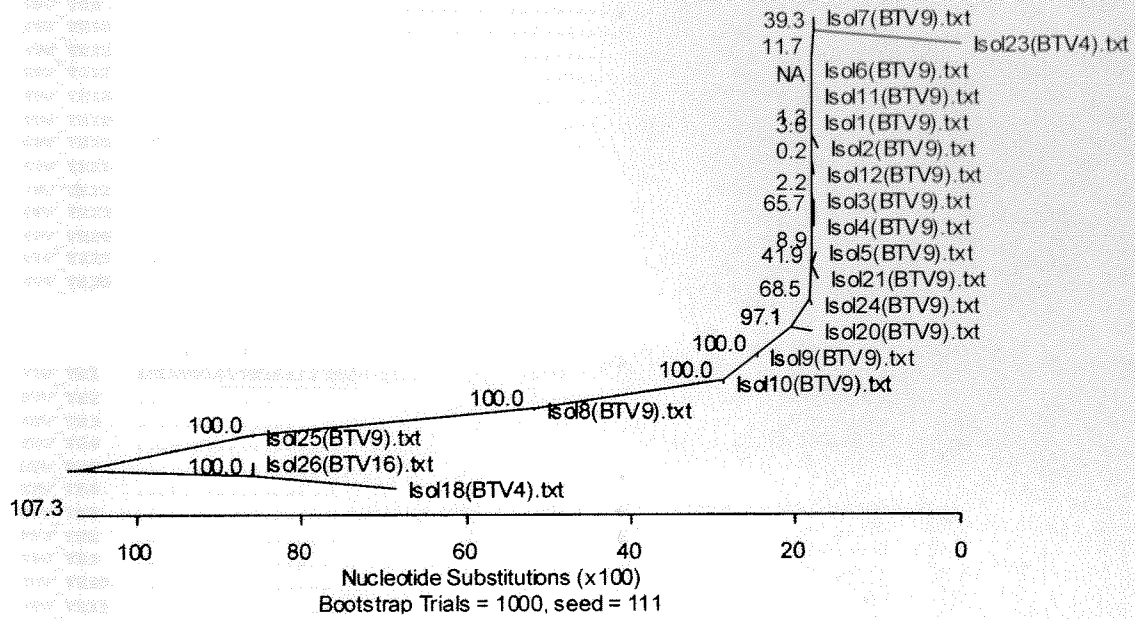
Tablo 5.1. BTV izolatlarının enfektivite değerleri ve elde edilen S10 dizilerinin Gen Bankası kabul numaraları.

VİRUS KODU	İL	PLAK TİTRESİ (PFU/mL)	S10 Dizileme	GenBank Kabul Numarası
BTV_TR1	DALAMAN	7,5x10 ⁻⁴	Yapıldı	EF554838
BTV_TR2	MENEMEN	2,5x10 ⁻⁴	Yapıldı	EF554839
BTV_TR3	BOZDOĞAN	4x10 ⁻²	Yapıldı	EF554840
BTV_TR4	MENEMEN	1x10 ⁻²	Yapıldı	EF554841
BTV_TR5	DALAMAN	1,5x10 ⁻¹	Yapıldı	EF554842
BTV_TR6	AYDIN	1x10 ⁻²	Yapıldı	EF554843
BTV_TR7	AYDIN	3,5x10 ⁻²	Yapıldı	EF554844
BTV_TR8	ANTALYA	1,8x10 ⁻²	Yapıldı	EF554845
BTV_TR9	İZMİR		Yapıldı	EF554846
BTV_TR10	AYDIN	7,5x10 ⁻³	Yapıldı	EF554847
BTV_TR11	ANTALYA	4,5x10 ⁻³	Yapıldı	EF554848
BTV_TR12	AYDIN	2x10 ⁻²	Yapıldı	EF554849
BTV_TR13	EDİRNE	-	Yapılamadı	-
BTV_TR14	EDİRNE	-	Yapılamadı	-
BTV_TR15	ÇORLU	-	Yapılamadı	-
BTV_TR16	EDİRNE	-	Yapılamadı	-
BTV_TR17	MUĞLA	-	Yapılamadı	-
BTV_TR18	ANTALYA	5x10 ⁻²	Yapıldı	EF554850
BTV_TR19	DENİZLİ	7,5x10 ⁻³	Yapıldı	EF554851
BTV_TR20	AYDIN	3x10 ⁻²	Yapıldı	EF554852
BTV_TR21	ANTALYA	2,5x10 ⁻²	Yapıldı	EF554853
BTV_TR22	MUĞLA	1,5x10 ⁻³	Yapıldı	EF554854
BTV_TR23	İÇEL	7,5x10 ⁻¹	Yapıldı	EF554855
BTV_TR24	AYDIN	2,5x10 ⁻⁴	Yapıldı	EF554856
BTV_TR25	AYDIN	3,5x10 ⁻³	Yapıldı	EF554857
BTV_TR26	ANTALYA	2,5x10 ⁻²	Yapıldı	EF554858

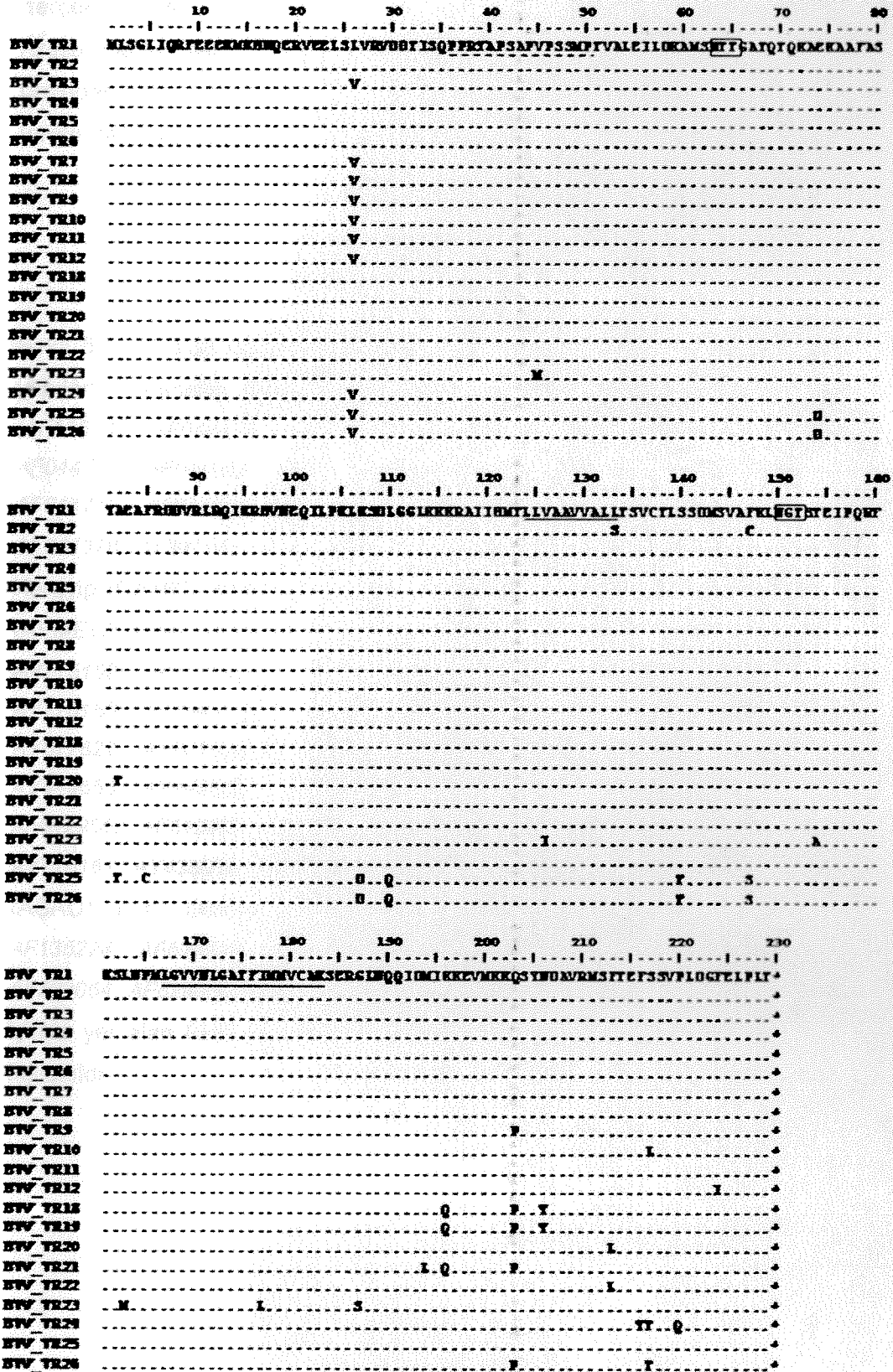
Şekil-5.1. BTV izolatları arasındaki nükleotid homolojisi ve farklılığı.

		Percent Identity																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
1	■	99.3	99.7	99.8	99.5	100.0	99.7	99.2	99.8	99.8	100.0	99.7	99.6	99.1	84.4	99.1	92.7	99.0	93.0	1	Isol1(BTV9).txt
2	0.7	■	99.2	99.2	98.6	99.4	95.2	98.4	99.1	99.1	99.2	98.7	98.7	98.5	83.7	98.5	91.7	98.8	93.0	2	Isol2(BTV9).txt
3	0.3	0.8	■	100.0	99.2	99.8	99.7	98.8	99.6	99.6	99.8	99.5	99.6	98.9	84.2	99.1	92.7	98.5	92.2	3	Isol3(BTV9).txt
4	0.2	0.8	0.0	■	99.4	99.8	99.7	99.1	99.6	99.6	99.8	99.5	99.6	99.0	84.1	99.2	92.7	98.2	92.2	4	Isol4(BTV9).txt
5	0.5	1.4	0.8	0.7	■	99.5	99.3	99.4	99.6	99.6	99.1	98.8	98.9	98.9	83.7	98.2	92.7	99.0	93.0	5	Isol5(BTV9).txt
6	0.0	0.6	0.2	0.2	0.5	■	99.8	99.3	99.8	99.8	100.0	99.7	99.6	99.2	84.3	99.4	92.7	98.8	93.0	6	Isol6(BTV9).txt
7	0.3	5.0	0.3	0.3	0.7	0.2	■	98.7	99.6	99.6	96.2	95.7	99.4	98.9	80.9	95.4	92.7	99.0	93.0	7	Isol7(BTV9).txt
8	0.8	1.6	1.2	0.9	0.6	0.7	1.4	■	99.3	99.3	99.4	99.4	98.8	99.2	82.5	99.0	92.4	99.0	93.0	8	Isol8(BTV9).txt
9	0.2	0.9	0.4	0.4	0.4	0.2	0.4	0.7	■	99.6	99.8	99.6	99.3	99.6	83.5	99.3	92.7	98.8	93.0	9	Isol9(BTV9).txt
10	0.2	0.9	0.4	0.4	0.4	0.2	0.4	0.7	0.4	■	99.8	99.8	99.3	99.3	83.4	99.3	92.7	98.9	93.0	10	Isol10(BTV9).txt
11	0.0	0.8	0.2	0.2	0.9	0.0	3.9	0.6	0.2	0.2	■	99.4	99.6	99.1	84.2	99.1	92.7	99.0	93.0	11	Isol11(BTV9).txt
12	0.3	1.4	0.5	0.5	1.2	0.3	4.5	0.6	0.4	0.2	0.6	■	99.1	98.8	83.9	98.6	92.7	99.0	93.0	12	Isol12(BTV9).txt
13	0.4	1.3	0.4	0.4	1.1	0.4	0.7	1.2	0.7	0.7	0.4	0.9	■	98.7	83.1	98.9	93.6	97.5	93.0	13	Isol20(BTV9).txt
14	0.9	1.5	1.1	1.0	1.1	0.8	1.1	0.8	0.4	0.7	0.9	1.2	1.3	■	83.4	98.5	92.7	98.5	93.0	14	Isol21(BTV9).txt
15	17.9	18.7	18.1	18.2	18.7	17.9	22.5	20.2	19.0	19.1	18.1	18.5	19.6	19.1	■	83.9	78.4	86.2	86.7	15	Isol23(BTV4).txt
16	0.8	1.5	0.9	0.8	1.8	0.6	4.8	1.0	0.7	0.7	0.9	1.4	1.1	1.6	18.5	■	92.7	99.0	93.0	16	Isol24(BTV9).txt
17	7.7	8.8	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	8.1	7.7	7.7	7.7	7.7	6.7	7.7	25.9	7.7	■	91.7	85.6	17	Isol25(BTV9).txt
18	1.0	1.2	1.6	1.8	1.0	1.2	1.0	1.0	1.3	1.1	1.0	1.0	2.6	1.6	15.5	1.0	8.8	■	92.8	18	Isol26(BTV16).txt
19	7.5	7.5	8.3	8.3	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15.0	7.5	16.0	7.6	■	19	Isol18(BTV4).txt
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		

Şekil-5. 3: Yerel BTV izolatları arasında nükleotid dizinleri temelinde tespit edilen filogenetik ilişki.



Şekil 5.4. BTV izolatlarına ilgili aminoasit dizilerinin çoklu karşılaştırması. Şekil üzerindeki düz çizgiler transmembran domainleri, kesik çizgiler sinyal dizilerini ve kutucuklar ise glikozlanma bölgelerini belirtmektedir.



Araştırmadan elde edilen dizinler ile daha önce dünya gen bankasına girilen ve değişik coğrafyalardan izole edilen virüslara ait aynı gen dizinleri UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) analizine tabi tutuldu. Analiz sonuçları filogram ve dendrogram şeklinde gösterildi. Tüm bu epidemiyolojik analizler MEGA4 analiz programı kullanılarak gerçekleştirildi.

Araştırmanın tüm moleküler epidemiyolojik çalışması tamamlanmış olup, nihai olarak projeden elde edilen tüm BTV saha izolatlarına ait Segment 10 dizinleri dünya gen bankası tarafından kabul edilmiştir. İzolatlara ait gen bankası kabul numaraları aşağıda sunulmuştur;

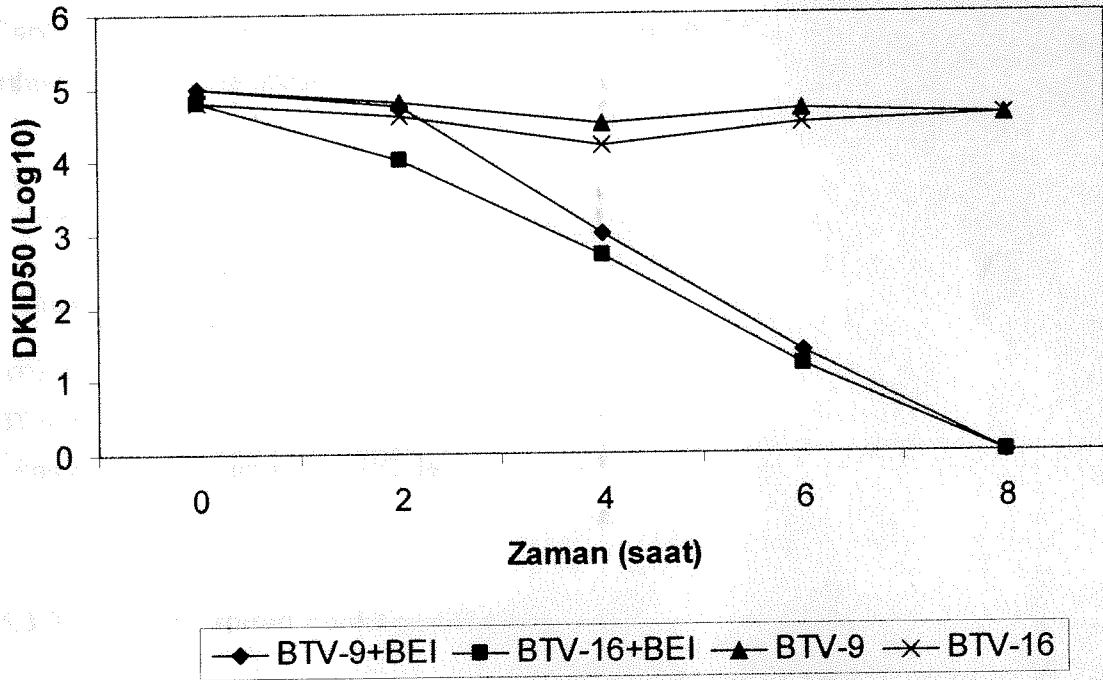
Şekil 5.5. NS3/3A kodlayan S10 gen bölgesinin A) global, B) bölgesel dizinler kullanılarak yapılan filogenetik (UPGMA) analizi. Analizlerde 30 adet Kuzey Amerika (NAM) dizini (AF135230, AF044372, AF044379, AF044380, AF044385, AF044376, AF044373, AF044386, AF044702, AF044383, AF044703, AF044704, AF044377, AF044374, AF044713, AF044711, AF044712, AF044710, AF044375, AF044706, AF044705, AF044707, AF044708, AF044709, AF044378, AF397280, AF397286, AF397295, AF397281, AF397285); 4 adet Orta Amerika ve Karayip (CAMC) dizini (AY426598, AY426604, AY426595, AY426597); 52 adet Afrika-Akdeniz (AFMED) dizini (AF512910, AF512911, AF512916, AY677628, AY449657, AF512920, AF481094, AY775152, AF481092, AF481093, AY823220, AY438033, AY823221, AY823222, AY775154, AY775153, AF469114, AF512917, AF512918, AF512906, AF512908, AY449650, AY677623, AY677622, AY677626, AY691691, AY677621, AY677627, AY677624, AY677620, AY691692, AY449653, AY449656, AY775159, AY775157, AY775158, AY775155, AY775156, AF512909, AF512905, AF512907, AY775160, AF512919, AF512924, AY120938, AY677629, AY449651, AY775161, AY438034, AY823223, AY823224, AF512922, AF512923); 18 adet Asya-Avustralya (ASAU) dizini (D00253, AF135223, AF529049, AF529052, AF529057, AF512912, AF512913, AF135224, AF529050, AF135225, AF135229, AF512914, AF529055, AF529059, AF529053, AF529054, AF529058, AF52905). Analizlerde ayrıca grup dışı dizinler olarak aynı virus ailesi içinde yer alan EHD (L29023) ve Iberaki (AB262177) virüslerine ait S10 segment dizinleri kullanıldı.

5.3. İnaktivasyon Çalışmaları

5.3.1. Kimyasal İnaktivasyon

BTV-9 ve BTV-16 ile yapılan BEI inaktivasyon kinetiği her iki virusun da işlem başlangıcından itibaren 2. saatten başlamak üzere enfektivitelerini kaybetmeğe başladığını, 8. saatte ise enfektivitelerinin 0 noktasına ulaştığını gösterdi. İnaktivasyon kinetiğine ilişkin grafik şekil Şekil 5.6.'da gösterildi.

Şekil-5.6: BTV-9 ve BTV16'nın 24 saat süreyle yapılan BEI inaktivasyon prosesinin ilk 8 saat süresince tespit edilen kinetiği.



5.3.2. YHB ile İnaktivasyon

İki farklı ısı derecesi, iki farklı sürede üç ayrı basınç değeri ile gerçekleştirilen uygulama sonrasında özellikle +4°C'de gerçekleştirilen 176 MPa değerindeki YHB uygulamasının viral infektiviteyi oda derecesinde yapılan uygulamaya göre daha kısa sürede inaktive ettiğini ortaya koydu. Oda derecesi ve +4°C'de ve değişken değerlerde gerçekleştirilen YHB uygulamalarının sonuçlarına ilgili infektivite değerleri Tablo 5.2. ve Tablo 5.3'de ayrı ayrı sunuldu.

Tablo 5.2: Oda derecesinde ve farklı sürelerde uygulanan YHB'in BTV-9 ve BTV-16 viruslarının infektivitesi üzerine etkisi.

Virus	Infektivite (DKID ₅₀ Log10)							
	140 MPa		176 MPa		242 Mpa		Kontrol	
	20 dk	40dk	20 dk	40dk	20 dk	40dk	20 dk	40dk
BTV-9	2,2	0	1	0	0	0	4,8	4,8
BTV-16	2,8	0,8	1,5	0	0	0	4,5	4,5

* Basınca tabii tutulmadan oda derecesinde aynı süre bekletilen örnekler

Tablo 5.3: +4 derecede ve farklı sürelerde uygulanan YHB'in BTV-9 ve BTV-16 viruslarının infektivitesi üzerine etkisi.

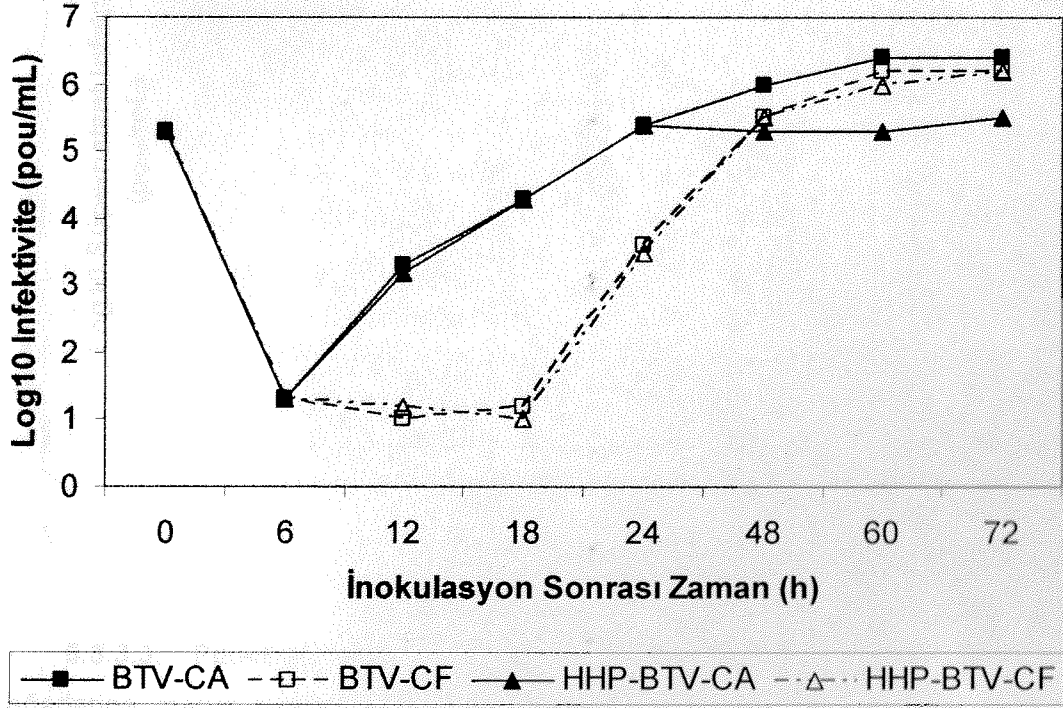
Virus	Infektivite (DKID ₅₀ Log10)							
	140 MPa		176 MPa		242 Mpa		Kontrol	
	20 dk	40dk	20 dk	40dk	20 dk	40dk	20 dk	40dk
BTV-9	2,2	0	0	0	0	0	4,8	4,8
BTV-16	2,8	0,8	0	0	0	0	4,5	4,5

* Basınca tabii tutulmadan +4°C'de aynı süre bekletilen örnekler

5.3.3. Protein Yapının Fonksiyonel Analizi

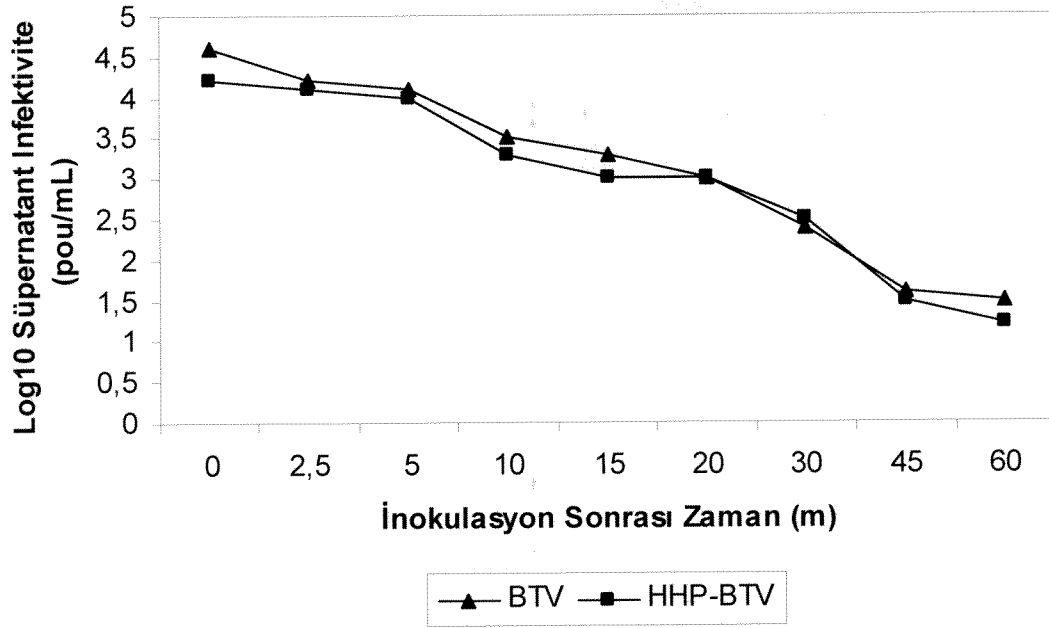
5.3.3.1. Tek Basamaklı Çoğalma Eğrisi: Basınca kısmi inaktivasyonu gerçekleştirilen ve basınca tabii tutulmayan BTV-9 örneklerinin 0.01 moi dozunda yapılan inokulasyonları sonrasında hücreye bağlı ve hücreden bağımsız virusların çoğalma özellikleri itibarıyla benzer bir kinetik sergilediği gözlemlendi. Özetle, enfektif viral partiküllerin hücrede sentezlenmesi ile bunların tespit edilebilir düzeyde hücre dışına çıkışları arasında yaklaşık 12 saatlik bir süre tespit edildi. Diğer taraftan nihai değerler itibarıyla 60 ve 72. post inokulasyon dönemlerinde hücreye bağlı virus miktarları arasında basınca tabii tutulan virusla enfekte hücrelerde normal virusla enfekte hücrelere oranla 1 Log daha düşük virus tespit edildi. Sonuç Şekil 5.7' de sunuldu.

Şekil 5.7: Basınçlanmamış (N-BTV-9) ve basınca tabi tutulmuş (YHB-BTV-9) ait tek basamaklı çoğalma eğrileri. Her iki tip virusun hücreye bağlı (CA) ve hücreden bağımsız (CF) üreme kinetikleri ayrı motiflerle gösterilmiştir.



5.3.3.2. Adsorbsiyon Kinetiği: Adsorbsiyon kinetiği, bu işlevden sorumlu viral proteinlerin bütünlüğünün karşılaştırılması amacıyla çalışıldı. Yapılan değerlendirmeler neticesinde, hücreye muamele edilen virusların büyük bölümünün inokulasyonu izleyen ilk 15 dakikalık sürede büyük oranda ataçmanlarını tamamladıklarını ortaya koydu. Her iki virus arasında bu yönden herhangi bir farklılık tespit edilemedi.

Şekil 5.8: Basınçla muamele edilmiş ve edilmemiş BTV-9 örneklerinin adsorbsiyon kinetikleri.



5.3.3.3. Penetrasyon Kinetiği: Total inaktivasyona neden olmayan ara YHB değerlerine maruz bırakılan BTV-9 ile basınçlanmamış BTV-9'un penetrasyon kinetikleri arasında her hang bir fark tespit edilmemiştir. sayısal değerlendirmesi halen devam etmektedir. Ancak ön değerlendirmeler basınçlanmış ve basınçlanmamış BTV-9'un penetrasyon işlevinde her hangi bir fark olmadığı ön bilgisini ortaya koymaktadır.

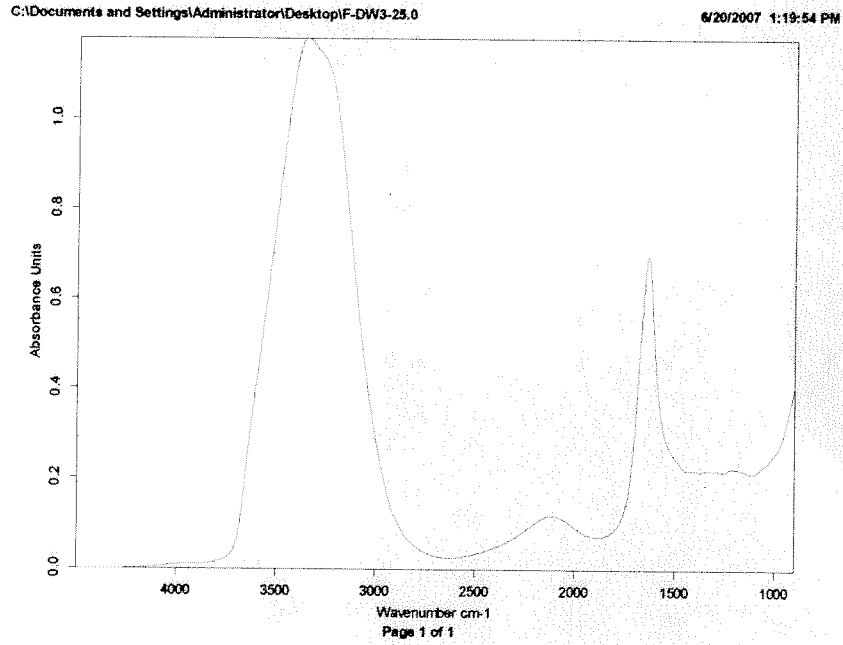
5.3.3.4. Plak Büyüklükleri: Basıncın virus proteinleri üzerindeki etkisinin ortaya konulması amacıyla gerçekleştirilen bir diğer biyolojik test yöntemi ise plak büyüklükleri arasındaki farkın gözlemlenmesi idi. Bu amaçla seri sulandırmaları yapılan basınçlanmamış ve kimsi basınçlanmış BTV-9 örneklerinin plak morfolojileri natif plak test yardımıyla karşılaştırıldı. Elde edilen veriler her iki virus arasında plak ölçüleri açısından bir fark olmadığını ortaya koydu.

5.3.3.5. FTIR Analizi: Hazırlık aşamasında sistem standardizasyonu için Aquaspect hücresinde su ve DMEM örneklerinin FTIR analizlerinde standart eğriler elde edildi (Şekil 3 A ve B). Bunun bazında yapılan analizler sonrasında saflaştırılmış ve basınçlanmamış BTV-9 örneğine ilgili FTIR spektrumunun analizleri tamamlandı. Basınçlanmış BTV-9'a ilgili FTIR analizine ait spektrumların değerlendirilmesi halen devam etmektedir. Basınçlanmamış saf BTV-9'a ilgili spektrum analizinde (Şekil 5.9.C), elde edilen spektrum büyüklükleri şu şekilde tanımlandı; 1648 bantı amid I (proteinler), 1549 bantı amid II (proteinler), 1453, 1401, 1243

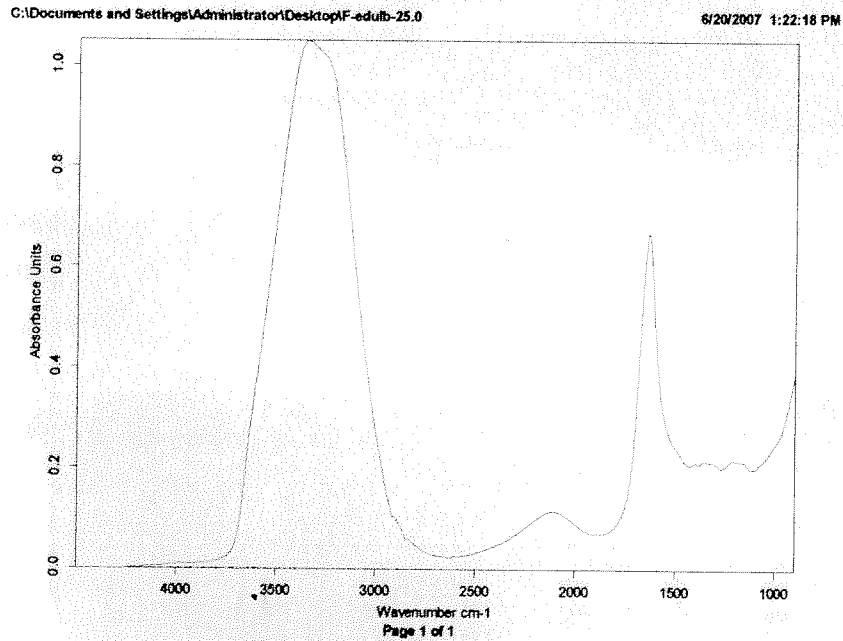
bantları lipid bantları, 1087 bantı da nükleik asit bantı. Diğer taraftan YHB uygulaması sonrasında özellikle nükleik asit bantının platolaştığı, Amid I ve Amid II bantlarının ise pik derinliklerinin (OD değeri olarak) göreceli olarak azaldığı bulgusu saptandı (Şekil 5.9.D).

Şekil 5.9. : FTIR analiz verileri. A) Su örneğine ilgili FTIR Spektrumları; B) DMEM (hücre kültürü medyumu) örneğine ilgili FTIR Spektrumları; C) BTV-9 FTIR spektrumları; D) YHB-BTV-9 FTIR spektrumu.

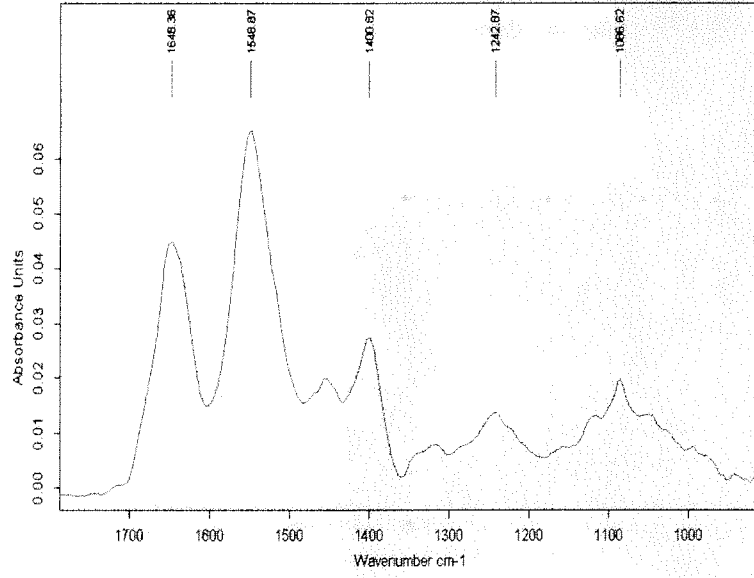
A)



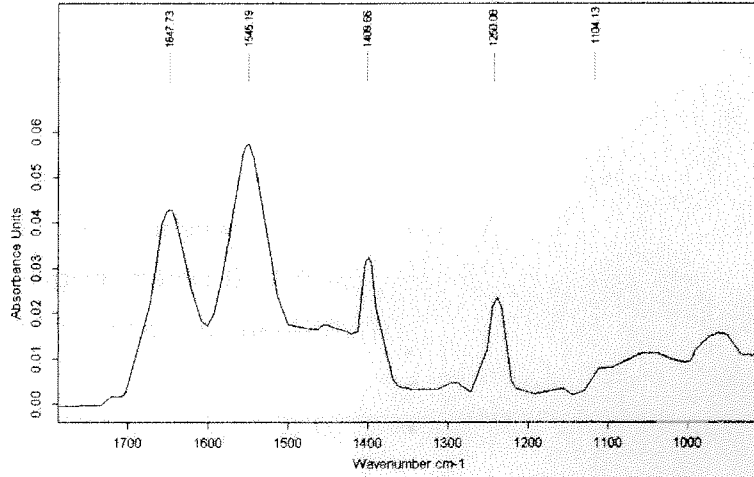
B)



C)

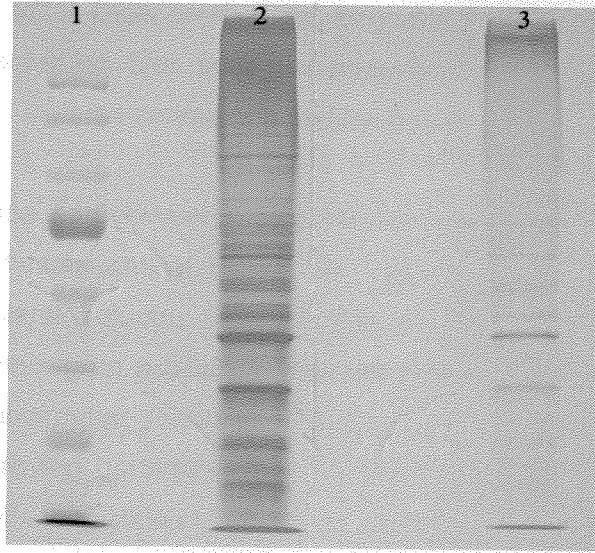


D)



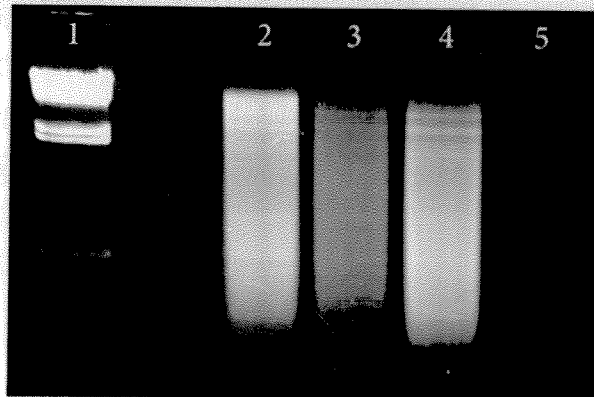
5.3.3.6. SDS-PAGE Analizi: Ultrasantrifügasyon ile purifiye edilen ve YHB'ye tabi tutulan ve tutulmayan BTV-9'a ait viral proteinlerin denatüran ortamda gerçekleştirilen protein separasyonu sonrasında, bant profillerinde her hangi bir farklılık tespit edilmedi (Şekil 5.10). Bu durum YHB uygulamasının BTV-9 virion yapısı üzerinde özellikle proteinlere her hangi bir olumsuz etkisi olmadığı şeklinde yorumlandı.

Şekil 5.10. Basınçlanmış ve basınçlanmamış BTV-9 virusa ait SDS-PAGE elektroforez analizi. 1. Hat - Prestained protein merdiveni (Broad range, Fermentas, Litvanya); 2. Hat - BTV-9; 3. Hat - YHB'a tabi tutulmuş BTV-9.



5.3.4. Viral RNA Analizi: Ultrasantrifügasyon ile purifiye edilen ve farklı YHB değerlerine 20 dakika süreyle maruz bırakılan veya YHB'yetutulmayan BTV-9'a ait genomik RNA'ların agaroz jel elektroforezi sonrasında, 242 Mpa YHB'ye tabi tutulan BTV-9'a ait genomik RNA tespit edilemedi. Diğer taraftan 140 ve 170 Mpa YHB uygulamasından sonra BTV-9 RNA'sının YHB uygulanmamış BTV RNA'sında olduğu gibi agaroz jelde dsRNA segmentleri gözlemlendi (Şekil 5.11). Bu bulgu yüksek hidrostatik basıncın viral RNA'yı parçaladığı şeklinde değerlendirildi.

Şekil 5.11. Farklı değerlerde basınçlanmış ve basınçlanmamış BTV-9 virusa ait genomik RNA'ların agaroz jel elektroforezi. 1. Hat - Lambda (λ) DNA HindIII kesimi (Fermentas, Litvanya); 2. Hat - BTV-9 RNA; 3. Hat - 140 Mpa YHB uygulanmış BTV-9 RNA; 4. Hat - 170 Mpa YHB uygulanmış BTV-9 RNA; 5. Hat - 242 Mpa YHB uygulanmış BTV-9 RNA.



5.4. Aşılama Çalışması (Immunoprofilaksi)

Aşılama çalışması sonunda her iki grup içindeki hayvanlarda aşılamaya bağlı Mavidil hastalığı belirtileri gözlemlenmedi. Bu durum, in vitro kontrollerde VERO-AFFSA hücrelerinde inaktivasyon sonrası yapılan kör pasajlar sonunda da her hangi bir hücresel patoloji görülmemesi ile teyit edildi. Diğer taraftan her iki grupta temas kontrol olarak 4. alt grupta deney süresince basındırılan 3'er adet hayvanda herhangi bir BTV enfeksiyonu bulgusu gerek 1. ve gerekse 2. aşılama sonrasında yapılan günlük kontroller ile tespit edilmedi.

Birinci deney grubunda epruvasyonun gerçekleştirildiği 70. gün kan serumu örneklerinde serotipler bazında ortalama antikor değeri 1/4-1/24 arasında değişirken, grup ortalaması yaklaşık olarak 1/16 olarak bulundu. Diğer taraftan, ikinci deney grubunda, aynı rakıta tepit edilen SN50 değerlerinin grup ortalaması yaklaşık olarak 1/14 düzeyinde saptandı (Tablo 5.4.). Yapılan değerlendirmeler sonunda 1/8 düzeyindeki Virus Nötralizan antikor titresinin, deneysel şartlarda bireyleri epruvasyondan korumaya yeterli olduğu gözlemlendi. BEI ile inaktive edilen viruslarla bağışıklandıktan sonra 1/4 antikor titresine sahip olan bireylerde, epruvasyon sonrası klinik BTV enfeksiyonu gözlemlendi. Bu grup içindeki 2. alt grupta yer alan bir bireyin epruvasyon sonrası hastalık belirtileri göstermediği görüldü. Benzer şekilde 2. grup (YHB ile inaktive edilen viruslar) hayvanlarda da 1/4 antikor titreli bir adet hayvanın BTV-9 epruvasyonu sonrası hastalandığı izlendi (Tablo 5.4.).

Tablo 5.4. Aşılama çalışmasında elde edilen nötralizan antikor titre değerleri ve epruvasyon sonuçları.

GRUP & ALTGRUP	AŞI	Ortalama Antikor Titresi (SN ₅₀)*			Epruvasyon	
		0. gün	30. gün	70. gün	Serotipi	Klinik BT [§]
GRUP 1 (G1)						
G.1.1.	BEI	- / - / -	2 / 8 / -	16 / 16 / 24	BTV-4	- / - / -
G.1.2.	INAKT.	- / - / -	- / 2 / -	4 / 4 / 16	BTV-9	- / - / +
G.1.3.	KOMB.	- / - / -	2 / - / -	4 / 16 / 8	BTV-16	+ / - / -
G.1.4.	YOK	- / - / -	- / - / -	- / - / -	BTV-4, -9, -16	+ / + / +
GRUP 2 (G2)						
G.2.1.	YHB	- / - / -	2 / - / -	24 / 8 / -	BTV-4	- / - / +
G.2.2.	INAKT.	- / - / -	2 / - / -	16 / - / 4	BTV-9	- / + / +
G.2.3.	KOMB.	- / - / -	- / - / -	8 / - / 16	BTV-16	- / + / -
G.2.4.	YOK	- / - / -	- / - / -	- / - / -	BTV-4, -9, -16	+ / + / +

* 100DKID₅₀ titreli homolog virusu inhibe eden serum sulandırma değeri logaritması.

§ (+) Mavidil hastalığı gelişti, (-) Mavidil hastalığı gelişmedi

Çalışma gruplarında 2. aşılamanın gerçekleştirildiği 30 günde alınan kan örneklerinde koruyucu (1/8) antikor titresinin sadece grup 1 deki 1 adet hayvanda tespit edildiği, çalışma kapsamındaki diğer tüm hayvanlarda elde edilen antikor değerlerinin korumaya yeterli olmadığı gözlemlendi.

Yapılan bir diğer değerlendirmede ise BTV-4 ile yapılan aşılama çalışmasının her iki inaktivasyon yöntemi sonrasında da gruplarda en yüksek bağışıklık düzeyini tesisi ettiği saptandı. Grup 1 de yer alan hayvanlarda BTV-9 ve BTV-16 ile yapılan eprüvasyonlar sonrasında ilgili alt grupları oluşturan hayvanların birer tanesinde BT belirtileri (yüksek ateş, hiep salivasyon, oral mukoza hiperemisi, kuyruk altı bölgede hiperemik ve hemorajik lezyonlar) tespit edildi. Grup 2'de ise YHB ile inaktive edilerek hazırlanan her üç serotipe karşı aşılanan hayvanlarda birer hayvan BTV-4 ve BTV-16 eprüvasyonundan sonra, 2 hayvanda ise BTV-9 eprüvasyonundan sonra BT belirtileri gözlemlendi (Tablo 5.4.). Buradan hareketle BTV aşısı hazırlanması protokollerine tabi tutulacak aday virusların en azından in vitro replikasyon karakteristiğinin çok iyi etüt edilmesi gerekliliği sonucuna varıldı.

6. SONUÇ

Proje kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar sonunda elde edilen sonuçlar alt başlıklar halinde aşağıda sunulmuştur.

6.1. Viroloji ve Moleküler Epidemiyoloji

Projede temel virolojik ve moleküler epidemiyolojik yönden kontrol edilen 26 adet BTV izolatından 21 adedine ait değerlendirilebilir veri elde edilmiştir. Serotip farkı gözetilmeksizin yapılan infektivite değerlendirmelerinde, özellikle ETY inokulasyonlarından elde edilen örneklerin hücre kültürüne daha kolay adapte olduğu gözlenmiştir. Bu amaçla BHK-21 hücrelerinin tercih edilmesi, viral prodüktivitenin ilk in vitro adaptasyonda bile çok yüksek olması açısından önerilmektedir. BHK-21 hücrelerinde yeterli çokluğa erişen BT virusları dilerirse VERO hücre hattına adapte edilebilir. Ancak yapılan tüm çalışmalara rağmen in vitro kültürasyonu sonrasında izolatların tümü için enfektivite titrelerinin çok dar bir aralıkta kaldığı saptanmıştır. Bu virusların büyük çoğunluğunun BTV-9 olduğu, 2 adedinin BTV-16 ve 2 adedinin de BTV-4 olarak tanımlandığı sonucu dikkate alındığında, 1998-2001 yıllarında meydana gelen endemik (bölgesel) BT olgularının büyük oranda BTV-9 serotipi tarafından meydana getirildiği söylenebilir. Bu Serotipin ayrıca söz konusu dönem için özellikle Trakya ve Batı Anadolu'da (özellikle kıyı Ege) predominant serotip olduğu sonucuna varılmıştır. Diğer taraftan Antalya ve diğer güney Anadolu bölgelerinde ise hemen her üç serotipin de tespit edilmiş olması, Türkiye'nin BTV-9 ve 16 serotipleri ile batısından ve BTV-4 serotipi ile de doğusundan enfekte olduğu savını güçlendirmektedir.

Araştırmada üzerinde çalışılan BTV izolatlarından 21 adedine ait NS3/3A kodlayan S10 gen bölgesine ait nükleotid dizisi dünya gen bankası tarafında da onaylanarak arşivlerine dahil edilmiştir. Bu dizilerin filogenetik değerlendirmesi, virusların S10 dizinleri açısından kendi içinde 2 gruba ayrılabilceğini ve yine ülkemizde tespit edilen özellikle BTV-9 serotipinin yakın batı komşularımızda tespit edilen virüslara çok yakın olduğunu ortaya koymuştur. S10 gen dizinlerinin en önemli karakteristiği, dünya coğrafyasına uygun yerleştirmelere olanak tanıyan analizler için uygunluğudur. Bu noktada, gen bankasından da elde edilenlerle birlikte toplam 126 adet BTV S10 dizini UPGMA analizine tabi tutulmuştur. Bu analizler sonrasında elde edilen en önemli sonuç izolatlarımızın tamamının özellikle Afrika-Akdeniz (AFMED) topolojik grubunda yer almasıdır. Bu durum da açıklıkla lokal serotiplerin bölgedeki sirkülasyonunu ortaya koymaktadır.

6.2. Virusun YHB ile İnaktivasyonu ve YHB'nin Virion Üzerine Etkisi:

Yüksek Hidrostatik Basınç (YHB) son yıllarda değişik familyalara ait viruslar üzerinde etkileri yönünden çalışılan önemli bir fiziksel yöntem olarak gündeme gelmektedir. Son 10 yıl içinde YHB'ye tabi tutulmuş virusların yapısal özelliklerindeki ve buna bağlı olarak enfektivitelerindeki değişikliklerin araştırılışı çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada da BTV serotipleri arasından model olarak seçilen BTV-9 farklı ısı ve zaman şartlarında değişken YHB'a tabi tutulmuştur. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde;

- yüksek hidrostatik basınç uygulaması sonrasında özellikle ortam ısısının serin tutulduğu (0°C) durumlarda çevre ısısına (25°C, ambient) göre virusun daha etkin bir şekilde enfektivitesini yitirdiği,
- en etkin inaktivasyonun 242 MPa basınç değerinde meydana geldiği, bu basınç değerinde sürenin önemsiz olduğu,
- Yüksek hidrostatik basınçın inaktivasyon altı değerleri uygulandığında mavidil virusunun enfektivite profilinin en önemli parametrelerinden olan adsorbsiyon, penetrasyon, çoğalma kinetiklerinin seyrinin ve viral plak çap ölçülerinin değişmediği,
- Viral protein kompozisyonunun inaktivasyona neden olan basınç değerinde (242 Mpa) bile kontrol virusa oranla önemli herhangi bir değişiklik olmadığı,
- Diğer taraftan uygulanan basınç değerine paralel olarak virusun dsRNA genom segmentlerinin parçalandığı, 242 Mpa YHB değerinde ise genom tespit edilemediği,
- Son kullanım amacı ne olursa olsun daha önce yapılan araştırmalarla uyumlu olarak, YHB'nin virus inaktivasyonu için uygun bir yöntem olabileceği sonuçlarına varıldı.

Diğer taraftan, bu çalışma kapsamında kullanılan ve ODTU Gıda Mühendisliği bölümünde kurulu bulunan YHB cihazının kapasite olarak endüstriyel anlamda yüksek hacimli virus süspansiyonlarının inaktivasyonu için yeterli olmadığı gözlemlenmiştir. Bu noktada yerli üretim olan bu cihazın daha yüksek kapasiteli örnekleri inaktive edebilecek ileri bir prototipinin kullanılabilmesi bu amaç için daha uygun olabilecektir.

6.3. Aşılama Çalışması (İmmunoprofilaksi):

Mavidil enfeksiyonuna karşı süregelen aşılama uygulamaları hep attenüe aşılarla yapılmıştır. Ancak özellikle virus genomunun segmentli dsRNA olmasından kaynaklanan bir durum olarak, aşılanan hayvanlarda aşı virusu ile saha suşlarının ortak enfeksiyonu mümkün olabilmektedir. Bu durumun en önemli sonucu ise sahada daha önce oluşmuş bağışık

yanıtlardan kaçabilecek varyantların (antijenik) oluşumudur. Bu olumsuzluk araştırmacı ve kurumları enfeksiyonla mücadele adına inaktif mono veya polivalan aşılarda üretilmesine yönlendirmiştir. Viral inaktivasyon ağırlıklı olarak kimyasal ajanlarla gerçekleştirilmektedir. Ancak bu tip ajanların aşılama sonrası özellikle uygulama yerinde oluşturabilecekleri beklemeyen etkiler, en önemli dezavantajlardan bir tanesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle gelecek vaadeden bu teknikle inaktive edilen bir virusun geleneksel yolla (kimyasal) inaktive edilen şekline oranla profilaktik ürünün kullanım olanağı araştırılmıştır.

Inaktivasyon işleminin viral protein kompozisyonu üzerine herhangi bir olumsuz etkisinin tespit edilememesi bu amaca yönelik iyi bir başlangıç noktası olarak kabul edilmiştir. Bu noktadan hareketle yapılan deneysel düzenekle, her iki inaktivasyon yönteminin çoklu aşılamalara bireysel cevaplar humoral bağışıklık açısından etkisi sorgulanmıştır. Yapılan çalışma sonunda özellikle BEI kullanılarak gerçekleştirilen inaktivasyonla elde edilen virus aşılama sonrası bağışık yanıt daha yüksek olmuştur. Bu durum muhtemelen BEI inaktivasyonu ile daha fazla hacimde virus inaktivasyonunun süratle elde edilebilmesi ve konsantrasyon oranının fazla olmasından kaynaklanmaktadır. Grup 2'de yer alan hayvanların aşılama için ihtiyaç duyulan virus miktarının YHB ile inaktivasyonu, cihaz kapasitesinin düşüklüğü sebebiyle tekrarlayan kereler uygulamalar ile elde edilebilmiştir. Bu hazırlama güçlüğü, aşılama sonrası Grup 1 hayvanlara oranla bu grup hayvanlarda daha düşük oranda bağışık yanıt oluşmasının bir nedeni olabilir.

Aşılama sonrasındaki ilk 30 gün süresince her iki grupta bulunan hayvanların hiç birisinde her üç serotipe karşı etkin bir bağışık yanıt oluşumu gözlenmemiştir. Sadece G.1.1.'de bir hayvanda 1/8 değerinde BTV-4 nötralizan antikorları bulunabilmiştir. Bu durum etkin bir bağışıklama için mutlaka tekrarlayan uygulamaların yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur. Araştırmanın geneli itibarıyla BTV-4 antikorları, BTV-9 ve BTV-16 nötralizan antikorlarından daha yüksek titrede oluşmuştur. Epruvasyonun yapıldığı aşılama sonrası 70. gündeki antikor titreleri genel ortalama itibarıyla Grup 1 titreleri Grup 2 titrelerinden daha yüksek bulunmuştur. Bu durum daha önce de belirtildiği gibi YHB inaktive virusların hazırlanış prosedüründeki uygulama zorluklarından kaynaklanabilir. Epruvasyon sonrası Grup 2 hayvanlarında daha fazla oranda klinik BT tespit edilmiştir. Grup 1 hayvanlarında birer adet hayvanda (G.1.2. ve G.1.3.) BT hastalığı gözlemlendi. Grup 2'de ise BTV-4 ile epruve edilen 1, BTV-9 ile epruve edilen 2 ve BTV-16 ile eprive edilen 1 adet hayvanda klinik BT tespit edilmiştir.

7. ÖNERİLER

- Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, araştırmada aşılana hayvanlarda her üç serotipe karşı %100 koruma elde edilememiş olsa da bağışıklamanın başarılı olduğu bireylerin varlığı gelecek uygulamalar için umut vericidir,
- Bu noktada daha fazla hayvanın yer aldığı çalışma grupları ile araştırmaların devam etmesi gereklidir,
- Yüksek prodüktivitede virus üretilmelidir,
- Virus konsantrasyonu amacıyla değişik teknikler denenmelidir,
- Adjuvanizasyon amacıyla nanopartiküler yapıları içeren ürünler mutlaka deneme kapsamına alınmalıdır,
- Değişik kimyasal maddeler kullanılarak inaktivasyon denemeleri genişletilmelidir,
- Basınçlama çalışmaları daha büyük kapasiteli cihazlarla denenmelidir,

8. KAYNAKLAR

- Anonim (1980). Epizootiology, diagnosis and control of bluetongue in Turkey. Bull. Off. Int. Epiz., 92 (7-8) : 567-564
- Anonim (1999) Bluetongue emergency in Bulgaria, Turkey and Greece. In,EMPRES Transboundary Animal Diseases Bulletin. Eriřim: [http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/X3444e/x3444e04.htm]
- Anonim (2004a) Bluetongue in Croatia. Serological findings in sentinel bovine animals. Follow-up report no:1. In, Disease Information, 3 December 2004, Eriřim [http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS_16.HTM#Sec0]
- Anonim (2004b) Bluetongue in Morocco. Follow-up report no:5. In, Disease Information, 3 December 2004, Eriřim [http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS_16.HTM#Sec9]
- Anonim (2004b) Bluetongue in Portugal. Follow-up report no:1. In, Disease Information, 3 December 2004, Eriřim [http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS_16.HTM#Sec8]
- Anonim (2004b) Bluetongue in Spain. Follow-up report no:4. In, Disease Information, 3 December 2004, Eriřim [http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS_16.HTM#Sec2]
- BOLAT, Y. (1986). Elazığ, Diyarbakır ve şanlıurfa illerinde koyunların mavi dil hastalığının yayılması üzerinde serolojik araştırmalar. S. Ü. Vet. Fak. Derg., 2(1): 103-112.
- BREARD, E., SAILLEAU, C., HAMBLIN, C., ZIENTARA, S. (2005). Bluetongue virus in the French Island of Reunion. Vet Microbiol, 106:157-165.
- BURGU, I., URMAN, H. K., AKÇA, Y., YONGUÇ, A., MELLOR, P. S., HAMBLIN, C. (1992). Serologic survey and vector surveillance for bluetongue in Southern Turkey. In: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses. Proceedings of the second international symposium. Walton, T. E., Osburn, B. I. [Eds], CRC Press inc., p: 168-174.
- CALISHER, C. H. (1992) Diagnostic prosedures for arboviruses. In: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbivirusus. Ed.: T.E. Walton, B. I. Osburn, CRS Pres Inc., Fla., p:525-532

- DİK, B. (1997). Ceratopogonid'ler ve parazitolojik önemleri. Parazitoloji'de Arthropod hastalıkları ve vektörler. Ed.: A. Özcel, N. Daldal, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:13, 111-143
- DUNGU, B., POTGIETER, C., VON TEICHMAN, B., SMIT, T. (2004) Vaccination in the control of bluetongue in endemic regions: the South African experience. Dev Biol (Basel).;119:463-72
- ERASMUS, B.J. (1990). Bluetongue virus. In: Virus infection of ruminants. Ed.: Z. Dinter, B. Morein, Amsterdam, The Netherland, p.: 227-237
- ERTÜRK, A. (1994). Çeşitli serumlarda (sığır, koyun, keçi) mavidil antikorlarının agar jel presipitasyon testi ile karşılaştırılması. Etlik Vet. Mikrobiol. Derg., 7(5) :1-9
- ERTÜRK, A., TATAR, N., KABAKLI, O. , INCOGLU, S., CIZMECI, S.G., BARUT, F.M. (2004) The current situation of bluetongue in Turkey. Vet. Ital., 40 (3), 137-140
- FENNER, F., BACHMANN, P.A., GIBBS, B.P.J., MURPHY, F.A., STUDDERT, M.J., WHITE, D.O. (1987). In: Veterinary Virology. Academic Press, Orlando Florida, USA.
- GASPAR, L.P., SILVA, A.C. B., GOMES, A.M. O., FREITAS, M.S., ANOBOM, A. P. D., SCHWARCZ, W. D., ESTECKY, J., NOVAK, M.J., FOGUEL, D., SILVA, J. L. (2002) Hydrostatic Pressure Induces the Fusion-active State of Enveloped Viruses. The Journal Of Biological Chemistry 277, 8433-8439.
- GIBBS, E. P. J. (1992). Epidemioloji of orbiviruses-bluetongue : towards 2000 and the search for patters. In: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbivirus. Ed.: T.E. Walton, B.I. Osburn, CRS. Pres Inc., FLA., p:694-700.
- GOLDSMIT, L., BARZILAI, E., TARMOR, A. (1975). The comparative sensitivity of sheep and chicken embryos to bluetongue virus and observations on viremia in experimentally infected sheep. Aust Vet J., 51 (4): 190-196.
- GÜRTÜRK, S., BURGU, İ., TOKER, A. (1980) Türkiye'de sığırlarda mavi dil (bluetongue) enfeksiyonu üzerinde araştırmalar. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 27(1-2): 322-330 (Ayrıbasım).

HOURRIGAN, J. L., KLINGSPORN, A. L. (1975) Epizootiology of bluetongue: The stituation in the United States of America. *Aust. Vet. J.*, 51(4): 203-208.

ISHIMARU, D., SÁ-CARVALHO, D., SILVA J. L. (2004) Pressure-inactivated FMDV: A potential vaccine. *Vaccine*, 22, 2334–2339.

KNUDSON, D.L., MONATH, T.P.(1990). Orbiviruses. In: *Fundamental Virology*, Ed.: B. N. Fields, D. M., KNIPE, P.M. Howley, 2th Edition, Lippincott-Raven, Pla., Newyork, USA p.:1405-1433.

MELLOR, P. S., JENNINGS, D. M., HAMBLING, C., BURGU, İ., URMAN, H. K., AKÇA, Y., HAZIROĞLU, R., ALKAN, F., YONGUÇ, A. D., AKÇORA, A., YAZICI, Z., ÖZKUL, A., EREN, H., ALTINSAAT, S. (1995). Control of akabane disease and surveillance of bluetongue and ephemeral fever, Turkey. United Nations Development Programme, Food and Agriculture Organization of The United Nations, Rome.

MELLOR, P. S., WITTMANN, E. J. (2002). Bluetongue virus in the Mediterranean basin 1998-2001. *Vet. Journal*, 164(1): 20-37.

MERTENS, P.P.C. (1999). Orbiviruses and Coltiviruses. In: *Encyclopedia of Virology*.Ed.: A. Granoff, R.G. Webster, Volum Two, Harcourt Science and Technology Compony, Academic Pres, San Diego Calif. USA. p.:1043-1061.

MURPHY, F.A., GIBBS, J.E.P., HORZINEK, C.M., STUDDENT, M.J. (1999). *Veterinary Virology*, 3th Edition, Raven Pres Ltd., Newyork,USA.

MURRAY, P.K., EATON, B.T. (1996) Vaccines for bluetongue. *Aust Vet J*, 73(6):207-10.

NIKOLAKAKI, S. V., NOMIKOU, K., KOUMBATI, M., MANGANA, O., PAPANASTAS-SOPOULOU, M., MERTENS, P.C., PAPADOPOULOS, O. (2005). Internet Erişimi : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=15993974&query_hl=1

PARSONSON, I. M. (1992). Overview of bluetongue virus infection of sheep. In: *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses*. Proceedings of the second internation symposium. Ed:

PEARSON, J.A., GUSTAFSON, G.A., SHAFER, A.L., ALSTAD, A.D. (1992). Diagnosis of Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease. In: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbivirus. Ed.: T.E. Walton, B.I. Osburn, CRS. Pres Inc., Fla., p.:533-546.

ROY, P. (2002). Orbivirus. Ed.: C. D. Tidona, G. Darai. The Springer Index Of Viruses. Springer-Verlag, Berlin, Germany. p.: 957-963.

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(9):805-11.

SELLERS, R. F. (1975). Bluetongue in Cyprus. *Aust. Vet. J.*, 51(4): 198-203.

EKLER

EK-1. Araştırmada Elde edilen BTV dizinleri (FASTA formatında). Bu dizinlere ait GenBank Accession Number'ları Tablo 5.1. de sunuldu.

>BTV_TR1

```
ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAATGAAACATAATCAAGAGAGAGTCTGAAGA
GCTAAGTTTGGTTCGTGTGGATGATACGATTTACAACCACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCGATGCCAACCGTTGCCCTTGAAATATTGGATAAAGCGATGTCAAACACTACTGGTGCTACG
CAAACACAGAAGGCGGAGAAAGCTGCATTTCGCATCGTACGCAGAAGCGTTTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAAACGTCATGTTAATGAACAGATCCTCCCAAAGTTAAAGAGTGATTTGGGTGGTTTAA
AGAAAAGAGAGCTATCATAACATGACGTTGTTAGTTGCCGCTGTTGTTGCGTTGTTGACGTCGGTA
TGCACGCTTTCAAGTGATATGAGCGTGGCGTTAAGCTTAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG
CGAAGAGTGAGAGAGGACTAAACCAGCAGATTGACATGATCAAGAAGGAAGTTATGAAGAAACAATCA
TATAATGATGCGGTGAGGATGAGCTTCACAGAATTTTCGTCCGTCCCGCTAGATGGTTTCGAACTACC
ATTAACCTAA
```

>BTV_TR2

```
ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAATGAAACATAATCAAGAGAGAGTCTGAAGA
GCTAAGTTTGGTTCGTGTGGATGATACGATTTACAACCACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCGATGCCAACCGTTGCCCTTGAAATATTGGATAAAGCGATGTCAAACACTACTGGTGCTACG
CAAACACAGAAGGCGGAGAAAGCTGCATTTCGCATCGTACGCAGAAGCGTTTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAAACGTCATGTTAATGAACAGATCCTCCCAAAGTTAAAGAGTGATTTGGGTGGTTTAA
AGAAAAGAGAGCTATCATAACATGACGTTGTTAGTTGCCGCTGTTGTAGCGTTGTCGACGTCGGTA
TGCACGCTTTCAAGTGATATGAGCGTGGCGTGCAAGCTTAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG
CGAAGAGTGAGAGAGGACTAAACCAGCAGATTGACATGATCAAGAAGGAAGTTATGAAGAAACAATCA
TATAATGATGCGGTGAGGATGAGCTTCACAGAATTTTCGTCCGTCCCGCTAGATGGTTTCGAACTACC
ATTAACCTAA
```

>BTV_TR3

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAATGAAACATAATCAAGAGAGAGTCTGAAGA
GCTAAGTGTGGTTCGTGTGGATGATACGATTTTACAACCACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCGATGCCAACCGTAGCCCTTGAATATTGGATAAAGCGATGTCAAACACTACTGGTGCTACG
CAAACACAGAAGGCGGAGAAAGCTGCATTTCGCATCGTACGCAGAAGCGTTTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAAACGTCATGTTAATGAACAGATCCTCCCAAAGTTAAAGAGTGATTTGGGTGGTTTAA
AGAAAAAGAGAGCTATCATAACACATGACGTTGTTAGTTGCCGCTGTTGTTGCGTTGTTGACGTCGGTA
TGCACGCTTTCAAGTGATATGAGCGTGGCGTTTAAAGCTTAAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG
CGAAGAGTGAGAGAGGACTAAACCAGCAGATTGACATGATCAAGAAGGAAGTTATGAAGAAACAATCA
TATAATGATGCGGTGAGGATGAGCTTcACAGAAATTTTCGTCCGGTcCCGCTAGATgGTTTCGAACTACC
ATTAAcCtAA

>BTV_TR4

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAATGAAACATAATCAAGAGAGAGTCTGAAGA
GCTAAGTTTGGTTCGTGTGGATGATACGATTTTACAACCACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCGATGCCAACCGTAGCCCTTGAATATTGGATAAAGCGATGTCAAACACTACTGGTGCTACG
CAAACACAGAAGGCGGAGAAAGCTGCATTTCGCATCGTACGCAGAAGCGTTTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAAACGTCATGTTAATGAACAGATCCTCCCAAAGTTAAAGAGTGATTTGGGTGGTTTAA
AGAAAAAGAGAGCTATCATAACACATGACGTTGTTAGTTGCCGCTGTTGTTGCGTTGTTGACGTCGGTA
TGCACGCTTTCAAGTGATATGAGCGTGGCGTTTAAAGCTTAAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG
CGAAGAGTGAGAGAGGACTAAACCAGCAGATTGACATGATCAAGAAGGAAGTTATGAAGAAACAATCA
TATAATGATGCGGTGAGGATGAGCTTCACAGAAATTTTCGTCCGGTCCCGCTAGATGGTTTCGAACTACC
ATTAAcCtAA

>BTV_TR5

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAATGAAACATAATCAAGAGAGAGTCTGAAGA
GCTAAGTTTGGTTCGTGTGGATGATACGATTTTACAACCACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCGATGCCAACCGTTGCCCTTGAATATTGGATAAAGCGATGTCAAACACTACTGGTGCTACG
CAAACACAGAAGGCGGAGAAAGCTGCATTTCGCATCGTACGCAGAAGCGTTTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAAACGTCATGTTAATGAACAGATCCTCCCAAAGTTAAAGAGTGATTTGGGTGGTTTAA
AGAAAAAGAGAGCTATCATAACACATGACGTTGTTAGTTGCCGCTGTTGTTGCGTTGTTGACGTCGGTA
TGCACGCTTTCAAGTGATATGAGCGTGGCGTTTAAAGCTTAAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG

GTTTAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG
CGAAGAGTGAGAGAGGACTAaACCAGCaGATTGACaTGATCAAGAAGGAAGTTATGAAGAAACaATCa
TATAATGATGCGGTGAGGATGAGCTTCACaGAATTTTCGTCCGTCCCGCTAGATGGTTtCGAACTACC
CTTAACCTAA

>BTV_TR6

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAATGAAACATAATCAAGAGAGAGTCAAGA
GCTAAGTTTGGTTCGTGTGGATGATACGATTTCAACACCACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCGATGCCAACCGTTGCCCTTGAATATTGGATAAAGCGATGTCAAACACTACTGGTGCTACG
CAAACACAGAAGGCGGAGAAAGCTGCATTTCGCATCGTACGCAGAAGCGTTTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAAACGTCATGTTAATGAACAGATCCTCCCAAAGTTAAAGAGTGATTTGGGTGGTTTAA
AGAAAAAGAGAGCTATCATAACACATGACGTTGTTAGTTGCCGCTGTTGTTGCGTTGTTGACGTCGGTA
TGCACGCTTTCAAGTGATATGAGCGTGGCGTTTAAAGCTTAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG
CGAAGAGTGAGAGAGGACTAAACCAGCAGATTGACATGATCAAGAAGGAAGTTATGAAGAAACAATCA
TATAATGATGCGGTGAGGATGAGCTTCACAGAATTTTCGTCCGTCCCGCTAGATGGTTTTCGAACTACC
ATTAACCTAA

>BTV_TR7

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAATGAAACaTAATCAAGAGAGAGTCAAGA
GCTAAGTGTGGTTCGTGTGGATGATACGATTTCAACACCACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCGATGCCAACCGTTGCCCTTGAATATTGGATAAAGCGATGTCAAACACTACTGGTGCTACG
CAAACACAGAAGGCGGAGAAAGCTGCATTTCGCATCGTACGCAGAAGCGTTTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAAACGTCATGTTAATGAACAGATCCTCCCAAAGTTAAAGAGTGATTTGGGTGGTTTAA
AGAAAAAGAGAGCTATCATAACACATGACGTTGTTAGTTGCCGCTGTTGTTGCGTTGTTGACGTCGGTA
TGCACGCTTTCAAGTGATATGAGCGTGGCGTTTAAAGCTTAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG
CGAAGAGTGAGAGAGGGCTAAACCAGCAGATTGACATGATCAAGAAGGAAGTTATGAAGAAACAATCA
TATAATGATGCGGTGAGGATGAGCTTCACAGAATTTTCGTCCGTCCCGCTAGATGGTTTTCGAACTACC
ATTAACCTAA

>BTV_TR8

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAATGAAACaTAATCAAGAGAGAGTCGAAGA
GCTAAGTGTGGTTCGTGTGGATGATACGATTTACAACCACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCGATGCCAACC GTT GCCCTT GAAATATTGGATAAAGCGATGTCAAACACTACTGGTGCTACG
CAAACACAGAAGGCGGAGAAAGCTGCATTTCGCATCGTACGCAGAAGCGTTTTTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAAACGTCATGTTAATGAACAGATCCTCCCAAAGTTAAAGAGTGATTTGGGTGGTTTAA
AGAAAAAGAGAGCTATCATAACATGACGTTGTTAGTTGCCGCTGTTGTTGCGTTGTTGACGTCGGTA
TGCACGCTTTCAAGTGATATGAGCGTGGCGTTTAAAGCTTAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG
CGAAGAGTGAGAGAGGGCTAAACCAGCAGATTGACATGATCAAGAAGGAAGTTATGAAGAAACAATCA
TATAATGATGCGGTGAGGATGAGCTTCACAGAATTTTCGTCCGTCcCGCTAGATGGTTTCGAACTACC
ATTAACCTAA

>BTV_TR9

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAATGAAACaTAATCAAGAGAGAGTCGAAGA
GCTAAGTGTGGTTCGTGTGGATGATACGATTTACAACCACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCGATGCCAaCCGTTGCCCTT GAAATATTGGATAAAGCGATGTCAAACACTACTGGTGCTACG
CAAaCACAGAAGGCGGAGAAAGCTGCATTTCGCATCGTACGcAGAAGCGTTTTTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAAACGTCATGTTAATGAACAGATCCTCCCAAAGTTAAAGAGTGATTTGGGTGGTTTAA
AGAAAAAGAGAGCTATCATAACATGACGTTGTTAGTTGCCGCTGTTGTTGCGTTGTTGACGTCGGTA
TGCACGCTTTCAAGTGATATGAGCGTGGCGTTTAAAGCTTAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG
CGAAGAGTGAGAGAgGACTAAaCCAGCAGATTGACATGATCAAGAAGGAAGTTATGAAGAAACCATCA
TATAATGATGCGGTGAGGATGAGCtTcACAGAATTTTCGTCCGTCcCGCTAGATGGTTTCGAACTACC
ATTAACCTAA

>BTV_TR10

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAATGAAACaTAATCAAGAGAGAGTCGAAGA
GCTAAGTGTGGTTCGTGTGGATGATACGATTTACAACCACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCGATGCCAACC GTT GCCCTT GAAATATTGGATAAAGCGATGTCAAACACTACTGGTGCTACG
CAAACACAGAAGGCGGAGAAAGCTGCATTTCGCATCGTACGCAGAAGCGTTTTTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAAACGTCATGTTAATGAACAGATCCTCCCAAAGTTAAAGAGTGATTTGGGTGGTTTAA
AGAAAAAGAGAGCTATCATAACATGACGTTGTTAGTTGCCGCTGTTGTTGCGTTGTTGACGTCGGTA

TGCACGCTTTCAAGTGATATGAGCGTGGCGTTTAAGCTTAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTtGTG
CGAAGAGTGAGAGAGGACTAAACCAGCAGATTGACATGATCAAGAAGGAAGTTATGAAGAAACAATCA
TATAATGATGCGGTGAGGATGAGCTTCACAGAAttTtGTCGGTCCCGCTAGATGGTTTCGAACTACC
ATTAACCTAA

>BTV_TR11

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAATGAAACATAATCAAGAGAGAGTCGAAGA
GCTAAGTGTGGTTCGTGTGGATGATACGATTTCAACAACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCGATGCCAACCGTTGCCCTTGAAATATTGGATAAAGCGATGTCAAACACTACTGGTGCTACG
CAAACACAGAAGGCGGAGAAAGCTGCATTTCGCATCGTACGCAGAAGCGTTTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAAACGTCATGTTAATGAACAGATCCTCCCAAAGTTAAAGAGTGATTTGGGTGGTTTAA
AGAAAAGAGAGCTATCATAACATGACGTTGTTAGTTGCCGCTGTTGTTGCGTTGTTGACGTCGGTA
TGCACGCTTTCAAGTGATATGAGCGTGGCGTTTAAGCTTAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG
CGAAGAGTGAGAGAGGACTAAACCAGCAGATTGACATGATCAAGAAGGAAGTTATGAAGAAACAATCA
TATAATGATGCGGTGAgGATGAGCTTCACAGAATTTTCGTCgGTCCCGCTAGATGGTtTCGAACTACC
ATtAAcCTAA

>BTV_TR12

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAATGAAACATAATCAAGAGAGAGTCGAAGA
GCTAAGTGTGGTTCGTGTGGATGATACGATTTCAACAACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCGATGCCAACCGTTGCCCTTGAAATATTGGATAAAGCGATGTCAAACACTACTGGTGCTACG
CAAACACAGAAGGCGGAGAAAGCTGCATTTCGCATCGTACGCAGAAGCGTTTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAAACGTCATGTTAATGAACAGATCCTCCCAAAGTTAAAGAGTGATTTGGGTGGTTTAA
AGAAAAGAGAGCTATCATAACATGACGTTGTTAGTTGCCGCTGTTGTTGCGTTGTTGACGTCGGTA
TGCACGCTTTCAAGTGATATGAGCGTGGCGTTTAAGCTTAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG
CGAAGAGTGAGAGAGGACTAAACCAGCAGATTGACATGATCAAGAAGGAAGTTATGAAGAAACAATCA
TATAATGATGCGGTGAGGATGAGCTTCACAGAATTTTCGTCGGTCCCGCTAGATGGTATCGAACTACC
ATTAACCTAA

>BTV_TR18

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAAATGAAACATAATCAAGAGAGAGTCTGAAGA
GCTAAGTTTGGTTCGTGTGGATGATACGATTTTACAACCACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCGATGCCAACCGTTGCCCTCGAAATaCTGGACAAAGCGATGTCAAACACGACTGGTGCAACG
CAAACACAAAAGCGGAGAAAGCTGCATTTCGCATCGTACGCGGAAGCGTtTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAAATTAACGTCATGTTAATGAACAGATCCTCCCAAAGTTAAAGAGTGATTTGGGTGGTTTAA
AGAAAAGAGAGCTATCATAACATGACGTTGTTAGTTGCCGCTGTTGTTGCGTTGTTGACGTCGGTA
TGCACGCTTTCAAGTGATATGAGCGTGGCGTTTAAAGCTTAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG
CGAAGAGTGAGAGAGGACTAAACCAGCAGATTGACaTGATCCAGAAGGAAGTTATGAAGAAACCATCA
TATTATGATGCGGTGAGGATGAGCTTACAGAATTTTCGTGCGTCCCGCTAGATGGTTTCGAACTACC
ATTAACCTAa

>BTV_TR19

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAAATGAAACATAATCAAGAGAGAGTCTGAAGA
GCTAAGTTTGGTTCGTGTGGATGATACGATTTTACAACCACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCGATGCCAACCGTTGCCCTTGAATATTGGATAAAGCGATGTCAAACACTACTGGTGCTACG
CAAACACAGAAGGCGGAGAAAGCTGCATTTCGCATCGTACGCAGAAGCGTTTTTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAACGTCATGTTAATGAACAGATCCTCCCAAAGTTAAAGAGTGATTTGGGTGGTTTAA
AGAAAAGAGAGCTATCATAACATGACGTTGTTAGTTGCCGCTGTTGTTGCGTTGTTGACGTCGGTA
TGCACGCTTTCAAGTGATATGAGCGTGGCGTTTAAAGCTTAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG
CGAAGAGTGAGAGAGGACTAAACCAGCAGATTGACaTGATCCAGAAGGAAGTTATGAAGAAACCATCA
TATTATGATGCGGTGAGGATGAGCTTACAGAATTTTCGTGCGTCCCGCTAGATGGTTTCGAACTACC
ATTAACCTAa

>BTV_TR20

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAAATGAAACATAATCAAGAGAGAGTCTGAAGA
GCTAAGTTTGGTTCGTGTGGATGATACGATTTTACAACCACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCGATGCCAACCGTTGCCCTTGAATATTGGATAAAGCGATGTCAAACACTACTGGTGCTACG
CAAACACAGAAGGCGGAGAAAGCTGCATTTCGCATCGTACACAGAAGCGTTTTTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAACGTCATGTTAATGAACAGATCCTCCCAAAGTTAAAGAGTGATTTGGGTGGTTTAA
AGAAAAGAGAGCTATCATAACATGACGTTGTTAGTTGCCGCTGTTGTTGCGTTGTTGACGTCGGTA

TGCACGCTTTCAAGTGATATGAGCGTGGCGTTTAAGCTTAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG
CGAAGAGTGAGAGAGGACTAAACCAGCAGATTGACATGATCAAGAAGGAAGTTATGAAGAAACAATCA
TATAATGATGCGGTGAGGATGAGCCTCACAGAATTTTCGTCCGTCCCGCTAGATGGTTTCGAACTACC
ATTAACCTAA

>BTV_TR21

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAATGAAACATAATCAAGAGAGAGTCAAGA
GCTAAGTTTGGTTCGTGTGGATGATACGATCTCACAACCACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCGATGCCAACCGTTGCCCTTGAAATATtGGATAAAGCGATGTCAAACACTACTGGTGCTACG
CAAACACAGAAGGCGGAGAAAGCTGCATtCGCATCGTACGCAGAAGCGTTTTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAAACGTCATGTTAATGAACAGATCCTCCCAAAGTTAAAGAGTGATTTGGGTGGTTTAA
AGAAAAAGAGAGCTATCATAACATGACGTTGTTAGTTGCCGCTGTTGTTGCGTTGTTGACGTCGGTA
TGCACGCTTTCAAGTGATATGAGCGTGGCGTTTAAGCTTAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG
CGAAGAGTGAGAGAGGACTAAACCAGCAGATTGACTTGATCCAGAAGGAAGTTATGAAGAAACcaTCa
TATAaTGATGCGGTGAgGATGAGCTTCACAGAATTTTCGTcGGTCCCGCTAGATGGTtTCGAACTACC
CTTAACCTaa

>BTV_TR22

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAATGAAACATAATCAAGAGAGAGTCAAGA
GCTAAGTTTGGTTCGTGTGGATGATACGATCTCACAACCACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCGATGCCAACCGTTGCCCTTGAAATATTGGATAAAGCGATGTCAAACACTACTGGTGCTACG
CAAACACAGAAGGCGGAGAAAGCTGCATTTCGCATCGTACGCAGAAGCGTTTTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAAACGTCATGTTAATGAACAGATCCTCCCAAAGTTAAAGAGTGATtGGGTGGTTTAA
AGAAAAAGAGAGCTATCATAACATGACGTTGTTAGTTGCCGCTGTTGTTGCGTTGTTGACGTCGGTA
TGCACGCTTTCAAGTGATATGAGCGTGGCGTTTAAGCTTAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG
CGAAGAGTGAGAGAGGACTAAACCAGCAGATTGACATGATCAAGAAGGAAGTTATGAaGAAACAATCA
TATAATGATGCGGTGAGGATGAGCcTcACAGAATTTTCGTCCGTCCCGCTAGATGGTTTCGAACTACC
ATTAACCTAa

>BTV_TR23

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAATGAAACATAATCAAGAGAGAGTCTGAAGA
GCTAAGTTTGGTCCGTGTGGATGACACGATTTCCCAACCGCCGAGATATGCTCCGAGTGCGCCCATGC
CATCATCGATGCCTACTGTTGCACTTGAAATCTTGGACAAAGCAATGTCAAATACAACGGGTGCTACG
CAAACACAAAAGCGGAGAAGGCTGCATTTCGCATCGTACGCAGAAGCGTTTCGTGATGACGTGAGGTT
GAGGCAGATTAAACGCATGTAAATGAACAAATTCTACCAAAGTTGAAAAGTGATCTAGGAGGCTTAA
AGAAGAAAAGAGCTATAATACATATGACACTACTGATAGCGGCGGTTGTTGCTCTGTTGACATCAGTT
TGCACGTTATCGAGTGATATGAGCGTGGCGTTTAAAGTTAAATGGTACATCAGCTGAGATACCTCAATG
GTTTAAAGAGTATGAATCCAATGTTAGGCGTGGTGAATCTGGGAGCTACCTTCTTGATGATGGTTTGTG
CAAAAAGTGAGAGAAGCTTGAACCAGCAAATTGACATGATTAAGAAGGAAGTGATGAAAAACAATCG
TATAATGATGCGGTGAGGATGAGTTTACGGAATtTTCATCAGTCCCGCTAGATGGTTTCGAATTACC
ATtAACCTAA

>BTV_TR24

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAATGAAACATAATCAAGAGAGAGTCTGAAGA
GCTAAGTGTGGTGCCTGTGGATGATACGATTTCAACAACCACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCGATGCCAACCGTTGCCCTTGAAATATTGGATAAAGCGATGTCAAACACTACTGGTGCTACG
CAAACACAGAAGGCGGAGAAAGCTGCATTTCGCATCGTACGCAGAAGCGTTTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAAACGTCATGTTAATGAACAGATCCTCCCAAAGTTAAAGAGTGATTTGGGTGGTTTAA
AGAAAAGAGAGCTATCATAACATGACGTTGTTAGTTGCCGCTGTTGTTGCGTTGTTGACGTCGGTA
TGCACGCTTTCAGTGATATGAGCGTGGCGTTTAAAGCTTAAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG
CGAAGAGTGAGAGAGGACTAAACCAGCAGATTGACATGATCAAGAAGGAAGTTATGAAGAAACAATCA
TATAATGATGCGGTGAGGATGAGCTTACAGAATATACGTCCGTCCAGCTAGATGGTtCGAACTAcC
ATtAACCTAA

>BTV_TR25

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAATGAAACATAATCAAGAGAGAGTCTGAAGA
GCTAAGTGTGGTGCCTGTGGATGATACgATTTCaCaACCACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCAATGCCAACCGTTGCCCTTGAAATATTGGATAAAGCGATGTCaAACACTACTGGTGCTACG
CAAACACAGAAGGCGGaCAAAGCTGCATGCgCATCGTACACAGAAGCGTGCCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAAACGTCATGTAAATGAACAAATCCTACCAAAGTTAGaTAGTGAtCAGGGTGGTTTAA
AGAAAAGAGAGCTATCATAACATGACGTTGTTAGTCGCCGCTGTTGTTGcGTTGTTGACGTCGGTA
TGCAcGCTTACAAGTGATATGAGCGTGGcGTCTAAGCTTAAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG

CGAAGAGTGAGAGAGGACTAAACCAGCAGATTGACATGATCAAGAAGGAAGTTATGAAGAAACAATCA
TATAATGATGCGGTGAGGATGAGCTTCACAGAATTTTCGTCGGTCCCGCTAGATGGTTTCGAACTACC
ATTAACCTAA

>BTV_TR26

ATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTTCGAGGAAGAAAAATGAAACATAATCAAGAGAGAGTCGAAGA
GCTAAGTGTGGTGCCTGTGGATGATACgATTTCAcACCACCAAGATATGCTCCGAGTGCCCCAGTGC
CTTCATCAATGCCAACCGTTGCCCTTGAAATATTGGATAAAGCGATGTCAAACACTACTGGTGCTACG
CAAACACAGAAGGCGGATAAAGCTGCATTCGCATCGTACGCAGAAGCGTTTCGTGATGATGTGAGACT
AAGACAGATTAAACGTCATGTAAATGAACAAATCCTACCAAAGTTAGaTAGTGATcAGGGTGGTTTAA
AGAAAAGAGAGCTATCATACACATGACGTTGTTAGTCGCCGCTGTTGTTGcGTTGTTGACGTCGGTA
TGCAcGCTTACAAGTGATATGAGCGTGGcGTCTAAGCTTAACGGCACATCAACGGAAATACCGCAGTG
GTTTAAGAGTCTAAATCCCATGCTTGGAGTAGTAAATCTGGGTGCGACTTTCATAATGATGGTTTGTG
CGAAGAGTGAGAGAGGACTAAACCAGCAGATTGACATGATCAAGAAGGAAGTTATGAAGAAACCATCA
TATAATGATGCGGTGAGGATGAGCTTCACAGAATTTACGTCGGTCCCGCTAGATGGTTTCGAACTACC
ATTAACCTAA

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje No: TOVAG 1050241
Proje Başlığı: Türkiye'de Mavidil Virus Moleküler Epidemiyolojisi Ve Profilaktik Yaklaşımlar: Farklı İnaktivasyon Yöntemlerinin Kapsit Proteinleri Üzerine Etkisi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof. Dr. Aykut ÖZKUL Prof. Dr. Faruk BOZOĞLU, ODTÜ Dr. Arife ERTÜRK, TKB, MVKAEM Dr. Evin ÇALIŞKAN (GÜNGÖR), TKB, MVKAEM
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Dışkapı, 06110 ANKARA
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1.9.2005 – 31.3.2008
Öz (en çok 70 kelime) Mavidil ruminant türlerinde sokucu sinekler tarafından nakledilen ekonomik olarak önemli bir virus hastalığıdır. Çalışmada, 1998-2001 yılları arasında ülkemizde izole edilen 26 adet mavidil viruslarının moleküler epidemiyolojisi, farklı fiziksel ve kimyasal ajanlarla inaktivasyon dinamiğinin ortaya konması ve ruminant türlerinde profilaktik ürün olarak kullanılabilir inaktif trivalan aşı üretim olasılığının araştırılması amaçlanmıştır. Yapılan çalışmada, sadece 21 adet BTV izolatının NS3/3A kodlayan gen (S10) bölgelerinin dizi analizi yapılmış ve elde edilen diziler dünya gen bankasına gönderilerek, kabul numaraları alınmıştır. Bu virusların yapılan filogenetik analizlerinde özellikle 23 ve 26 nolu virusların ilgili gen bölgesi düzeyinde diğer BTV viruslarından farklı olduğu, diğer tüm virus izolatlarının birbirlerine çok daha yakın olduğu tespit edilmiştir. Tüm dünyadan elde edilen BTV S10 dizileri ile yapılan UPGMA analizleri sonrasında ise virusların orijin olarak bölgesel diğer viruslara enzerlik gösterdiği bir başka coğrafyaya ait viruslarla ayırt edilebilecek bir yakınlıklarının olmadığı tespit edildi. İnaktivasyon çalışmalarında model olarak seçilen BTV-9 ve BTV-16 viruslarının standart binaryetilenimin (BEI) konsantrasyonu ve değişken yüksek hidrostatik basınç (YHB) değerlerindeki inaktivasyon dinamikleri değerlendirildi. BEI ile muamele sonrasında virusların 8 saatten itibaren enfektivitelerini %100 oranında yitirdikleri saptandı. YHB uygulaması ile özellikle 4°C'de yapılan 242 Mpa değerindeki uygulamanın yaklaşık 15-20 dakika içinde virusların inaktivasyonuna neden olduğu gözlemlendi. YHB uygulamasının viral protein yapılarında önemli bir deformasyon veya değişikliğe neden olmadığı, diğer taraftan virusun dsRNA yapısındaki genomunu degrade ederek inaktivasyona neden olduğu sonucuna varıldı. Diğer taraftan inaktivasyona neden olmayan basınç değerlerinde (140, 170 Mpa) ise virus çoğalma kinetiği ve plak ölçütlerinin basınçlanmamış virüs benzer değerler göstermesi, viral proteinlerin zararsızlığı konusunda önceki bilgileri destekledi. Aşılama çalışmasında iki grup olarak ayrılan toplam 18 hayvan BEI ve YHB ile inaktive edilmiş

BTV-4, BTV-9 ve BTV-16 serotipleri ile simultane olarak aşılandı. Her iki grupta da 3'er adet koyun aşılanmaksızın temas kontrolde bırakıldı. Aşılamalar 30 gün arayla 2 kez yapıldı ve her iki grupta tüm hayvanlar (aşılı ve temas kontrol) aşılamadan 70. gününde enfektif BTV-4, BTV-9 ve BTV-16 virusları ile eprüve edildi. Koruyucu nötralizan antikor titresi 1/8 olarak belirlendi. Kombinasyonlu aşılamadan en iyi BTV-4 eprüvasyonuna karşı koruma sağladığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Mavdil virüsü, moleküler epidemiyoloji, Yüksek Hidrostatik Basınç, Aşılama

Projeden Yapılan Yayınlar: Segment 10 based Molecular Epidemiology of Bluetongue virus isolates in Turkey: 1999-2001 (Vet Res dergisine sunuldu, IF 4.5).

Aşılama çalışmalarlarıyla ilgili kısım yayına hazırlanmaktadır.