

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**KOYUN KEÇİ ÇİÇEK AŞISININ MDBK HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
ÜRETİLMESİ VE LUMPY SKİN DİSEASE'E KARŞI SIĞIRLARDA
BAĞIŞIKLIK ÇALIŞMASI**

SERDAR UZAR

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. NURİ TURAN**

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
VİROLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2019



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

KOYUN KEÇİ ÇİÇEK AŞISININ MDBK HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
ÜRETİLMESİ VE LUMPY SKİN DİSEASE'E KARŞI SIĞIRLARDA
BAĞIŞIKLIK ÇALIŞMASI

SERDAR UZAR

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. NURİ TURAN

VİROLOJİ ANABİLİM DALI
VİROLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

Bu çalışma 15.02.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Viroloji Anabilim Dalı,
Viroloji Doktora Programı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

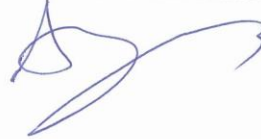
TEZ JÜRİSİ


Prof. Dr. Nuri TURAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Hüseyin YILMAZ
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi



Prof. Dr. Aydın GÜREL
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi



Prof. Dr. Yılmaz AKÇA
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi



Prof. Dr. Semra GÜMÜŐOVA
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Veteriner Fakültesi



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Serdar Uzar

İTHAF

Eşim Nursel ve oğlum Sarp'a ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve bu çalışma süresince desteklerini esirgemeyen danışman hocam Prof.Dr. Nuri TURAN'a, Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hüseyin YILMAZ'a ve Prof.Dr. Mustafa HASÖKSÜZ'e teşekkür ederim.

Çalışma boyunca yardım ve değerli katkılarından dolayı Gıda ve Kontrol Genel Müdür Yardımcısı Doç. Dr. Veli GÜLYAZ'a, Dr. Fahriye SARAÇ'a, Veteriner Hekim Hakan ENÜL'e, Biyolog Görkem ÇOLAK'a, Veteriner Hekim Cumhur ADIAY'a, Dr. Hamza KADI'ya, Dr. Utku ÇİZMECİGİL'e, Veteriner Hekim Derviş ÇELİK'e ve Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Viral Aşılar Üretim Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Zorlu öğrenim hayatım boyunca sabırla beni destekleyen eşim Nursel UZAR'a, annem Ferhunde UZAR'a ve babam Mahmut UZAR'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'nün projesi ile desteklenmiştir. Proje No: HSGYAD/17/A05/P06/88

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İ
BEYAN.....	İİ
İTHAF.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Etiyoloji.....	2
2.1.1. Tanım ve Tarihçe	2
2.1.2. Hastalığın Türkiye’deki Durumu	2
2.1.3. Lumpy Skin Disease Virusunun Özellikleri ve Sınıflandırma.....	3
2.1.4. Viral Yapı.....	4
2.1.5. Viral Replikasyon	5
2.2. Epizootiyoloji.....	6
2.2.1. Bulaşma.....	6
2.2.2. Lumpy Skin Disease Coğrafi Dağılımı	8
2.2.3. Konak Duyarlılığı	9
2.3. Klinik Bulgular	10
2.4. İmmun yanıt	12
2.5. Patogenez ve Histopatolojik Bulgular	13
2.6. Teşhis	14
2.6.1. Klinik ve Ayırıcı Teşhis	14
2.6.2. Laboratuvar Teşhisi.....	14
2.6.2.1. Viral Genom Tespiti.....	14
2.6.2.2. Antikor Tespiti	16

2.7. Koruma ve Kontrol	17
2.7.1. LSD ile Mücadelede Kullanılan Aşılar	18
2.7.2. Koyun-Keçi Çiçek Aşısının LSD ile Mücadelede Kullanılması	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. GEREÇLER	21
3.1.1. Hücre Kültürü	21
3.1.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar	21
3.1.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemeler	22
3.1.1.3. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Kimyasalların İçeriği	22
3.1.2. Kontrol Çalışmaları	23
3.1.2.1. Kontrol Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar	23
3.1.2.2. Kontrol Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	25
3.1.3. Etkinlik ve Zararsızlık Çalışması	25
3.1.3.1. Etkinlik ve Zararsızlık Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar	26
3.2. YÖNTEM	27
3.2.1. Aşı Üretim Çalışmaları	27
3.2.1.1. MDBK Hücre Kültürünün Hazırlanması	27
3.2.1.2. MDBK Hücre Kültürünün Kontaminantlar Yönünden Kontrolü	28
3.2.1.3. MDBK Hücre Kültürüne Aşı Virusunun Adapte Edilmesi	28
3.2.1.4. MDBK Hücre Kültürüne Adapte Olan Aşı Virusunun İdentifikasyonu	29
3.2.1.5. Adapte Olan Aşı Virusunun Üreme Özelliklerinin İncelenmesi	31
3.2.1.6. Aşı Virusunun Üretimi	31
3.2.1.7. Üretilen Aşı Virusunun Kontrol Testleri	32
3.2.1.8. Liyofilizasyon ve Paketleme	33
3.2.1.9. Liyofilizasyon Sonrası Kontrol	33
3.2.2. Bağışıklık Çalışmaları	34
3.2.2.1. Çalışma Öncesi Kontrol Testleri	34
3.2.2.2. Deney Hayvanlarının Aşılması	36
3.2.2.3. Zararsızlık Çalışması	37
3.2.2.4. Etkinlik Çalışması	38
4. BULGULAR	40
4.1. Aşı Üretim Çalışmaları Bulguları	40
4.1.1. MDBK Hücre Kültürü Hazırlanması ve Kontrolü	40

4.1.2. MDBK Hücre Kültürüne Aşı Virusunun Adapte Edilmesi	40
4.1.3. MDBK Hücre Kültürüne Adapte Olan Aşı Virusunun İdentifikasyonu.....	41
4.1.4. Aşı Virusunun MDBK Hücre Kültüründe Üreme Özellikleri	43
4.1.5. Aşı Virusunun Üretilmesi ve Kontrol Testleri	44
4.1.6. Liyofilizasyon, Paketleme ve Liyofilizasyon Sonrası Kontrol Testleri.....	44
4.2. Bağışıklık Çalışmaları Bulguları.....	45
4.2.1. Çalışma Öncesi Kontrol Testleri.....	45
4.2.2. Zararsızlık Çalışması.....	45
4.2.3. Etkinlik Çalışması	46
5. TARTIŞMA	60
KAYNAKLAR	66
ETİK KURUL KARARI	76
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	77
ÖZGEÇMİŞ	78

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1: P32 genini amplifiye etmek için kullanılan prob ve primerler (Bowden ve ark., 2008)	25
Tablo 2: Capripoxvirus real time PCR master mix içeriği	30
Tablo 3: Capripoxvirus real time PCR sıcaklık-zaman döngüsü.....	30
Tablo 4: Capripoxvirus ELISA sonuç değerlendirme	36
Tablo 5: Deney hayvanı grupları, aşı dozları ve titreleri	37
Tablo 6: Vasata geçen ve günlük virus titreleri	43
Tablo 7: Tekrarlanan dondurma ve çözündürme sonucu virus titreleri.....	44
Tablo 8: Aşılama sonrası SNT sonuçları	46
Tablo 9: Aşılama sonrası ELISA sonuçları ve OD değerleri.....	47
Tablo 10: Challenge titre ortalamaları ve logaritmik farklar	53
Tablo 11: Challenge sonrası rektal sıcaklıklar (°C).....	54
Tablo 12: Challenge sonrası kan örnekleri real time PCR Ct değerleri.....	55
Tablo 13: Challenge sonrası alınan svap örnekleri real time PCR Ct değerleri	56
Tablo 14: Challenge sonrası SNT sonuçları	57
Tablo 15: Challenge sonrası ELISA sonuçları ve OD değerleri.....	58
Tablo 16: Nekropside alınan doku ve organ örnekleri real time PCR Ct değerleri.....	59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Veteriner önemi olan Poxvirusların sınıflandırılması (Markey ve ark., 2013) ...	3
Şekil 2: LSDV genomu lineer haritası (Tulman ve ark., 2001)	5
Şekil 3: Capripoxvirus elektron mikroskop negatif boyama görüntüsü (Babiuk ve Kitching, 2011)	5
Şekil 4: Poxviruslara ait viral replikasyon döngüsü (Knipe ve Howley, 2007)	6
Şekil 5: LSD coğrafi dağılım 1929-2017 (Tuppurainen ve ark., 2017).....	9
Şekil 6: LSD enfeksiyonu sonrası görülen nekroze odak.....	11
Şekil 7: Generalize enfeksiyon.....	11
Şekil 8: MDBK hücre kültürü 7. gün negatif kontrol.....	40
Şekil 9: MDBK hücre kültüründe 7. gün CPE görüntüsü.....	41
Şekil 10: 10^{-4} virus sulandırmasında CPE görüntüsü	41
Şekil 11: Nötralizasyon yapılmış MDBK hücre kültürü görüntüsü (10.gün).....	42
Şekil 12: Nötralizasyon yapılmamış MDBK hücre kültüründe CPE (10.gün).....	42
Şekil 13: Aşı virüsü identifikasyonu için yapılan real time PCR sonuç görüntüsü	43
Şekil 14: A-1 numaralı sığırın challenge görüntüsü	48
Şekil 15: A-2 numaralı sığırın challenge görüntüsü	48
Şekil 16: B-1 numaralı sığırın challenge görüntüsü	49
Şekil 17: B-2 numaralı sığırın challenge görüntüsü	49
Şekil 18: B-3 numaralı sığırın challenge görüntüsü	50
Şekil 19: C-1 numaralı sığırın challenge görüntüsü	50
Şekil 20: C-2 numaralı sığırın challenge görüntüsü	51
Şekil 21: C-3 numaralı sığırın challenge görüntüsü	51
Şekil 22: D-1 numaralı sığırın challenge görüntüsü	52
Şekil 23: D-2 numaralı sığırın challenge görüntüsü	52

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- Afrika Yeşil Maymun Böbrek Hücresi Vero
- Agar Jel Immune Diffüzyon AGID
- Base Pair Bp
- Bovine Viral Diarrhea Virus BVDV
- Capripoxvirus CaPV
- Dakika devir sayısı rpm
- Dakika dk
- Deoksinükleotidler dNTPs
- Deoksiribonükleik Asit DNA
- Differentiating Infected from Vaccinated Animals DIVA
- Dimetil Sülfoksit DMSO
- Doku Kültürü İnfektif Doz 50 DKİD₅₀
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM
- Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü OIE
- Enzyme-Linked Immunosorbent Assays ELISA
- Ethylenediaminetetraacetic acid EDTA
- Floresan Antikor Testi FAT
- Fötal Bovine Serum FBS
- Glasgow Minimum Essential Medium GMEM
- Hematoksilen & Eozin Boyama H&E
- İndirekt Floresan Antikor Testi İFAT
- İyi Üretim Uygulamaları GMP
- Karbondioksit CO₂
- Koyun-keçi çiçek KKÇ
- Kuzu Böbrek Hücrelerinde 60. Pasajı Yapılmış Bakırköy Koyun Çiçek Aşı Suşu SP(BK)LK₆₀
- Kuzu Testis Hücresi OA3.Ts
- Loop-Mediated İzotermal Amplifikasyon Testi LAMP

Lumpy Skin Disease LSD

Lumpy Skin Disease Virusu LSDV

Madin Darby Bovine Kidney MDBK

Magnezyum Klorür $MgCl_2$

Messenger RNA mRNA

Mikrolitre μl

Nanometre nm

Open Reading Frame ORF

Optical Density OD

Parainfluenza 3 PI₃

PenLSD Suşunun Kuzu Testis Hücresinde 3. Pasajı LSD(P)Oa3.Ts₃

PenLSD Suşunun Kuzu Testis Hücresinde 3. Vero Hücresinde 10. pasajı LSD(P)Oa3.Ts
P₃Ver₁₀

Phosphate Buffer Saline PBS

Pleuropneumonia-Like Organisms PPLO

Polimerase Chain Reaction PCR

Pseudo-Lumpy Skin Disease Virusu BHV-2

Santigrat °C

Serum Nötralizasyon Testi SNT

Sheep Pox (SP)

Sitopatik Etki CPE

Threshold Cycle Ct

Yavru Hamster Böbrek Hücresi BHK₂₁

ÖZET

Lumpy Skin Disease(LSD) ile mücadelede ülkemizde heterolog koyun keçi çiçek (KKÇ) aşıları kullanılmaktadır. Yapılan bu çalışma ile canlı Bakırköy koyun çiçek aşı virusunun (SP(BK)LK₆₀), sığır orijinli MDBK hücre kültüründe üretimi ve sığırlarda LSD'ye karşı oluşturacağı bağışıklık, sahada kullanılmakta olan koyun keçi çiçek aşısıyla karşılaştırmalı olarak araştırıldı.

MDBK hücre kültürü %10 fetal sığır serumu içeren DMEM vasatı ile monolayer olarak hazırlandı ve SP(BK)LK₆₀ inokule edildi. CPE oluşumlarının ardından seri pasajlara geçildi ve 5.pasajı aşı olarak stoklandı. Aşı, koruyucu vasatla hazırlanarak liyofilize edildi ve kontrolleri yapıldı. Aşının zararsızlık çalışmasında 2 adet sığır MDBK'da üretilen aşıyla 10 doz, bağışıklık çalışmasında 3 adet sığır MDBK hücre kültüründe üretilen KKÇ aşısıyla 5 doz, 3 adet sığır mevcut KKÇ aşısıyla 5 doz olarak aşılandı. 2 adet sığır aşılanmayarak kontrol olarak belirlendi. Aşılama sonrası 31.gün tüm hayvanlara patojen LSD virusu Pendik suşu ile challenge yapıldı ve belirli günlerde kan ve svap örnekleri alındı. Aşılı ile aşısızlar arasında oluşan challenge titresinin logaritmik farkları hesaplandı.

MDBK hücre kültürüne yapılan inokulasyon sonucunda 7. günde CPE oluşumu gözlemlendi. MDBK hücre kültüründe seri pasajları yapılan virus, koyun çiçek virusu olarak tanımlandı ve titresini $10^{-5.75}$ /ml olarak saptandı. Aşının zararsızlık çalışmasında 10 doz ile aşılanan hayvanlarda klinik olarak herhangi bir durum gözlemlenmedi. Challenge sonrası MDBK'da üretilen aşıyla aşılanan hayvanlar ile aşısız hayvanlar arasındaki titre farkının log 2,5'dan az olduğu ve aşılı hayvanlarda viremi gerçekleşirken mevcut aşıyla aşılanan hayvanlarda titre farkının log 2,5'dan fazla olduğu ve viremi gerçekleşmediği tespit edildi.

Yapılan çalışmayla Bakırköy koyun çiçek aşı virusu MDBK hücre hattında üretilmesine rağmen, sığırlarda LSD'ye karşı tam olarak koruma sağlamasa da virus saçılımına engel olduğu, Penpox-M ticari adlı koyun keçi çiçek aşısının ise sığırlarda LSD'ye karşı koruduğu belirlenmiştir.

Uzar, S. (2018). Koyun Keçi Çiçek Aşısının Mdbk Hücre Kültüründe Üretilmesi ve Lumpy Skin Disease'e Karşı Sığırlarda Bağışıklık Çalışması. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Viroloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Anahtar Kelimeler: Lumpy Skin Disease, Aşı, MDBK, Hücre Kültürü, Koyun Keçi Çiçek

Bu çalışma, Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'nün projesi ile desteklenmiştir. Proje No: HSGYAD/17/A05/P06/88

ABSTRACT

Sheep and goat pox (SGP) vaccines are used heterologously against Lumpy Skin Disease (LSD) in Turkey. In this study, it was investigated the propagation of Bakirkoy Sheep Pox(SP) vaccine virus in bovine origin MDBK cells and evaluated the immunity of vaccine against LSD in cattle with comparison to the currently used SGP vaccine in the field.

Monolayer MDBK cells were prepared with DMEM containing 10% fetal bovine serum and SP(BK)LK₆₀ was inoculated. After cytopathogenic effect (CPE) formation, serial passages were in MDBK and 5th passage was stored as vaccine bulk. SP vaccine virus with protective media was lyophilized and quality controls were taken. In safety study, 2 cattle were vaccinated with 10 doses of SGP vaccine produced in MDBK. In efficacy study, 3 cattle were vaccinated with SGP vaccine produced in MDBK, 3 cattle vaccinated with Penpox-M. 2 cattle were not vaccinated as control animal. After vaccination on the day 31, all animals were challenged with virulent PenLSD strain and blood and swap samples were taken periodically. Logarithmic differences of the challenge titers between vaccinated and non-vaccinated were calculated.

On the 7th day post inoculation CPE formation was observed and the serial passages in MDBK were identified as SP virus with titer $10^{-5.75}$ /ml. In safety study, clinical sign wasn't observed in animals vaccinated with 10 doses. It was determined that difference between the animals vaccinated with vaccine produced in MDBK cells and unvaccinated was less than log 2.5 and the viremia occurred in vaccinated animals. The titer difference was higher than log 2.5 in animals vaccinated with the Penpox-M, and viremia didn't occur.

In conclusion, this study revealed that Bakirkoy SP vaccine virus was propagated in MDBK cells and it is safe to administered in cattle but it didn't provide fully protection although it halted spread of the disease, Penpox-M provided protection against LSD.

UZAR, S. (2018). Propagation of Sheep and Goat Pox Vaccine in MDBK Cell Culture and Immunity Study in Cattle Against Lumpy Skin Disease. İstanbul University Cerrahpasa, Institute of Postgraduate Education, Department of Virology. PhD Thesis. İstanbul.

Key Words: Lumpy Skin Disease, Vaccine, MDBK, Cell Culture, Sheep and Goat Pox, Immunity

The present work was supported by the Ministry of Agriculture and Forestry, General Directorate of Agricultural Research and Policy. Project No: HSGYAD/17/A05/P06/88

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lumpy Skin Disease (LSD) sığırlarda ateş, lenf düğümlerinin büyümesi, deride sert ve sınırlı nodüller ve ağız mukozası başta olmak üzere mukoz memranlarda ülseratif lezyonlar ile karakterize, Capripoxvirusların neden olduğu bir hastalıktır (Tuppurainen ve ark., 2012). Genellikle düzenli aralıklarla endemik bölgelerde görülür veya bir bölge veya ülke çapında oldukça hızlı yayılım gösteren salgınlara neden olabilir (Davies, 1991a).

2013 yılından beri ülkemizde görülen LSD ekonomik olarak ülke hayvancılığı için ciddi tehlike oluşturmakta ve hastalıkla mücadele bakımından etkili yolların kullanılmasını zorunlu kılmaktadır. LSD ile mücadelede en etkili yöntem aşılama ve vektörle mücadeledir. LSD saha izolatlarından geliştirilen aşılar kullanılmış fakat kullanılan bu aşuların güvenlik sorunlarının olduğu bildirilmiştir (Abutarbush ve ark., 2018). Şu an için bilinen en güvenilir yol koyun-keçi çiçek (KKÇ) aşısıyla bağışıklık sağlamaktır. Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Viral Aşılar Üretim Laboratuvarı tarafından üretilen mevcut koyun-keçi çiçek aşısı halen sığırlarda LSD'ye karşı güvenilir şekilde kullanılmaktadır. Hastalığın vektörlerle kontrolsüz olarak bulaşması ve homolog LSD aşılarının güvenlik sorunlarının olmasından dolayı sahada kullanılmakta olan koyun keçi çiçek aşısının immunitesinin artırılmasına yönelik çalışmalar yapılması ihtiyacını ortaya koymaktadır.

Yapılan bu tez ile primer kuzu böbrek hücrelerinde attenüe edilmiş koyun-keçi çiçek aşısı virusunun (SP(BK)LK₆₀), MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) hücre kültürüne adaptasyonu ve bu hücre hattında üretimi amaçlanmıştır. Sığır orijinli MDBK hücre kültüründe üretilen KKÇ aşısının sığırlarda LSD'ye karşı oluşturacağı bağışıklık, mevcut KKÇ aşısıyla karşılaştırmalı olarak challenge çalışmaları ve serolojik olarak araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Etiyoloji

2.1.1. Tanım ve Tarihçe

Sığırların Nodüler Ekzantemi - Lumpy skin disease (LSD) Capripoxvirusların neden olduğu, ateş, lenf yumrularında büyüme, başta ağız mukozası olmak üzere mukoz membranlarda ülseratif lezyonlar, deride sert ve sınırlı nodüller ile karakterize bir hastalıktır (Tuppurainen ve ark., 2012). Genellikle endemik bölgelerde düzenli aralıklarla görülmesinin yanında bir bölge veya ülke çapında oldukça hızlı yayılım gösteren salgınlara da neden olabilmektedir (Davies, 1991a).

Hastalık ilk olarak 1929 yılında Zambia'da görülmüş, 1943 yılı itibariyle Botsavana'ya yayılmıştır ve daha sonra hastalık Güney Afrika'ya girerek 8 milyon sığıri etkilemiş, büyük ekonomik kayıplara sebebiyet vermiştir. 1957 yılında Kenya'ya giren LSD, koyun çiçeği hastalığı ile beraber salgın oluşturmuştur. 1970 yılında Sudan'a yayılan hastalık, 1974 yılı itibariyle Nijerya'ya geçmiş ve 1977 yılında ise Moritanya, Mali, Gana ve Liberya'da rapor edilmiştir. 1981-1986 yılları arasında meydana gelen başka bir LSD salgınında ise Tanzanya, Kenya, Zimbabwe, Somali ve Kamerun'da etkilenen hayvanlardaki mortalite oranı %20 olarak rapor edilmiştir. Sahra çölünün kuzeyindeki ve Afrika kıtasının dışındaki LSD vakası, 1988-1989 yılları arasında Mısır ve İsrail'de ilk defa tespit edilmiş ve 2006'da tekrar 17 yıllık bir dönemin ardından hastalık bildirilmiştir. Son on yılda, LSD vakaları Orta Doğu, Avrupa ve Batı Asya bölgelerinde bildirilmiştir (OIE Terrestrial Manual, 2017).

Ülkemizde ilk klinik olarak şüpheli LSD vakaları Eylül 2013'te Suriye sınırındaki Kahramanmaraş ve Batman illerinde görülmüştür. LSD Ulusal Referans Teşhis Laboratuvarı olan Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne şüpheli olarak gönderilen numunelerden yapılan PCR ile, LSD virus nükleik asidi tespit edilmiştir (Saraç, 2017).

2.1.2. Hastalığın Türkiye'deki Durumu

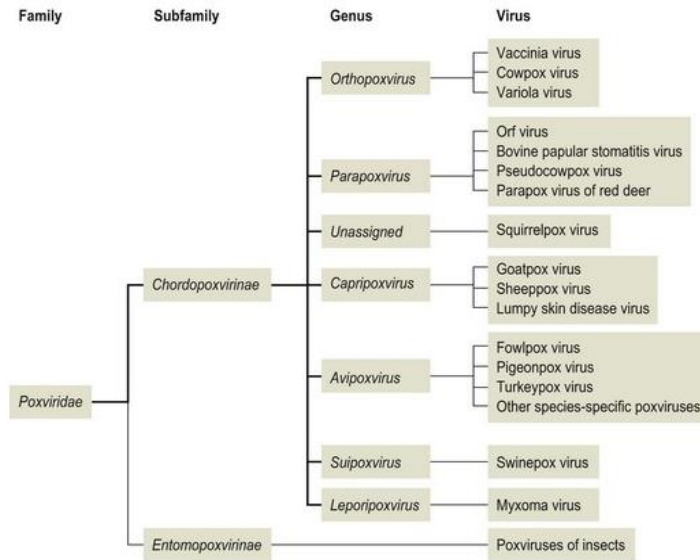
Klinik olarak şüpheli LSD vakaları ilk kez Eylül 2013'te Suriye sınırındaki Kahramanmaraş ve Batman illerinde görülmüştür. Deri lezyonlarını, kan ve burun akıntısını içeren numuneler, LSD ulusal referans teşhis laboratuvarı olan Pendik

Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gönderilmiştir. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) el kitabında belirtilen metota göre yapılan PCR testiyle söz konusu vakalar pozitif olarak tespit edilmiştir (Saraç, 2017).

2013 yılında ülkede sadece 18 mihrak varken, 2014 yılı sonunda bu sayı 784'e ulaşmıştır. 2015 yılı itibariyle yapılan yoğun aşılama programı, hayvan hareketlerinin sıkı kontrolü, kullanılan koyun keçi çiçek aşısı dozunun 3 doza çıkması ile LSD mihrak sayılarında ciddi bir azalma meydana gelmiş ve 510 mihrak tespit edilmiştir. 2016 yılında mihrak sayısı 221 olarak bildirilmiş ve 2017 yılında azalmaya devam ederek sadece 17 mihrak tespit edilmiştir (Saraç, 2017).

2.1.3. Lumpy Skin Disease Virusunun Özellikleri ve Sınıflandırma

Lumpy skin disease virusu, *Poxviridae* ailesinin *Chordopoxvirinae* alt ailesi içindeki *Capripoxvirus* cinsinde yer alır (Buller ve ark., 2005). Capripoxviruslar (CaPV), lumpy skin disease virusunu (LSDV), koyun çiçeği virusunu ve keçi çiçeği virusunu içerir. CaPV'ler serolojik olarak birbirinden ayırt edilemezler. Heterolog olarak çapraz korumayı uyarmasının yanında deneysel olarak çapraz enfeksiyona da yol açabilmektedir (Mercer ve ark., 2007).



Şekil 1: Veteriner önemi olan Poxvirusların sınıflandırılması (Markey ve ark., 2013)

Phenol (15 dakika % 2), eter (% 20), kloroform ve formalin (% 1) gibi yüksek derecede alkalın veya asit pH solüsyonlarına duyarlı olup, sodyum dodesil sülfat (% 10) ile inaktive edilebilir (Venter, 2014).

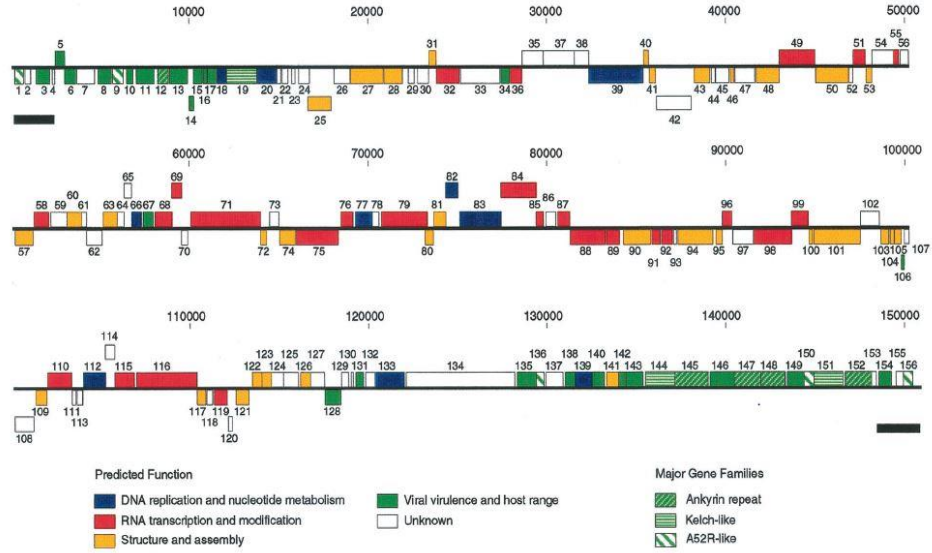
LSDV'nin sıcaklığa karşı duyarlılığı 55°C'de 2 saat, 65°C'de 30 dakikadır. Deri nodüllerinden izole edilen virus -80 ° C'de 10 yıl ve infekte doku kültürü sıvısı 4°C'de 6 ay saklanabilir. Alkalın ya da asidik pH'ya duyarlıdır. Beş gün boyunca 37°C'de pH 6,6-8,6'da tutulduğunda titrede önemli bir azalma olmamaktadır. Duyarlı olunan başlıca kimyasal ve dezenfektanlar eter (% 20), kloroform, formalin (% 1) ve bazı deterjanlar (sodyum dodesil sülfat gibi), phenol (15 dakika süreyle % 2), sodyum hipoklorit (% 2-3), iyot bileşikleri (1/33 sulandırma), Virkon® (% 2) ve quaterner amonyum bileşikleridir (% 0.5). Virus, güneş ışığına ve lipit solventleri içeren deterjanlara duyarlıdır. Ancak kontamine hayvan ahırları gibi karanlık çevresel koşullarında aylarca varlığını sürdürebilmektedir (Efsa, 2015).

2.1.4. Viral Yapı

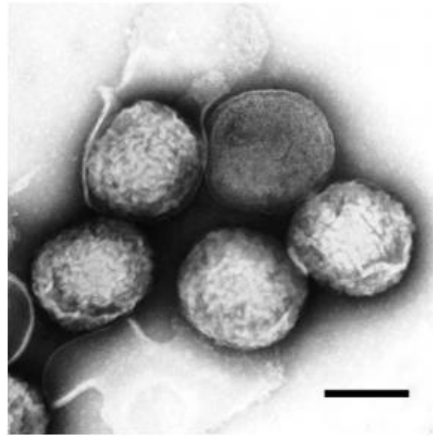
Virionlar yaklaşık 300 x 270 x 200 nm büyüklüğünde olup, tuğla benzeri yapıya sahiptir (Buller ve ark., 2005). CaPV'ler yaklaşık 150 kbp büyüklüğünde genom içerirler. DNA'lı nükleik aside sahip olup, linear yapı ve çift sarmallı yapıdadırlar. Restriksiyon fragment analizi ve sınırlı DNA sekansı verileri, CaPV'ler arasında yakın bir ilişki olduğunu desteklemektedir. Koyun çiçeği ve keçi çiçeği virusları en az 147 geni paylaşır (Tulman ve ark., 2002). Buna ek olarak LSDV'nin sığırları infekte etmesi kuvvetle muhtemel olan, Koyun çiçeği ve keçi çiçeği viruslarında fonksiyonu olmayan 9 adet gene sahiptir. LSDV genomu 156 tane open reading frame (ORF) bölgesi içerir (Tulman ve ark., 2001). CaPV izolatları, en az % 96 genom benzerlikleri ile son derece korunmuştur (Tulman ve ark.,2002).

Virion, yaklaşık 100 polipeptitten oluşan bir çekirdek, iki yanal gövde, bir membran ve bir zarftan meydana gelmiştir. Virusun, konak hücre ile etkileşimi açısından, membran ve zarf önemli yapısal unsurlardır. Hücre parçalanması olmaksızın hücreden salınan olgun virionlar zarflıdır. Zarf, hücresel lipit ve çeşitli virus spesifik polipeptitlerden oluşan iki katman içerir. Bu nedenle, konak hücrelerin parçalanmasıyla açığa çıkan olgun virionlarda zarf bulunmaz. Hem zarflı hem de zarfız virionlar infeksiyöz özelliktedir. Dış membran, çift tabakalı lipoprotein yapıda olup çekirdek ve yanal gövdeleri korumaktadır. Filament adı verilen düzensiz yapıda tubular proteinlere

sahiptir. Virusların çekirdekleri dambıl şeklinde olup, transkriptaz ve diğer birçok enzimi içermektedir (Maclachlan ve Dubovi, 2011).



Şekil 2: LSDV genomu lineer haritası (Tulman ve ark., 2001)



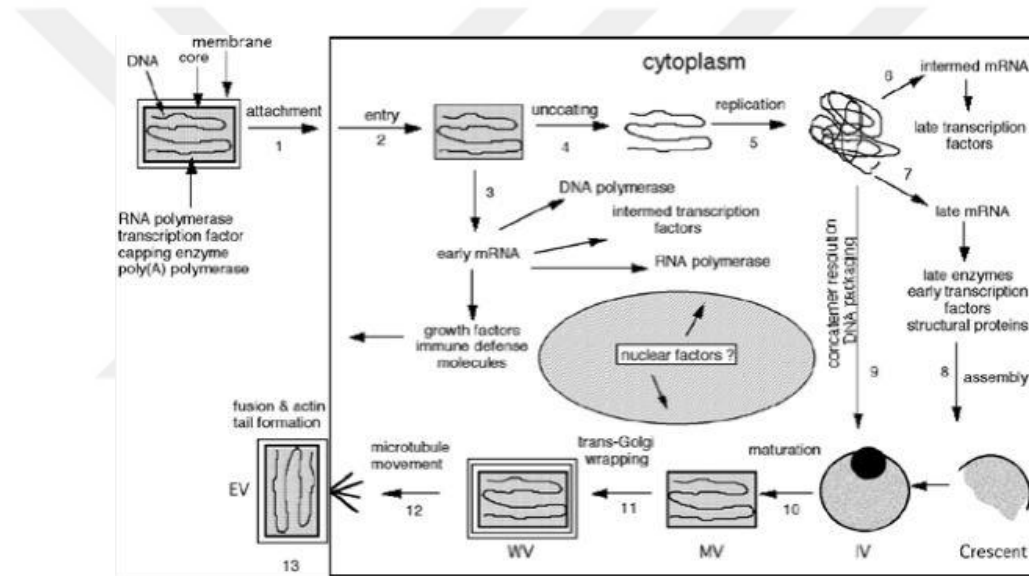
Şekil 3: Capripoxvirus elektron mikroskop negatif boyama görüntüsü (Babiuk ve Kitching, 2011)

2.1.5. Viral Replikasyon

Poxvirusların büyük bir çoğunluğunun replikasyonu sitoplazmada gerçekleşmektedir (Şekil 4). Hücre çekirdeğinden bu serbestliği elde etmek için diğer DNA'lı viruslardan farklı olarak poxviruslar çoğu virionun kendisinde taşıması gereken viral genomun transkripsiyonu ve replikasyonu için gerekli enzimleri kodlamak için evrimleşmiştir. Virus replikasyonu, hücre dışında zarflanmış olan virionun plazma

membranı ile füzyonundan sonra veya endositozdan sonra başlar ve virus çekirdeği daha sonra kaplanmamış olarak sitoplazmaya salınır.

Replikasyon ve virion yapısının oluşumu sitoplazma içinde (viroplazma veya virus fabrikaları olarak adlandırılır) ayrı alanlarda meydana gelir ve virionlar tomurcuklanma (zarflı virionlar), ekzositoz veya hücre lizisi (zarfsız virionlar) ile serbest bırakılır. Birçok virion zarfsızdır ve hücre lizisi ile açığa çıkarlar. Zarflı ve zarfsız virionlar infeksiyözdür fakat farklı yollarla hücreleri infekte etmektedir. Zarflı virionlar hücreler tarafından daha kolay içeri alınır ve hayvanların vücudunda daha kolay yayılmasında daha önemli gözükmektedir (Maclachlan ve Dubovi, 2011).



Şekil 4: Poxviruslara ait viral replikasyon döngüsü (Knipe ve Howley, 2007)

2.2. Epizootiyoloji

2.2.1. Bulaşma

LSD'nin ortaya çıkışı, sıcak ve nemli hava koşulları ve insekt miktarı ile yakından ilişkilidir (Woods, 1988). LSD virusunun, 1960 yılında Du Toit ve Weiss tarafından *Stomoxys calcitrans* ve *Biomyia fasciata* insektlerinden izole edildiği bildirilmiştir ve *Stomoxys* sinekleri ve *Aedes aegypti* sivrisinekleri ile mekanik bulaşma olduğu gösterilmiştir (Kitching ve Mellor, 1986; Chihota, 2001; Tuppurainen, 2011).

İnfekte ve duyarlı hayvanlar arasındaki direkt temas, hastalığın bulaşmasında etkisizdir (Davies, 1991b). LSDV, vektörleri olan insektler bulunmadığında, infekte hayvanlarla barındırılan sağlıklı hayvanlar arasında hastalığın bulaşmadığı veya

hastalığa karşı bağışıklık oluşmadığı tespit edilmiştir (Carn ve Kitching, 1995a). Deneysel olarak infekte olan hayvanlardan sadece % 50'sinde klinik belirtiler meydana gelmiştir (Tuppurainen ve ark., 2005; Bağla ve ark.,2006).

Günümüzde LSDV'nin en önemli bulaşma yolunun, kan ile beslenen vektörler aracılığı ile mekanik olarak iletilmesi olduğu düşünülmektedir (Kitching ve Mellor 1986; Chihota ve ark., 2001). Hastalık mihraklarının, özellikle insekt aktivitesinin arttığı yağmurlu mevsimlerde ve uzun akarsu yatakları boyunca daha çok görülmesi, hastalığın mekanik olarak taşınmasında ısırın sineklerin (*Stomoxys*, *Aedes*, ve *Culex*) sorumlu olduğunu düşündürmektedir. (Yeruham ve ark., 1995; Carn ve Kitching, 1995a). Kuru hava ve kış aylarında hastalık mihrakları bildirilse de soğuk hava dalgası gibi meteorolojik değişimler, insekt vektör popülasyonunu olumsuz olarak etkileyebilmekte ve LSDV'nin bulaşmasını azaltabilmektedir (Davies, 1991b). İnsektlerle yapılan bulaşma çalışmalarının sonuçları net değildir. Dişi *Aedes aegypti* ve *Stomoxys calcitrans*'in, LSDV'yi başarıyla taşıma kabiliyeti olduğu gösterilmiştir (Chihota ve ark.,2003) ve deneysel olarak infekte edilen ahır sinekleri (*Stomoxys spp.*), mekanik olarak koyunlar arasında CaPV'yi taşıyabilmektedir (Mellor ve ark., 1987). Bununla birlikte, diğer çalışmalarda sivrisinek (*Anopheles stephensi*), ahır sinekleri (*Stomoxys calcitrans*) ve ısırın tatarcıklar (*Culicoides nubeculosus*) kullanılarak infekte olanlardan duyarlı sığırlara LSDV bulaşması sağlanamamıştır (Chihota ve ark.,2003).

Bazı LSD mihraklarında hastalığa maruz kalan hayvanlarda, özellikle *Amblyomma spp.* gibi kene enfestasyonlarının görülmesi, virusun bulaşmasında kenelerin rolünü düşündürmektedir (Venter, 2014). Yapılan bir çalışmada, LSDV'nin bulaşmasında Ixodid kenelerinin potansiyel rolünü bildirilmiştir (Tuppurainen ve ark., 2011). LSDV'nin transovarial olarak bulaşmasında *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *decoloratus*, mekanik ve intrastadial bulaşmasında *Rhipicephalus appendiculatus*, mekanik/intrastadial ve transtadial bulaşmasında *Amblyomma hebraeum* kenelerinin rolü rapor edilmiştir (Tuppurainen ve ark., 2012; Lubinga ve ark., 2012).

Viral DNA'nın deri lezyonlarında 90 günden daha fazla sürede bulunabildiği Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase chain reaction-PCR) ile gösterilmiştir (Tuppurainen ve ark., 2005). Hastalığın sperma ile uzun süre yayılabileceği ve viral DNA'nın infeksiyondan sonra en az 5 ay boyunca bazı boğa spermalarında bulunduğu tespit edilmiştir (Irons ve ark., 2005). Ancak LSDV'nin bulaşmasında spermanın rolü

kesin değildir (Tuppurainen ve ark., 2005; Bagla ve ark., 2006). Bulaşma deneysel koşullarda gerçekleşmesine rağmen, bunun doğal olarak mı yoksa hastalık yayan boğaya özgü miktarda virus içeren sperma kullanıldığında mı gerçekleştiği henüz tespit edilmemiştir (Annandale ve ark., 2010).

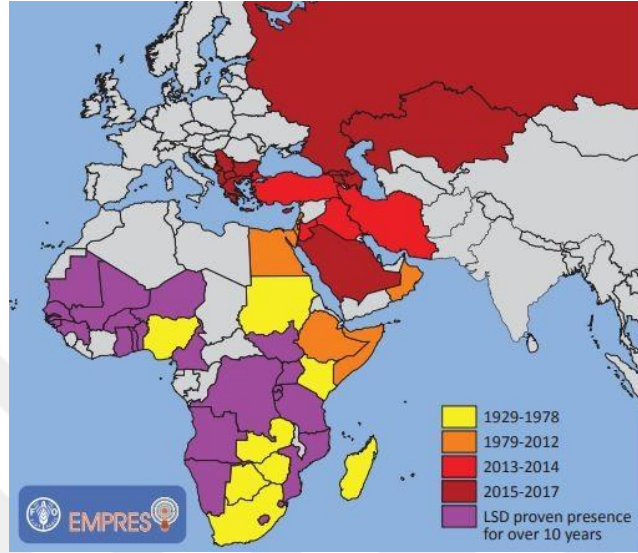
Küresel iklim değişikliğinin etkisi ve insektlerin vektör olarak LSDV'nin bulaşmasında rolü olduğuna dair bulgular, LSD'nin Orta Doğu ve Asya'da kalıcı olarak yerleşme riskinin yanısıra, hastalığın ilerleyerek diğer coğrafyalara da yayılacağını desteklemektedir (Venter, 2014).

2.2.2. Lumpy Skin Disease Coğrafi Dağılımı

Hastalık ilk olarak 1929 yılında Zambia'da görülmüş, 1943 yılı itibariyle Botsavana'ya yayılmıştır (OIE Terrestrial Manual, 2017). Hastalığın yayılımdan ve 1940'larda Güney Afrika'da büyükbaş hayvanlarda meydana getirdiği büyük ekonomik kayıplardan sonra, hastalık kuzeye yayılmaya devam etmiştir ve şu an Afrika'da Madagaskar'ında yer aldığı hemen hemen her yerde hastalık görülmektedir. Sadece Libya, Cezayir, Fas ve Tunus resmi olarak LSD'den aridir (Tuppurainen ve ark., 2018). 2012-2013 yılları arasında hastalık, İsrail'in kuzey yarısında yayılarak hem etçi hem de sütçü ırkları etkilemiştir (Ben-Gera ve ark., 2015). 2012 yılının sonunda LSD Lübnan'da 34 mihrakta rapor edilmiş ve bunu Ürdün ve Batı Şeria izlemiştir (Abutarbush ve ark., 2013). 2013-2015 yılları arasında LSDV Türkiye'ye yayılmış ve endemik hale gelmiştir (ProMED-mail, 2013). Ardından Irak'ta ve İran'ın batı sınırlarında hastalık bildirilmiştir (Efsa, 2015; Al-Salihi ve Hassan, 2015). 2014 yılında hastalığın şaşırtıcı bir şekilde Azerbaycan'da görülmesi, virusun uzun mesafeler boyunca yayılabildiğini göstermektedir (ProMED-mail, 2014). 2014 yılının sonunda Kuveyt ve 2015 yılının başında Suudi Arabistan hastalığı rapor etmişlerdir (ProMED-mail, 2015a; ProMED-mail 2015b). Ağustos 2015 yılında Yunanistan Meriç nehri ve Türkiye sınırına yakın bir bölgede ilk LSD vakasını bildirmiştir (ProMED-mail, 2015c). Aynı yılın eylül ayında ise Rusya'ya bağlı kuzey Kafkasya, Dağıstan ve Çeçenistan'da hastalık görülmüştür (ProMED-mail 2015d, ProMED-mail 2015e).

Hastalığın Avrupa'ya yayılışı ise Eylül 2013 yılında hastalığın Türkiye'ye girişi ile olmuş ve hastalık ülkede hızla yayılmıştır. 2015 Mayıs ayında Türkiye'nin batı bölgelerinde de hastalık bildirilmiştir. Ağustos 2015 yılında Yunanistan'da LSD'nin görülmesi ile beraber Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü'ne (OIE) rapor edilmiştir. Mayıs

2015'ten Ağustos 2016'ya kadar Türkiye'nin batı bölgesi ve Yunanistan, Bulgaristan, Makedonya, Sırbistan, Kosova ve Arnavutluk'u içeren 8 Balkan ülkesinde 1092 LSD mihrakı rapor edilmiştir (Mercier, 2017).



Şekil 5: LSD coğrafi dağılımı 1929-2017 (Tuppurainen ve ark., 2017)

2.2.3. Konak Duyarlılığı

Birkaç istisna dışında, CaPV'ler yüksek konakçı duyarlılığındadır. LSD, tüm yaş gruplarındaki sığırlarda klinik olarak hastalığa sebebiyet vermektedir. Afrika'da, ithal Bos taurus ırkları, yerli Bos indicus sığırlarından LSD'ye karşı daha duyarlıdır (Davies, 1991b). Bununla birlikte, aynı koşullar altında bir arada tutulan aynı ırktaki sığır gruplarında bile, klinik reaksiyonda subklinik infeksiyondan ölüme kadar uzanan büyük farklılıklar söz konusudur.

LSDV'ye karşı oluşmuş antikorlar, Suudi Arabistan'da Arabistan orinksinde (*Oryx leucoryx*), Mısır'daki Asya su bufalolarında (*Bubalis bubalis*), siyah Afrika antilobunda (*Connochaetes gnou*), mavi Afrika antilobunda (*Connochaetes taurinus*), boğa antilobunda (*Taurotragus oryx*), zürafada (*Giraffa camelopardalis*), impalada (*Aepyceros melampus*), iri ceylanda (*Tragelaphus strepsiceros*), kamyş antilobunda (*Redunca arundinum*), keseli ceylanda (*Antidorcas marsupialis*) ve su antilobunda tespit edilmiştir (Greth ve ark., 1992; Tulman ve ark., 2001). Zürafa ve

impalanın deneysel infeksiyonla LSD'ye oldukça duyarlı oldukları kanıtlanmıştır (Young, 1970).

2.3. Klinik Bulgular

LSDV, her yaştaki sığırlardada akut, subakut veya subklinik hastalığa neden olur (Carn ve Kitching, 1995b). Hem doğal hem de deneysel olarak infekte hayvanların klinik bulguları rapor edilmiştir (Irons ve ark., 2005; Annandale ve ark.,2010). Deneysel olarak virusa maruz bırakılan 2-4 hafta sonra infekte olmuş hayvanlarda bifazik bir ateşle yanıt gelişir ve hayvanlar, infeksiyon sonrası 4 ila 14 gün boyunca ateşli kalır (Carn ve Kitching, 1995b). Yapılan bir çalışmada deneysel olarak infekte olmuş hayvanlarda inkübasyon süresinin 4 ila 5 gün arasında olduğu ve vireminin, virus izolasyon çalışması ile infeksiyondan 1 ila 12 gün sonra, PCR ile infeksiyondan 4 ila 11 gün sonra olduğu belirlenmiştir (Tuppurainen ve ark., 2005). Viremi döneminin uzunluğu ise hastalığın klinik şiddeti ile ilişkili değildir. Deneysel olarak infekte edilen sığırlarda generalize lezyonların, infeksiyon sonrası 9-14. günlerde görüldüğü ve generalize lezyonların gelişiminin doz ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (Carn ve Kitching, 1995b).

Morbidite oranı, vektör varlığına ve konak duyarlılığına bağlı olarak geniş ölçüde (%3- 85) değişir ve ortalaması % 10'dur. 2006 yılında İsrail'de meydana gelen LSD salgınında, morbidite oranının %41,3'e kadar ulaştığı rapor edilmiştir (Osugwuh ve ark., 2007). Çoğu vakada mortalite oranı düşüktür (% 1-3) ancak bazı salgınlarda % 40 gibi yüksek oranlara ulaşmıştır (Coetzer, 2004).

Klinik olarak hastalık, 41°C' ye ulaşabilen ve 4-14 gün arasında süren bifazik ateş ile karakterizedir. Bu aşamadaki klinik belirtiler, hareket etmekte isteksizlik, iştahsızlık, tükrük salgısı, gözyaşı salgısında artış ve mukoid / mukopurulent karakterde burun akıntısı olabilmektedir. Gözyaşı akıntısını konjunktivitis ve bazı vakalarda korneal opasite ve körlük izleyebilir. Özellikle prescapular, precrural ve subparotid başta olmak üzere yüzeysel lenf nodları belirgin olarak büyümüştür (Davies 1991b; Carn ve Kitching, 1995b; Coetzer, 2004).

Deri nodülleri LSD'nin klasik klinik belirtisidir. Bu nodüller genellikle yaygındır ve genital bölge, meme başı, perineum, vulva, kulaklar, ekstremiteler ve baş ve boyun etrafındaki deride bulunabilir (Coetzer, 2004; Tuppurainen, ve ark.,2005). Deride ve mukoz membranlarda bulunan nodüller genellikle ateş başladıktan 2 gün

sonra gelişir. Bu nodüllerin çapı 1-7 cm arasında değişir ve nekrotik deri lezyonları dermis ve hipodermisten çevre dokulara doğru yayılabilir. Küçük nodüller kendiliğinden, herhangi bir sonuç olmadan iyileşebilirler veya ülserleşerek ayrılabilir. (Venter, 2014). Ülserleşen nodüller sinek ve sinek larvalarının enfestasyonuna açık hale gelir (Carn ve Kitching, 1995a; Efsa2015).

Nodüller, başlangıçta serum çıkışına sebep olsa da, epidermis ve dermise, subkutan dokulara ve bazen altında bulunan kaslara kadar nüfuz eden ters konik bir nekroz odakları oluşturular. Nekrotik odaklar yapışık olduğu deriden ayrılır ve sitfasts olarak adlandırılan odaklar meydana gelir (Şekil 6). Bu odaklarda sıklıkla sekonder bakteriyel enfeksiyonlar gelişir. Oluşan skar dokusu kalıcı hale gelerek derinin ekonomik olarak değerinin düşmesine sebep olur (Coetzer, 2004; Barnard ve ark., 1994; Abutarbush ve ark., 2013).



Şekil 6: LSD enfeksiyonu sonrası görülen nekroze odak



Şekil 7: Generalize enfeksiyon

Yüzeysel lenf nodları büyür ve ödematöz hale gelir. Bunun yanında etkilenen sığırlarda yem alımı azalırken, süt veriminde de belirgin düşme meydana gelir ve hayvanlarda zayıflama görülür. Tendonlarda meydana gelen inflamasyon ve nekroz ya da göğüs bölümünde ve bacaklarda meydana gelen ödem toplallığa neden olur. Sekonder bakteriyel infeksiyonlar, tendonlara, eklemlere, meme ucu ve meme bezlerine kalıcı zarar verebilir. Boğalarda genellikle geçici kısırılık görülür ancak bazen ciddi orşit yüzünden kalıcı hale gelebilir. Gebe ineklerde abortlara ve aylarca süren anöstruslara sebebiyet verebilir (Coetzer, 2004; Barnard ve ark., 1994). Az sayıda hayvanda ölüme yol açarken, büyük bir çoğunluğunda yavaş bir iyileşme söz konusudur.

2.4. İmmun yanıt

CaPV infeksiyonlarına karşı ağırlıklı olarak hücreyel immün yanıt gelişir ve etkili bir uyarım sağlanması için etkenin replike olması gerekir (Carn, 1993). Virus hücreden hücreye yayılım gösterdiğinden, dolaşımdaki antikorlar virusa ulaşamazlar. CaPV'ye karşı gelişen antikorlar, deney hayvanlarında virusün yayılmasını sınırlayabilir, ancak virusün infeksiyon bölgesinde çoğalmasını engellemez (Kitching ve Smale, 1986). Daha önce infekte olmuş ya da aşılanmış hayvanların bağışıklık durumu, serum nötralizan antikor seviyesi ile ilişkili değildir (Kitching ve ark., 1986). CaPV cinsindeki tüm viruslar, nötralize edici antikorlar için ortak antijeni paylaşmaktadır ve bu viruslardan biri ile infekte olup iyileşen hayvan kısmen diğer viruslara karşı da bağışıklık kazanır. CaPV'leri serum nötralizasyon testi (SNT), floresan antikor testi (FAT), indirekt floresan antikor testi (İFAT) veya agar jel immunodiffüzyonu (AGID) ile ayırmak mümkün değildir (Davies ve Otema, 1981; Kitching ve ark., 1986). Serolojik bulgular (Davies ve Otema, 1981), çapraz infeksiyon ve çapraz koruma deneyleri çalışmaları (Kitching ve Taylor, 1985) Capripoxvirus cinsindeki virusların immünolojik olarak çapraz reaksiyona girdiğini göstermektedir. Aşılanmış veya hafif hastalığa yakalanmış hayvanlar, düşük seviyede nötralize edici antikor geliştirir (Kitching ve Hammond, 1992).

Deneyisel olarak yapılan LSD infeksiyonunda, infekte olmuş sığırların yalnızca % 40-50'sinde generalize deri lezyonları gelişmiştir. Geri kalan hayvanlarda inokülasyon bölgesinde lokalize, sınırlı ve ağrılı şişlikler oluşmuş ya da ateş reaksiyonundan başka hiçbir klinik belirti göstermediği bildirilmiştir. (Efsa, 2015).

2.5. Patogenez ve Histopatolojik Bulgular

LSD'nin neden olduğu infeksiyonlarda vücudun büyük bir bölümünde deri lezyonlarının yanında klinik olarak ateş, belirgin ağırlık kaybı, salivasyonda artış, göz ve burun akıntısı, ventral ödem ve generalize lenfadenopati dikkati çeker. Hafif seyreden hastalıkta beden ısısı yükselmez ve az sayıda nodül oluşur. Deri lezyonları sert, sınırlı, üst yüzeyleri 0,5-5 cm çapında nodüllerdir. Bunlar birbiriyle birleşebilir. Nodüllerin kesit yüzü krem-gri renkte olur. Lezyon subkutise ve ara sıra kaslara kadar uzanır. Skrotum, perineum, meme, vulva, glans penis, göz kapakları ve konjunktivadaki nodüller çevresinde hiperemik bir kuşak bulunur. Daha sonra nodüllerin orta kısmı nekroza uğrar, ancak bazıları hızla ve tümüyle iyileşirken diğerleri induratif olur ve aylarca intradermal yumrular şeklinde kalır. Orta kısmı nekroza uğrayan nodüller hızla ölü doku parçası haline gelir. Nodüller çevresindeki epidermisin ayrılması sonucu granülasyon dokusu açığa çıkar. Nodülün seperasyonu dermise doğru sürerken, nodülün orta kısmında koni şekilli ve üst yüzü düz nekrotik haldedir. Ölü doku uzaklaştırıldığında, derin bir ülser kalır. Bu ülser yavaş bir şekilde granülasyon dokusuyla doldurulur. Nodülün nekrotik kısmında sekonder bakteriyel infeksiyon gelişir ve hastalığın ciddi bir durum almasına yol açar. Büyük krater benzeri ülserler gelişir ve lenfangitis ile lenfadenitise yol açar.

Üst solunum ve sindirim sistemi mukozlarında çok sayıda ülserli lezyon görülür. Solunum sistemindeki lezyonlar şiddetli solunum güçlüğüne ya da asfeksiye yol açacak şiddette mukoza şişkinliğine neden olabilir. Nodüllere zaman zaman böbrekler, akciğer ve testis gibi parenkim organlarında da rastlanır.

Her ne kadar virus perkutan yolla alınırsa da infeksiyon sistemiktir. Lökosit ilişkili viremi, virusu deri dahil olmak üzere birçok organa taşır. Virus çok çeşitli hücreleri infekte eder; bunlar arasında keratonisitler, müköz ve bez epitel hücreleri, fibrositler, iskelet kas hücreleri, makrofajlar, perisitler ve endotel hücreleri bulunur. Endotel hücrelerinin yıkımı vaskülitise yol açar ve bu lezyon LSD patogenezinde önemli bir role sahiptir.

Akut lezyonlar vaskülitis, lenfangitis, trombozis, zaman zaman dermis-epidermis ayrılmasına yol açan belirgin dermal ödem ve infarktüstür. Epidermiste poxvirus infeksiyonunun tipik bulgusu olan hidropik dejenerasyona rastlanır. Endotel hücreleri, perisitler, keratinositler, makrofajlar ve fibroblastlarda sitoplazmik, eozinofilik,

homojen, ara sıra granüler inklüzyon cisimcikleri gözlenir. Akut lezyonlarda dermiste görülen nötrofil, makrofaj ve eozinofillerin yerini giderek mononükleer hücreler yer alır. Lenf düğümleri ödemli ve hiperplastik olur (Hazıroğlu ve Milli, 2001).

2.6. Teşhis

2.6.1. Klinik ve Ayırıcı Teşhis

Hastalığın ön tanısı, LSD için yüksek karakteristik klinik belirtilere dayalı olarak yapılabilir. Ancak hafif veya asemptomatik olarak seyreden durumlarda tanı koymak zordur ve hızlı laboratuvar tanısına ihtiyaç duyulur.

Pseudo-Lumpy Skin Disease (BHV-2), böcek ısırığı, demodeks infeksiyonu, onkoserezi, besnoitioz ve dermatofiloz LSD'nin deri lezyonları ile karıştırılabilir (Barnard ve ark. 1994). Genellikle, BHV-2 infeksiyonu daha yüzeysel deri lezyonlarına neden olur, daha kısa bir seyir gösterir ve LSD'den daha hafif seyreden bir hastalıktır. Buna ek olarak LSD'de intrasitoplazmik inklüzyonlara karşın, BHV-2 infeksiyonunda histopatolojik olarak gösterebilen intranükleer inklüzyon cisimciklerinin varlığı karakteristikdir. LSD için kullanılan hızlı moleküler tanı araçlarının aksine, negatif olarak boyanmış biyopsi örneklerinde BHV-2'nin elektron mikroskobu ile veya virus izolasyonu ile tespiti ancak deri lezyonlarının gelişmesinden yaklaşık bir hafta sonra mümkündür (Coetzer,2004). Bazı vakalarda, mukozal lezyona neden olan Pestivirus infeksiyonları ve bovine malignant catarrhal fever gibi hastalıklar LSD ile karıştırılabilir (Barnard ve ark., 1994).

2.6.2. Laboratuvar Teşhisi

2.6.2.1. Viral Genom Tespiti

Virus tespiti açısından real-time PCR, diğer tanı yöntemlerine nazaran daha duyarlıdır. Test viral DNA'yı tespit eder ancak diğer 3 CaPV'nin endemik olduğu ve vahşi ruminantlarda LSD'nin tespit edildiği bölgelerde gerekli olan, diğer virusların ayırımını yapamaz. CaPV tespiti için konvansiyonel PCR'a göre real-time PCR yöntemi daha fazla hassasiyet göstermektedir ve test her bir reaksiyon için 10'dan az genom kopyasını tespit edebilmektedir (Efsa Panel Ahaw,2014). Validasyon uygulamasında ilişkili pox viruslarla çapraz reaksiyon görülmemeli ve diğer pox viruslar ve negatif örneklerde yanlış pozitifliklere rastlanılmamalıdır. Real-time PCR, niceliksel, basit, duyarlı ve spesifik bir yöntem olup CaPV'nin tespiti için hızlı, yüksek ve verimli bir

testtir. Günümüzde, real time PCR yöntemi, tanı laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. (Tuppurainen ve ark., 2005; Bowden ve ark., 2008; Stubbs ve ark., 2012; Efsa, 2015).

Koyun çiçek virusu, keçi çiçek virusu ve LSDV arasındaki farkları belirlemek için real time PCR yöntemleri geliştirilmiştir (Lamien ve ark., 2011a). Türe özgü PCR testi, floresan erime eğrisi analizinden sonra elde edilen CaPV'ler için erime noktasındaki sıcaklık farklarını tespit eder. Bu analiz 200 bp büyüklüğündeki GPCR genini hedef almaktadır ve şu an için validasyon aşamasındadır (Efsa, 2015).

Jel tabanlı PCR metodu valide edilerek OIE'nin LSD için olan el kitabında yayımlanmıştır. Yukarıda belirtildiği gibi, bu yöntem real time PCR kadar hızlı ve hassas değildir. Ancak real time PCR, sınırlı kaynaklara sahip laboratuvarlarda mevcut değilse jel tabanlı yöntem iyi bir seçimdir. Bununla birlikte, hem duyarlılık hem de özgüllük açısından diğer yöntemlerden daha üstündür (Efsa, 2015). Koyun çiçek ve keçi çiçek virusları arasında ayırım yapmak için jel-temelli PCR'ın (Lamien ve ark., 2011b) yanı sıra snapback primer kullanılan yeni bir yöntem (Gelaye ve ark., 2013) geliştirilmiştir.

Taşınabilir hızlı teşhis PCR yöntemi (Portable pen-side PCR) son zamanlarda geliştirilerek umut verici ön sonuçlar elde edilmiştir. Saha koşullarında kullanımı kolay olan bu yöntem ile, bir saat içinde sonuç elde edilmektedir (Efsa, 2015). Dondurularak kurutulmuş reagentler kullanılması nedeniyle saha şartlarında soğuk zincire ihtiyaç duyulmaz. Örnek toplanması kolay ve uygundur. Numune olarak EDTA'lı kan, deri lezyonları veya yara kabukları, tükrük, göz ve burun svapları bu yöntemde kullanılabilir (Bowden ve ark., 2008; Stubbs ve ark., 2012).

Loop-mediated izotermal amplifikasyon testi (LAMP) ile ilgili çalışmalar yayınlanmıştır ancak hızlı teşhis yöntemi olarak henüz hazır değildir (Das ve ark., 2012; Murray ve ark., 2013; Zhao ve ark., 2014). LAMP testi renk değişimlerine göre değerlendirilir ve sonuçların yorumlanması hatalı olabilmektedir. Testin yukarıda bahsedilen çalışmalardaki performansı, duyarlılık için %70 - 100 arasında ve özgüllük için % 92.3-100 arasında değişmektedir. LAMP testinin hızlı ekstraksiyon metodu olarak kullanılabilmesi için geliştirilmesi gerekmektedir (Efsa 2015).

Virus süşunu saptamak için ve filogenetik analizini yapmak için sekanslamada GPCR ve RPO30 gen dizilimleri kullanılmaktadır. Ancak sekanslama ekonomik bir

yöntem olmayıp pahalı ekipmanlar gerektirmektedir ve yüksek eğitimli personel gerektirir. Ancak hizmet alımı yapılması mümkündür.

Elektron mikroskopisinin duyarlılığı azdır ve esas olarak bir doğrulama yöntemi olarak kabul edilir. Pahalı ekipmanlara, uzmanlaşmış ve eğitilmiş laboratuvar personeline ihtiyaç duyulmaktadır, ancak sonuçlar bir gün içinde elde edilmektedir. CaPV, morfolojik olarak Orthopoxvirus'dan ayırt edilemez, ancak vaccinia virusu dışında koyunlarda ve keçilerde hiçbir Orthopoxvirus lezyona neden olmaz. Bununla birlikte, CaPV bovine papuller stomatitisine neden olan Parapoxvirus'dan ayırt edilebilir ve bu, LSD için ayırıcı tanılardan biridir (Efsa, 2015).

Virus izolasyonu ilk teşhis için uygun değildir, ancak virusun infektivitesini doğrulamak için gereklidir. Eğer doku kültür sistemleri mevcutsa, o zaman virus primer kuzu böbrek veya testis hücre kültürleri gibi çeşitli hücrelerde izole edilebilir. Bununla birlikte, CaPV'ler hücre kültürlerinde yavaş ürer ve virusu üretmek için birkaç pasaj gerekebilir. Deri numunesinden veya kabuklarından yapılan izolasyonda sıklıkla bakteriyel ve fungal kontaminasyonlarla karşılaşılır. Vero veya BHK21 gibi bazı hücre hatları da izolasyonda kullanılabilir, ancak bu hücreler daha az duyarlıdır. Piyasada bulunan bir kuzu testis hücre hattı (OA3.Ts), CaPV izolatlarının üremesinde kullanılmıştır. (Babiuk ve ark., 2007).

2.6.2.2. Antikor Tespiti

Serum/virus nötralizasyon testi seroloji için gold standart bir testtir. Spesifik bir metot olmasına rağmen klinik olarak hafif hasta ve aşılanmış hayvanlardaki düşük antikor titrelerinin saptanması için yeterince hassas değildir. Bunun yanında yoğun işgücü ve zaman gerektirdiğinden primer test ya da yüksek sayıda numune içeren testler için uygun bir metot değildir. Nötralizasyon testlerinin hassaslığı% 70 ila% 96 arasında değişirken, özgüllük %100'e ulaşabilmektedir (Sadri ve ark., 2002; Gari ve ark., 2008; Babiuk ve ark., 2009). Hücre temelli bir test olmasına rağmen standardizasyonu zor olup, duyarlılığı laboratuvarlar arasında farklılık gösterebilmektedir (Efsa,2015).

İndirekt Floresan Antikor Testi (İFAT) serosürveyansta LSDV'ye karşı oluşan antikor tespiti için bazı çalışmalarda kullanılmıştır (Gari ve ark., 2008). Ancak bu test diğer bazı poxvirusler ile çapraz reaksiyon gösterebilmektedir. Bununla birlikte, İFAT sonuçlarının yorumlanması, arka plan fuloresanı ve hücrelerin sitoplazmasında meydana gelen spesifik olmayan boyanma nedeniyle subjektiftir ve test sonuçlarının

yorumlanmasından önce testin dikkatlice standartlaştırılması gerekir. İFAT daha önce koyun ve keçi çiçeği teşhisi ve sığır ve koyunların bağışıklık durumunu değerlendirmek için epidemiyolojik araştırmalarda başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Kulshreshtha ve ark., 1991; Efsa 2015).

Agar Jel Immune Diffüzyon (AGİD) testi minimum laboratuvar imkanlarını gerektiren çok basit bir testtir. Ancak duyarlı bir test olmayıp ayırıcı tanılardan biri olan Parapoxvirus ile çapraz reaksiyona girebilir (Mangana-Vougiouka ve ark., 2000). Pozitif sonuçlar başka testler ile de teyit edilmelidir.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) literatürlere göre Koyun çiçeği ve keçi çiçeği viruslarının tespitinde duyarlılığı % 70-100 ve özgülüğü % 84-100 aralığındadır (Efsa, 2015). OIE El Kitabı, Diagnostik Testler ve Aşılar bölümünde tanımlanan P32 ELISA'nın performansı serosürveyansta kullanım şartlarını karşılamamıştır (Bhanot ve ark., 2009). Son zamanlarda rekombinant ELISA geliştirme çalışmaları devam etmekte ve ilk sonuçlara göre umut verici sonuçlar alındığı bildirilmektedir.

Western blot gerçekleştirilmesi zor bir test olup, saflaştırılmış antijenler gerektirir ve birincil bir test olarak kullanılamaz. Ancak sonuçsuz veya pozitif bulunan SNT ve ELISA testi sonuçlarının teyit edilmesi gerekiyorsa kullanılabilir (Efsa, 2015).

2.7. Koruma ve Kontrol

İthalat kısıtlamaları LSD'nin ülkelere girişini önlemeye yardımcı olabilmektedir. Hastalık esas olarak infekte olmuş hayvanlar aracılığıyla yeni bölgelere yayılır, ancak kontamine deri ve diğer ürünler yoluyla da bulaşabilmektedir. Bazı LSD salgınlarında infekte insektlerin hastalığı yeni alanlara taşıdığına dair şüpheler vardır. Salgınların eradikasyonunda sıkı karantina tedbirleri, infekte ve hastalığa maruz kalan hayvanların itlafi, karkasların uygun şekilde uzaklaştırılması, ahırların temizlenmesi ve dezenfeksiyonu ve insekt mücadelesi gereklidir. Aşılama İsrail'deki LSD salgınında olduğu gibi hastalığın eradikasyonunda önemlidir. İnsektisitler ve repellentler insekt mücadelesinde etkili olabilmektedir (Tuppurainen ve ark., 2005).

LSD ilk olarak tek bir yerden bir ülkeye ya da bölgeye girdiğinde, geniş ölçekli aşılama kampanyasının yapılması LSDV'nin yayılımının kontrolünde en etkili yoldur. Aşılama infekte işletmeler ile birlikte, koruma ve gözetim bölgeleri boyunca

yapılmalıdır. Aşılama alanı, % 100 aşılama oranını hedef alan LSD'den etkilenen tüm bölgeyi içermelidir. Kesimhaneler, canlı hayvan pazarları, sığır toplama ve dinlendirme yerleri, karkas imha ve rendering tesisleri çevresinde aşılama şarttır. Virusun hastaliksız bölgelere ve ülkelere yayılmasının önlenmesi öncelikli olmalıdır.

LSD ile mücadelede şu anda sadece canlı attenuue aşılar kullanılmaktadır ve bu aşuların hastalığın endemik olmadığı ülkelerde izine bağlı olarak kullanımına izin verilmelidir. LSDV'ye karşı kullanılan tüm aşılarda moleküler karakterizasyon zorunludur. Primer hücre kültürü kullanılarak üretilen şu anda mevcut olan aşuların saflığının doğrulanması da aynı derecede önemlidir. Kalite kontrolünü zorlaştıran bu durum, endojen ajan ve diğer kontaminatların neden olduğu sorunlara yol açabilmektedir. Küçük ruminantlardan elde edilen primer hücreler, şap, mavi dil, Rift Vadisi Humması, küçük ruminant vebası ve kuduz gibi hastalıkların görüldüğü bölgelerden köken aldığından, saflık testleri ve iyi üretim uygulamaları (GMP) LSD'ye karşı aşı üretiminde temel gerekliliktir. Şu anda LSDV'ye karşı kullanılan ruhsatlı DIVA aşısı yoktur (Tuppurainen ve Galon, 2016).

2.7.1. LSD ile Mücadelede Kullanılan Aşılar

En sık kullanılan canlı LSDV aşuları Güney Afrika LSDV Neethling suşu kullanılarak Güney Afrika'da üretilmektedir. Homolog LSDV içeren aşuların etkinliği, koyun çiçek aşısından daha etkilidir (Ben-Gera ve ark., 2015). Hiçbir aşı %100 koruma sağlamasa da, bu aşular ortalama %80-90 sürü aşılama oranına ulaşılır ve yıllık tekrar aşılama yapıldığında iyi koruma sağladığı bildirilmiştir (Kitching, 2003).

LSD, koyun çiçek ve keçi çiçek virusları çok benzer olup, %95'den fazla aynı genom seviyesindedir. Fakat hala filogenetik olarak çeşitli derecede çapraz korumayı bulunduran farklı türler vardır (Tulman ve ark., 2001; 2002). Koyun ve keçi çiçek aşuları sığırlarda kullanabilmesine rağmen, LSD'ye karşı güvenlik ve etkinliğinin kontrollü ortamda challenge çalışması ile gösterilmesi gerekir. Yugoslavya RM65 koyun çiçek suşu (koyun dozunun 10 katı) ve Romanya koyun çiçek suşu Orta Doğu'da, Bakırköy koyun çiçek suşu ise Türkiye'de sığırlara karşı kullanılmaktadır (Tuppurainen ve Galon, 2016).

2.7.2. Koyun-Keçi Çiçek Aşısının LSD ile Mücadelede Kullanılması

Koyun çiçek, keçi çiçek ve LSD virusu arasında antijenik yakınlık ve çapraz koruma bulunduğu için bu virusların herhangi birisi aşı suşu olarak LSD'ye karşı kullanılabilir (Kitching, 1983). Günümüzde sadece attenüe canlı aşılar, ticari olarak kullanılmaktadır. Şu an dünyada LSD virusuna veya diğer CaPV'lere (koyun çiçek, keçi çiçek) karşı birkaç aşı bulunmaktadır (Brenner ve ark., 2009; Tuppurainen ve Oura, 2012). Koruyucu aşı olarak 5 canlı attenüe Capripox virus suşu kullanılmaktadır. Bunlar Kenya koyun çiçek, Yugoslavya RM65, Romanya koyun Çiçek, Bakırköy koyun çiçek ve Güney Afrika LSD Neethling suşlarıdır (Tuppurainen ve Galon, 2016).

Kenya koyun ve çiçek virusunun 18 kez kuzu testis veya fetal kas hücrelerinde pasajlanmış hali, Yugoslav RM 65 koyun çiçek suşu, Romanya koyun çiçek suşu ve 60 kez kuzu böbrek ile 20 kez embriyolu tavuk yumurtası koryoallantoik membranında pasajlanmış Güney Afrika lumpy skin disease virusu LSD'nin kontrolünde spesifik olarak kullanılmaktadır. Aynı nötralizan bölgeye sahip koyun, keçi ve sığırlardan orijin almış olan bu dört Capripoxvirusdan biri ile aşılanan hayvanlar, diğer suşların neden olduğu hastalığa karşı da korunurlar. Kenya ve Güney Afrika suşları aşılı için tavsiye edilen saha dozu $DKID_{50} 10^{-3,5}$ olup, minimum koruyucu doz $DKID_{50} 10^{-2,0}$ 'dir. Romanya koyun çiçek aşısının sığırlar için tavsiye edilen dozu $10^{-2,5}$ koyun infeksiyöz doz (SID50)'dur. Yine Romanya koyun çiçek aşısının RM 65 adapte suşunun sığırlar için tavsiye edilen dozu $DKID_{50} 10^{-3}$ 'dür (OIE Terrestrial Manual, 2017). Ortak bir major nötralizasyon bölgesinde sahip olduklarından bu suşlar LSD'ye karşı aşılama için dünyanın çeşitli yerlerinde kullanılmaktadır (Brenner ve ark., 2009; OIE Terrestrial Manual, 2017).

Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, Viral Aşılar Üretim Laboratuvarında, 1975 yılında İstanbul ili, Bakırköy ilçesindeki bir olgudan izole edilerek, primer kuzu böbrek hücre kültüründe 65 pasaj gidilerek attenüe edilen aşı suşu, liyofilize aşı olarak üretilmekte olup, bir dozu en az $DKID_{50} 10^{-2,5}$ virus içerecek şekilde sahada hastalığın profilaksisi amacı ile yıllardır başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Üretim Protokolü, 2016). Capripoxvirusların antijenik yakınlığı nedeni ile çapraz koruma sağlama avantajı, koyun keçi çiçek suşlarının LSD için kullanımına olanak vermiş olup, OIE tarafından önerilmiş, yaygın bir şekilde kullanılmış ve kullanılmaya da devam etmektedir. Ülkemizde 2013 Eylül ayından beri

görülen LSD'ye karşı Bakırköy aşısı suşundan yapılan canlı attenüe Koyun-Keçi Çiçek aşısı kullanılmaktadır.

2013 yılında, sığırlarda LSD hastalığının ülkemizde görülmeye başlamasından sonra, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı komisyonunun aldığı karar ile aynı cins içerisinde bulunmasından ve antijenik yakınlığı dikkate alınarak Bakırköy koyun keçi çiçek suşundan hazırlanan koyun keçi çiçek aşısı (Penpox-M) OIE Manual' de ve yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi tek doz (en az $10^{-2,5}$ /doz DKİD₅₀) olarak sığırların LSD hastalığına karşı kullanılmaya başlanmıştır. 2015 yılı itibari ile LSD'ye karşı kullanımı 3 doza çıkarılmış ve 2018 yılı itibariyle 5 doz olarak belirlenmiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Hücre Kültürü

Aşı virusunun üretilmesi için gerekli olan MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) hücre hattı, Sigma Aldrich firmasından temin edildi (ECACC 90050801). Hücre kültürü çalışmalarında ticari olarak Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Biochrom DMEM Liquid Medium, kat. no: F0445), Fötal Bovine Serum (FBS-Biochrom, kat. no:S0115), L-glutamine (Wisent Bioproduct, kat. no:609-065EL) ve koruyucu antibiyotik olarak Penisilin G (Applichem, kat. no:A1837,0025), ve Streptomisin Sulfate (Applichem, kat. no:A1852,0025) kullanıldı.

Aşı Virusu: KKÇ aşı virusunun MDBK hücre hattına adaptasyonu için kuzu böbrek hücre kültüründe 60. pasajı yapılmış Bakırköy suşu (SP(BK)LK₆₀) Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Viral Aşılar Üretim Laboratuvarından temin edildi. Bakırköy suşu, 1975 yılında İstanbul İli, Bakırköy İlçesindeki koyun çiçek hastalığı belirtisi gösteren bir vakadan izole edilmiş ve primer kuzu böbrek hücre kültüründe 65 pasaj gidilerek attenüe edilerek, liyofilize aşı olarak üretilmektedir. Bir dozu en az DKİD₅₀ 10^{-2,5} virus içerecek şekilde sahada koyun-keçi çiçek hastalığı ve LSD'ye karşı profilaktik amaç ile kullanılmaktadır (Üretim Protokolü, 2016).

3.1.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar

Tripsin-EDTA Solüsyonu:

Ticari Tripsin-EDTA solüsyonu adherent hücrelerin yüzeyden kaldırılması aşamasında kullanıldı (Sigma-Aldrich, kat. no: T4049).

Phosphate Buffer Saline (PBS):

Hücre kültürü pasaj çalışmalarında kullanılan PBS üretim protokolüne uygun ve steril olarak hazırlandı.

Fötal Bovine Serum (FBS):

Ticari fötal bovine serumlar 56°C'de 30 dakika süreyle inaktive edilerek hücre kültürü vasatında kullanıldı.

Hücre Üretme Vasatı:

MDBK hücre kültüründe kullanılmak üzere Dulbecco's MEM (DMEM) vasatı % 10 FBS, % 1 L-Glutamine ve % 1 penisilin-streptomisin solüsyonu katılarak hazırlandı.

Virus Üretme Vasatı:

Aşı virusu üretiminde kullanılmak üzere DMEM vasatı % 2 FBS, % 1 L-Glutamine ve % 1 penisilin-streptomisin solüsyonu katılarak hazırlandı.

Hücre Dondurma Vasatı:

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere % 10 Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Applichem, kat. no: A3672,0250) içeren FBS kullanıldı.

Aşı Koruma Vasatı:

Üretilen aşının liyofilizasyon işleminde koruyucu amaçlı %5 laktalbumin hydrolysate (BD Difco kat. no:259962) ve % 10 sukroz (Merck kat. no:1.07651.1000) kullanıldı.

3.1.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemeler

Hücre kültürü ve aşı üretim çalışmalarında 25 cm² , 75 cm² , 175 cm²'lik filtrelili flasklar ve roller hücre kültürü şişeleri kullanıldı.

3.1.1.3. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Kimyasalların İçeriği

Tripsin-EDTA Solüsyonu:

Tripsin-EDTA solüsyonu % 0.25 yoğunlukta olup, içeriğinde 2,5 gram tripsin, 0,2 gram EDTA ve phenol red bulunmaktadır.

Phosphate Buffer Saline -PBS:

Hücre kültürü pasaj çalışmalarında kullanılan Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen PBS'in içeriği;

- | | |
|---|--------|
| • Sodyum Klorür (NaCl) (Sigma-Aldrich, kat. no: S5886) | 8.0 g |
| • Potasyum Klorür (KCl)(Sigma-Aldrich,kat. no: P5405) | 0.2 g |
| • Sodyum fosfat dibazik (Na ₂ HPO ₄) (Sigma-Aldrich,kat. no: S5136) | 2.37 g |
| • Potasyum fosfat monobazik (KH ₂ PO ₄) (Sigma-Aldrich,kat. no: P5655) | 0.2 g |

- Phenol red (C₁₉H₁₃NaO₅S) (Sigma-Aldrich, kat. no: P5530) 0.011 g
- Distile Su 1000 ml

Yukarıdaki maddeler eritilerek 1 litreye tamamlandı. Ph 7.2'ye ayarlandıktan sonra 0.2 µm por çaplı membran filtrelerden süzülerek 500 ml şişelere taksim edildi.

Dulbecco's MEM:

Ticari olarak kullanılan Dulbecco's MEM vasatının içeriğinde 6400 mg/lt NaCl, 400 mg/lt KCl, 200 mg/lt CaCl₂, 200 mg/lt MgSO₄.7H₂O, 124 mg/lt NaH₂PO₄, 4500 mg/lt D-Glucose, 0,1 mg/lt Fe(NO₃)₃.9H₂O, 110 mg/lt Na-pyruvate, 15 mg/lt Phenol red, 3700 mg/lt NaHCO₃, 84 mg/lt L-arginine-HCl, 48 mg/lt L-cystine, 42 mg/lt L-histidine-HCl-H₂O, 105 mg/lt L-isoleucine, 105 mg/lt L-leucine, 146 mg/lt L-lysine-HCl, 30 mg/lt L-methionine, 66 mg/lt L-phenylalanine, 95 mg/lt L-threonine, 16 mg/lt L-tryptophane, 72 mg/lt L-tyrosine, 94 mg/lt L-valine, 30 mg/lt Glycine, 42 mg/lt L-serine, 4 mg/lt Cholin chloride, 4 mg/lt Folic acid, 7,2 mg/lt Myo-inositol, 4 mg/lt Nicotinamide, 4 mg/lt D-Ca-pantothenate, 4 mg/lt Pyridoxal-HCl, 0,4 mg/lt Riboflavin, 4 mg/lt Thiamine-HCl bulunmaktadır.

Antibiyotik Solüsyonu:

Antibiyotik solüsyonu 500 ml distile suya 15.9 gr Penisilin G, 25 gr Streptomisin Sülfat ve 4.5 gr NaCl eklenerek hazırlandı. Hazırlanan solüsyon 0.2 µm'lik filtrelerden süzülere steril edildi ve -20°C'de stoklandı. Hazırlanan antibiyotik solüsyonunun içeriğinde 100 İ.Ü/ml Penisilin G, 100 µg/ml Streptomisin Sülfat ve 9 mg/ml NaCl bulunmaktadır.

L-glutamine:

Vasata eklenen L-glutamine solusyonu konsantrasyonu 200 mM/lt olup, 29,2 mg/ml L-glutamin içermektedir.

3.1.2. Kontrol Çalışmaları

3.1.2.1. Kontrol Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar

Yapılan hücre kültürü, virus üretimi, aşı bulk üretimi ve liyofilizasyon uygulamalarında olası kontaminasyonun saptanması ve identifikasyon çalışmaları amacıyla besiyerleri, PCR kimyasalları, kobay eritrositi ve hücre boyası kullanıldı.

Besiyerleri:

Bakteriyel ve fungal kontaminasyonların saptanması amacıyla; Tryptic Soya Broth (Difco kat. no: 211825), Thioglycollate Broth (Difco kat. no: 211260), Saboraud Dextroz Agar (Oxoid kat. N-no: CM41), Saboraud Dextroz Broth (Difco kat. no: 238230), PPLO Broth ve agar (Difco kat. no: 241210 ve 255420), Mac.conkey (Difco kat. no: 211387) agar ve %7 defibrine koyun kanlı agardan yararlanıldı.

Hematoksilen & Eozine Boya:

Olası bir virus üremesinde hücrede meydana gelen intrastoplazmik veya intranükleer inklüzyon cisimciklerinin tespiti amacıyla Hematoksilen & Eozine (H&E) boya (Bio-Optica, kat. no: 05-06002/L) kullanıldı.

Kobay Eritrositi:

Hücre kültürlerinin Parainfluenza 3 virusu ile olası kontaminasyonunun tespiti amacıyla kullanılan kobay eritrositi Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edildi.

Pozitif ve Negatif Kontrol Serumlar:

Nötralizasyon testinde kullanılan koyun çiçek hiperimmün serumu Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Koyun-Keçi Çiçek Ulusal Referans Teşhis Laboratuvarı'ndan temin edildi.

DNA Ekstraksiyon Kiti:

Viral DNA ekstraksiyonu için ticari kit kullanıldı (Qiagen,DNeasy Blood & Tissue Kit, kat.no:69506).

PCR Kimyasalları:

Üretilen aşının kontrol çalışmalarında ve deney hayvanlarındaki bağışıklık ve zararsızlık çalışmalarında viral nükleik asidi tespit etmek için kullanıldı LSD ve KKÇ aşısı viruslarının 89 bp uzunluğundaki P32 genini amplifiye etmek için real time PCR döngüsünde kullanılacak prob ve primerler tablo 1'de belirtildi (Bowden ve ark., 2008). Real time PCR analizi için pozitif kontrol olarak kullanılan koyun çiçek virus DNA'sı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Koyun-Keçi Çiçek Ulusal Referans Teşhis Laboratuvarı'ndan temin edildi.

Tablo 1: P32 genini amplifiye etmek için kullanılan prob ve primerler (Bowden ve ark., 2008)

Primer adı	Primer dizilimi (5'-3')
CaPV074F1	AAA-ACG-GTA-TAT-GGA-ATA-GAG-TTG-GAA
CaPV074R1	AAA-TGA-AAC-CAA-TGG-ATG-GGA-TA
CaPV074P1	6FAM-TGGCTCATAGATTTTCCT-MGBNFQ

Real Time PCR analizi için dNTP mix 10mM (ThermoFisher Scientific kat. no: R0192), MgCl₂ 25Mm (ThermoFisher Scientific, kat. no: R0971), 10X Taq Buffer (NH₄)₂SO₄ (ThermoFisher Scientific kat. no: B33), Taq DNA Polymerase 5U/μl (ThermoFisher Scientific kat. no: EP0402), nükleaz içermeyen su (Merck, kat. no: 9801-100) kullanıldı.

3.1.2.2. Kontrol Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler

Kontrol çalışmalarında 25 cm² , 75 cm² , 175 cm²'lik filtreli flasklar, 6 ve 96 kuyucuklu pleytler, lameller kullanıldı. Moleküler testlerde real time PCR analizi için BioRad CFX Connect cihazı kullanıldı.

3.1.3. Etkinlik ve Zararsızlık Çalışması

MDBK hücre kültüründe üretilen koyun keçi çiçek aşısının etkinlik ve zararsızlık çalışmaları için LSD hastalığına yönelik herhangi bir aşısıyla aşılınmamış, 6-9 aylık yaşta, 10 adet Simental ırkı, ithal, dişi sığır Uşak Agroplanet Hayvancılık Ltd. Şti' ye ait işletmeden temin edildi. MDBK hücre kültüründe üretilen aşı ile mevcut koyun keçi çiçek aşısının etkinliğini karşılaştırmak adına Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Viral Aşılar Üretim Laboratuvarı'ndan 2017/05 seri numaralı, Penpox-M ticari adlı koyun keçi çiçek aşısı temin edildi.

Challenge virusunun titrasyonunda kullanılan Oa3.Ts (kuzu testis hücresi) ve nötralizasyon testinde kullanılan Vero (Afrika Yeşil Maymun Böbrek Hücresi) hücre hatları Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Viral Aşılar Üretim Laboratuvarı'ndan temin edildi. Hücre kültürü vasatı olarak Oa3.Ts hücre hattı için Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Biochrom DMEM Liquid Medium, kat. no: F0445) ve Vero hücre hattı için Glasgow Minimum Essential Medium (Biochrom GMEM Liquid Medium, kat. no:F0525), Fötal Bovine Serum (FBS-Biochrom, kat. no:S0115), L-glutamine (Wisent Bioproduct, kat. no:609-065EL) ve koruyucu antibiyotik olarak Penisilin G

(Applichem, kat. no:A1837,0025), ve Streptomisin Sülfate (Applichem, kat. no:A1852,0025) kullanıldı.

Challenge sonrası yapılan nekropside alınan doku ve organ örnekleri bilyalı tüplere aktararak homojenizatör yardımı ile hazırlandı (Roche Magnalyzer).

Challenge Suşu: Aşı etkinlik çalışması için Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Koyun-Keçi Çiçek Ulusal Referans Teşhis Laboratuvarından temin edilen patojen PenLSD suşu kullanıldı. 2014 yılında LSD belirtileri gösteren sığırdan alınan deri numunesinin OA3.Ts hücre hattına inokulasyonu ile izole edilmiş ve aynı hücre hattında 3 pasaj gidilmiştir (LSD(P)Oa3.Ts₃).

Nötralizasyon Suşu: Serum nötralizasyon testinde kullanılmak üzere PenLSD suşunun Vero hücre hattındaki 10. pasajı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Koyun-Keçi Çiçek Ulusal Referans Teşhis Laboratuvarından temin edildi (LSD(P)Oa3.Ts P₃VerO₁₀).

3.1.3.1. Etkinlik ve Zararsızlık Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar

Tripsin-EDTA Solüsyonu:

Ticari Tripsin x EDTA solüsyonu adherent hücrelerin yüzeyden kaldırılması aşamasında kullanıldı. (Sigma-Aldrich, kat. no: T4049)

Phosphate Buffer Saline (PBS):

Hücre kültürü pasaj çalışmalarında kullanılan PBS üretim protokolüne uygun ve steril olarak hazırlandı.

Fötal Bovine Serum (FBS):

Ticari fötal bovine serumlar 56° C'de 30 dakika süreyle inaktive edilerek hücre kültürü vasatında kullanıldı.

Hücre Üretme Vasatı:

DMEM ve GMEM vasatlarına % 10 FBS, % 1 L-Glutamine ve % 1 penisilin-streptomisin solüsyonu katılarak hazırlandı.

Taşıma Vasatı:

Challenge sonrası deney hayvanlarında yapılan nekropsi sonrası alınan doku ve organ örneklerinin taşınması için DMEM vasatı kullanıldı. Vasata %0.5 FBS ve %1 oranında antibiyotik ilave edildi.

ELISA Kiti:

Aşılama öncesi ve aşılama sonrası deney hayvanlarındaki CaPV'lara karşı gelişen antikor tespiti için kullanıldı (IDvet ID Screen Capripox Double Antigen Kit, kat. no: CPVDA-5P).

ELISA kit içeriği:

- Capripoxvirusla kaplanmış pleyt
- Pozitif kontrol
- Negatif kontrol
- Sulandırma sıvısı 19
- 10x konjugat
- Sulandırma sıvısı 12
- Konsantre yıkama solüsyonu (20x)
- Substrat solüsyonu
- Durdurma solüsyonu

ELISA kit içeriğinde olmayan deiyonize su ve ELISA okuma cihazı (Kyto RT-6000 Micropalte Reader) testte kullanıldı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Aşı Üretim Çalışmaları

3.2.1.1. MDBK Hücre Kültürünün Hazırlanması

Kullanılacak vasat ve FBS 37°C'deki su banyosunda ısıtıldı. Azot tankında muhafaza edilen cryovial içerisinde bulunan MDBK hücre kültürü 37°C'deki su banyosunda hızlıca (2-5 dakika) çözdürülerek tamamı santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1000-1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpteki üst sıvı atıldı ve dibe çöken hücreler %10 FBS'lu DMEM vasatı ile sulandırılarak 75 cm²'lik flaska 25 ml olarak kondu. Flasklar 37°C'de ve %5 CO₂'li ortamda monolayer hücre kültürü oluşması için inkübasyona bırakıldı ve her gün hücrelerin üremeleri yönünden kontrolleri yapıldı.

Hücre kültürlerinin uzun süreli ve özelliklerini değiştirmeksizin saklanabilmeleri için, hücreler dondurularak saklandı. Bu amaçla monolayer olarak üretilen MDBK

hücreleri 3 kez PBS ile yıkandı ve tripsinize edildi. Santrifüj tüplerinde toplanan hücreler 800–1000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Tripsin içeren üst sıvı atıldı ve dipteki hücre tortusu % 10 DMSO ve % 90 FBS ilavesi ile sulandırıldı. 2-4 saat süreyle +2/+8°C’de, 2-4 saat -20°C’de, 1 gece -70°C’de bırakıldıktan sonra -196°C’deki sıvı azot tankına yerleştirildi (Üretim Protokolü, 2016).

3.2.1.2. MDBK Hücre Kültürünün Kontaminantlar Yönünden Kontrolü

Bakteriyel Ve Fungal Kontaminantlar Yönünden Kontrolü:

Hücre kültürlerinin yüzeyi 37°C’ye ayarlanmış PBS ile üç kez yıkandıktan sonra hücreler % 0,25’lik tripsin ile 30 saniye tripsinize edildi. Flasktaki tripsin döküldü ve 37°C’de hücreler flask yüzeyinden kalkıncaya kadar bekletildi. Yüzeyden kalkan hücreler 10 ml PBS ile toplanarak steril bir tüpe aktarıldı. Elde edilen hücre süspansiyonundan 0,1’er ml. olacak şekilde 2’şer adet 10 ml’lik tüplerde hazırlanan PPLO broth, Thioglukolate broth, Saboraud dextroz broth, Triptose soya brothlara ekim yapıldı. PPLO broth, Thioglukolate broth, Triptose soya broth 37°C’de, Saboraud dextroz broth ise hem 37°C’de hem de oda ısısında 15 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. 7. ve 15. günlerde sıvı besi yerlerinden Saboraud dextroz agar, Mac. conkey, PPLO ve %7 koyun kanlı agarlara 0,1’er ml miktarlarda pasajları yapıldı. Katı besi yerlerinin bakteriyel üremeler yönünden her gün kontrolleri yapıldı (Üretim Protokolü, 2016).

Viral Kontaminantlar Yönünden Kontrolü:

Hücre kültürünün Parainfluenza3 (PI₃), Pestivirus ve diğer viral kontaminantlar yönünden kontrolleri Hematoksilen & Eozin boyama, haemadsorbsiyon ve PCR testleri ile yapıldı (Üretim Protokolü, 2016).

3.2.1.3. MDBK Hücre Kültürüne Aşı Virusunun Adapte Edilmesi

75 cm²’lik flasklarda monolayer MDBK hücre kültürleri üretildi. Monolayer oluşturmuş hücrelerin besiyeri dökülerek hücre yüzeyleri PBS ile 3 kez yıkandı. 2 adet flaska SP(BK)LK₆₀ koyun çiçek virusu süşunun DKİD₅₀/ml 10^{-4.0} sulandırmasından 1 ml inokule edildi. Bir adet flaska kontrol hücre olarak virus ekilmedi ve flasklar virusun hücrelere absorpsiyonu için 37°C’lik etüve bırakıldı. Bir saat sonra inokulum bir pipetle alındı ve her flaska %2 FBS’li DMEM vasatı kondu. Hücreler her gün doku kültür mikroskopunda kontrol edildi. %80-90 sitopatik etki (CPE) görüldüğü zaman (4-8 gün içinde) şişeler-20°C’deki derin dondurucuya kaldırıldı.

Koyun keçi çiçek aşısı virusunun (SP(BK)LK₆₀) MDBK hücre kültüründe 2 kez pasajı yapıldı. MDBK hücre kültüründe seri pasajları yapılan koyun keçi çiçek aşısı virusunun SP(BK)LK₆₀-MDBK₃ pasajı ana tohum suşu ve SP(BK)LK₆₀-MDBK₄ pasajı çalışma tohum suşu olarak isimlendirilerek stoklandı.

3.2.1.4. MDBK Hücre Kültürüne Adapte Olan Aşısı Virusunun İdentifikasyonu

Virus Titrasyon Testi:

DKİD₅₀/ml değerinin saptanması ve identifikasyon amacıyla virus titrasyon testi uygulandı. Koyun çiçek aşısı virusunun PBS ile 10 katlı dilasyonları yapıldı. Her dilasyondan 96 gözlü pleytin dört gözüne 100'er µl konuldu. Bütün dilasyonların üzerine 100'er µl MDBK hücre kültürü ($3-5 \times 10^5$ hücre/ml) eklendi. Hücre kontrolü amacıyla pleytin son dört gözüne 100'er µl vasat ve 100'er µl hücre süspansiyonu eklendi. Pleytin 37°C'de %5 CO₂'li ortamda her gün kontrolleri yapılarak 10 gün süreyle inkube edildi. Virusun üremesine bağlı CPE oluşumları gözlemlendi. Üretilen virus suşlarının DKİD₅₀ değerleri Spearman-Kärber metoduna göre saptandı (Üretim Protokolü, 2016).

Nötralizasyon Testi:

1ml SP(BK)LK₆₀-MDBK₅ aşısı virusu ile 1 ml SP hiperimmün serumu eşit oranda karıştırıldı ve 37°C'de 1 saat süreyle inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda karışımdan 25cm²'lik flaskta üretilen MDBK hücre kültürüne 0,1 ml inokule edilerek 10 gün süreyle takip edildi (Üretim Protokolü, 2016).

Hematoksilen & Eozin Boyama (H&E) :

Altı gözlü pleytlerin içine steril edilmiş her göze birer adet olmak üzere 6 adet lamel konuldu. Lamellerin üzerine %10 FBS içeren DMEM vasatlı hücre süspansiyonundan 3 ml ($3-5 \times 10^5$ hücre/ml) eklendi. 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 1 gün süreyle bekletildi. Monolayer oluşturmuş hücrelerin üzerine ertesi gün vasat uzaklaştırılarak 0,1ml SP(BK)LK₆₀MDBK₅ aşısı virusundan ekim yapıldı. 1 saatlik inkubasyonun ardından hücrelerin yüzeyi üç kez PBS ile yıkandı ve %2 FBS içeren DMEM eklendi. CPE oluşumlarının ardından lameller pleytlerden alınarak kurutuldu ve aseton ile +4/+8°C'de 10 dakika fikse edildi. Hücrelere H&E boyama yapılarak hücrede oluşacak intrastoplazmik veya intranükleer inklüzyon cisimcikleri araştırıldı (Üretim Protokolü, 2016).

Real-Time PCR:

SP(BK)LK₆₀-MDBK₅ aşısı virusunun 200 µl'si DNA ekstraksiyonu için kullanıldı. Pozitif kontrol olarak referans koyun keçi çiçek aşısı virusu DNA'sı kullanılarak kitin protokolüne göre DNA ekstraksiyonu yapıldı. Capripoxvirusların 89 bp uzunluğundaki P32 genini amplifiye etmek için master mix tablo 2'de ve sıcaklık-zaman döngüleri tablo 3'de belirtilen şekilde yapıldı (Bowden ve ark., 2008).

Tablo 2: Capripoxvirus real time PCR master mix içeriği

1 Örnek	Miktar (µl)
10 x PCR buffer (NH ₄) ₂ SO ₄ , MgCl ₂ içermeyen	2
MgCl ₂ (25 mM)	1,2
dNTPs (10 mM)	0,4
CaPV074F1 (20 pmol)	0,5
CaPV074R1 (20 pmol)	0,5
CaPV074P1 (10 pmol)	0,6
DNA Taq polimeraz (5u/µl)	0,2
Nükleaz içermeyen su	12,6
Örnek DNA miktarı	2
TOPLAM:	20 µl

Tablo 3: Capripoxvirus real time PCR sıcaklık-zaman döngüsü

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94	2 dk	1
PCR Amplifikasyonu (Toplam 40 döngü)			
Denatürasyon	94	50 sn	40
Bağlanma	50	50 sn	
Uzama	72	1 dk	
Son Uzama	72	10 dk	1

3.2.1.5. Adapte Olan Aşı Virusunun Üreme Özelliklerinin İncelenmesi

Aşı virusunun MDBK hücre kültüründe üreme özellikleri, üretim sürecinde yapılacak uygulamaların belirlenmesi açısından incelendi.

Günlük Virus Titresinin Belirlenmesi:

8 adet flaskta, %90 oranında monolayer olarak kaplamış MDBK hücre kültürleri hazırlandı. Her bir flaska 1/10 oranında sulandırılan SP(BK)LK₆₀MDBK₅ aşı virusundan 0,1ml inokule edildi. Flasklar, 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkubasyona bırakıldı. İnkubasyonun 2. gününden başlayarak, 9. gününe kadar her gün 1 adet flask etüvden çıkarıldı. Her bir flask 3 kez -20°C'de dondurulup, 37°C'de çözündürüldü. Elde edilen virus süspansiyonları 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek üst sıvıları -20°C'de saklandı. Bu işlem 9 gün boyunca her bir flaska uygulandı. Elde edilen virus süspansiyonlarının günlük üreme titreleri Spearman-Kaerber metodu ile hesaplandı (Gülyaz, 2003).

Vasata Geçen Virus Titresinin Belirlenmesi:

8 adet flaskta, %90 oranında monolayer olarak kaplamış MDBK hücre kültürleri hazırlandı. Her bir flaska 1/10 oranında sulandırılan SP(BK)LK₆₀MDBK₅ aşı virusundan 0,1ml inokule edildi. Flasklar, 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkubasyona bırakıldı. İnkubasyonun 2. gününden başlayarak, 9. gününe kadar her gün 1 adet flask etüvden çıkarılarak üst sıvıları steril tüplere aktarıldı. Vasata geçen virus miktarları günlük olarak Spearman-Kaerber metodu ile hesaplandı (Gülyaz, 2003).

Tekrarlanan Dondurma ve Çözdürmenin Virus Titresine Etkisi:

1/10 oranında sulandırılan SP(BK)LK₆₀MDBK₅ aşı virusu 0,1'er ml 5 adet flasktaki MDBK hücre kültürüne inokule edildi. 1 adet flask kontrol olarak ayrıldı. Flasklar, 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 7 gün boyunca inkubasyona bırakıldı. İnkubasyonun sonunda 1'den 5'e kadar numaralandırılan flasklar -20°C'ye kaldırıldı. Numaralar doğrultusunda flasklar 1,2,3,4 ve 5'er kez dondurulup çözündürüldü. Her dondurma ve çözdürme aşamasında 0,5ml örnek alındı ve mikrotitrasyon testi yapılarak virus titresini Spearman-Kaerber metodu ile hesaplandı (Gülyaz, 2003).

3.2.1.6. Aşı Virusunun Üretimi

Azot tankında muhafaza edilen MDBK hücre kültürü 37°C'deki su banyosunda süratle (2-5 dakika) çözündürülerek tamamı santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1000-1200

rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpteki üst sıvı atıldı ve dipte çöken hücreler %10 FBS içeren DMEM vasatı ile sulandırılarak 75 cm²'lik flaska 25 ml kondu. Flasklar 37°C'de ve %5 CO₂'li ortamda monolayer hücre kültürü oluşması için inkübasyona bırakılarak her gün hücrelerin üremeleri yönünden kontrolleri yapıldı. Kaplayan hücreler 175cm²'lik flaska, en son aşamada 2 litre hacimli roller hücre kültürü şişelerine pasajlanarak monolayer hücre kültürleri hazırlandı.

Roller hücre kültürü şişelerinde monolayer olarak üretilen MDBK hücre kültürlerine SP(BK)LK₆₀MDBK₄ aşısı virusundan 10'ar ml (DKİD₅₀ 10^{4.0}/ml) ekimleri yapıldı ve 37°C'de 1 saat virusun adsorbsiyonu için inkube edildi. 1 saatlik süre sonunda hücrelerin yüzeyi 3 kez PBS ile yıkandı ve şişelere %2 FBS içeren DMEM vasatı eklenerek hücre kültürleri 37°C'de inkübasyona kaldırıldı. Hücreler her gün inverted mikroskopta kontrol edildi. Hücrelerde %80-90 sitopatik etki (CPE) görüldüğünde (4-8 gün içinde) şişeler toplandı ve kontrol için örnek alınarak -20°C'deki derin dondurucuya kaldırıldı (Üretim Protokolü, 2016).

3.2.1.7. Üretilen Aşısı Virusunun Kontrol Testleri

Aşısı Virusunun Titresinin Belirlenmesi:

DKİD₅₀/ml değerinin belirlenmesi amacıyla mikrovirus titrasyon testi uygulandı. Aşısı virusunun PBS ile 10 katlı dilüsyonları yapıldı. Her dilüsyondan 96 gözlü pleytin dört gözüne 100'er µl konuldu. Bütün dilüsyonların üzerine 100'er µl MDBK hücre kültürü (3-5 x10⁵ hücre/ml) eklendi. Hücre kontrolü amacıyla pleytin son dört gözüne 100'er µl vasat ve 100'er µl hücre süspansiyonu eklendi. Pleytin 37°C'de %5 CO₂'li ortamda her gün kontrolleri yapılarak 10 gün süreyle inkube edildi. Virusun üremesine bağlı CPE oluşumları gözlemlendi. Üretilen virus suşlarının DKİD₅₀ değerleri Spearman-Kaerber metoduna göre hesaplandı.

Bakteriyel, Fungal ve Viral Kontaminantlar Yönünden Kontrol:

Elde edilen aşısı virusu süspansiyonundan 0,1'er ml olacak şekilde 2'şer adet 10 ml'lik tüplerde hazırlanan PPLO broth, Thioglukolate broth, Saboraud dextroz broth, Triptose soya brotlara ekim yapıldı. PPLO broth, Thioglukolate broth, Triptose soya broth 37°C'de, Saboraud dextroz broth ise hem 37°C'de hem de oda ısısında 15 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. 7. ve 15. günlerde sıvı besi yerlerinden Saboraud dextroz agar, Mac. conkey, PPLO ve %7 koyun kanlı agarlara 0,1'er ml miktarlarda pasajları

yapıldı. Katı besi yerlerinin bakteriyel üremeler yönünden her gün kontrolleri yapıldı. Pestivirus yönünden kontrol PCR testi ile yapıldı (Üretim Protokolü, 2016).

3.2.1.8. Liyofilizasyon ve Paketleme

Derin dondurucuda muhafaza edilen virus süspansiyonu içeren şişeler, 37°C'lik su banyosunda çözdürüldü ve donduruldu. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek üstteki sıvı aşı olarak kullanılmak üzere toplandı. Taze olarak hazırlanmış ve içerisinde laktalbumin hydrolysate ve sukroz bulunan koruyucu vasat ile toplanan aşı virusu eşit miktarda karıştırıldı. Bu karışımdan 5 ml'lik aşı şişelerine 1'er ml dolduruldu ve liyofilize edildi (Üretim Protokolü, 2016).

3.2.1.9. Liyofilizasyon Sonrası Kontrol

Liyofilize edilmiş aşı şişelerinden örnekler alınarak aşı titresi ve kontaminantlar yönünden kontrolleri yapıldı.

Bakteriyel, Fungal ve Viral Kontaminantlar Yönünden Kontrol:

Rastgele seçilen 15 adet vial 1'er ml steril PBS ile sulandırılarak tek bir şişede toplandı. Toplanan sulandırılmış aşidan 0,1'er ml olacak şekilde 2'şer adet 10 ml'lik tüplerde hazırlanan PPLO broth, Thioglukolate broth, Saboraud dextroz broth, Triptose soya brothlara ekim yapıldı. PPLO broth, Thioglukolate broth, Triptose soya broth 37°C'de, Saboraud dextroz broth ise hem 37°C'de hem de oda ısında 15 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. 7. ve 15. günlerde sıvı besi yerlerinden Saboraud dextroz agar, Mac. conkey, PPLO ve %7 koyun kanlı agarlara 0,1'er ml miktarlarda pasajları yapıldı. Katı besi yerlerinin bakteriyel üremeler yönünden her gün kontrolleri yapıldı. Pestivirus yönünden kontrol PCR testi ile yapıldı (Üretim Protokolü, 2016).

Liyofilize Aşının Titresinin Belirlenmesi:

5 adet aşı şişesi rastgele seçilerek 1'er ml steril sulandırma sıvısı ile sulandırıldı ve tek bir şişede toplandı. DKID₅₀/ml değerinin belirlenmesi amacıyla mikrovirus titrasyon testi uygulandı. Sulandırılmış aşının PBS ile 10 katlı sulandırmaları yapıldı. Her sulandırmadan 96 gözlü pleytin dört gözüne 100'er µl konuldu. Bütün sulandırmaların üzerine 100'er µl MDBK hücre kültürü (3-5 x10⁵ hücre/ml) eklendi. Hücre kontrolü amacıyla pleytin son dört gözüne 100'er µl vasat ve 100'er µl hücre süspansiyonu eklendi. Pleytin 37°C'de %5 CO₂'li ortamda her gün kontrolleri yapılarak

10 gün süreyle inkube edildi. Virusun üremesine bağlı CPE oluşumları gözlemlendi. Üretilen virus suşlarının DKİD₅₀ değerleri Spearman-Kaerber metoduna göre hesaplandı. Liyofilizasyon sonrası mililitrede log 0,5 düşüş normal kabul edildi (Üretim Protokolü, 2016).

3.2.2. Bağışıklık Çalışmaları

3.2.2.1. Çalışma Öncesi Kontrol Testleri

Deney Hayvanlarının Kontrolü:

Deney hayvanlarının kanları çalışma başlamadan önce, EDTA'lı ve EDTA'sız kan tüplerine alındı. Deney hayvanlarının real time PCR testi ile LSDV yönünden ve olası Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) enfeksiyonunun, immunsupresyon meydana getireceği ve aşının oluşturacağı bağışıklığı etkileyeceğinden dolayı PCR testi ile BVDV yönünden kontrolleri yapıldı (OIE Terrestrial Manual, 2017). Aşılardan önce LSDV antikoru yönünden SNT ve ELISA testleri yapıldı.

Serum nötralizasyon testi için 96 kuyucuklu pleytlerin bütün kuyucuklarına 50'şer µl GMEM vasatı konuldu. Kan serumu örneğinden 50'şer µl alındı ve pleytin ilk iki kuyucuğuna konuldu. İlk kuyucuklardan 50 µl alınarak alt kuyucuklara aktarıldı ve serumun iki katlı sulandırılması yapıldı. Kuyucuklarda iki katlı sulandırılması yapılan serum örneklerinin üzerlerine 50'şer µl 100 DKİD₅₀ titrede standart PenLSD suşu eklenerek 37°C'de bir saat nötralizasyona bırakıldı. Süre sonunda bütün kuyucuklara 50'şer µl Vero hücre kültürü eklenerek 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 10 gün inkube edildi. Her gün hücreler CPE oluşumları yönünden kontrolleri yapıldı (Chaudhary ve ark.,2009).

ELISA için kit prosedürü uygulandı. Teste başlamadan önce testte kullanılacak tüm kimyasallar oda sıcaklığına getirildi ve vorteks yardımı ile karıştırıldı. Distile su ile 20X konsantrasyondaki yıkama solüsyonu, 1X konsantrasyonuna getirilerek sulandırıldı. 10X konsantrasyondaki konjugat, sulandırma sıvısı 12 ile 1X konsantrasyonda olacak şekilde sulandırıldı. Aşağıdaki belirtilen sıralama ile kit prosedürü uygulandı.

1. Her kuyucuğa sulandırma sıvısı 19'dan 50 µl konuldu.
2. A1 ve B1 kuyucuklarına 50 µl negatif kontrol konuldu.
3. C1 ve D1 kuyucuklarına 50 µl pozitif kontrol konuldu.
4. Diğer kuyucuklara serum örneklerinden 50 µl konuldu.
5. Pleyt kaplanarak 90 dk. 21°C'de inkubasyona bırakıldı.
6. İnkubasyona sonunda kuyucuklardaki sıvı döküldü ve 300 µl yıkama sıvısı ile 5 kez yıkandı.
7. Her bir kuyucuğa 100 µl konjugattan eklendi.
8. Pleyt tekrar kaplandı ve 30dk 21°C'de inkubasyona bırakıldı.
9. İnkubasyona ardından kuyucuklardaki sıvı döküldü ve 300 µl yıkama sıvısı ile 5 kez yıkandı.
10. Her bir kuyucuğa 100 µl substrat solüsyonu konuldu.
11. Pleyt kaplandı ve 15dk 21°C'de inkubasyona bırakıldı.
12. İnkubasyona sonunda reaksiyonu durdurmak için 100 µl durdurma solüsyonu eklendi.
13. ELISA okuyucusu ile pleyt 450 nm'de okundu.

Testin doğruluğu, pozitif kontrol OD değeri 0.350 nm'den büyük olması ile ve pozitif kontrol OD değerinin, negatif kontrol OD değerine oranının 3'ten büyük olması ile belirlendi. Her bir örnek için okunan OD değerleri aşağıda belirtilen formül ile hesaplandı ve tablo 4'e göre değerlendirildi.

$$S/P \% = \frac{OD \text{ Örnek} - OD \text{ Negatif Kontrol}}{OD \text{ Pozitif Kontrol} - OD \text{ Negatif Kontrol}} \times 100$$

Tablo 4: Capripoxvirus ELISA sonuç değerlendirme

Sonuç	Değerlendirme
S/P % < 30 %	Negatif
S/P % \geq 30 %	Pozitif

Patojen LSD Virusunun Kontrolü:

Challenge çalışmasında kullanılacak olan patojen PenLSD suşunun çalışma öncesi kontaminantlar yönünden kontrolleri yapıldı ve titresi belirlendi.

Bakteriyel, fungal ve viral kontaminantlar yönünden kontrol için virus süspansiyonundan 0,1'er ml olacak şekilde 2'şer adet 10 ml'lik tüplerde hazırlanan PPLO broth, Thioglukolate broth, Saboraud dextroz broth, Triptose soya brothlara ekim yapıldı. PPLO broth, Thioglukolate broth, Triptose soya broth 37°C'de, Saboraud dextroz broth ise hem 37°C'de hem de oda ısında 15 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. 7. ve 15. günlerde sıvı besi yerlerinden Saboraud dextroz agar, Mac. conkey, PPLO ve %7 koyun kanlı agarlara 0,1'er ml miktarlarda pasajları yapıldı. Katı besi yerlerinin bakteriyel üremeler yönünden her gün kontrolleri yapıldı. Pestivirus yönünden kontrol PCR testi ile kontrolleri yapıldı.

DKİD₅₀/ml değerinin belirlenmesi amacıyla mikrovirus titrasyon testi uygulandı. Patojen PenLSD suşunun PBS ile 10 katlı sulandırılmaları yapıldı. Her sulandırmadan 96 gözlü pleytin dört gözüne 100'er µl konuldu. Bütün sulandırmaların üzerine 100'er µl Oa3.Ts hücre kültürü (3-5×10⁵ hücre/ml) eklendi. Hücre kontrolü amacıyla pleytin son dört gözüne 100'er µl DMEM vasatı ve 100'er µl hücre süspansiyonu eklendi. Pleytin 37°C'de %5 CO₂'li ortamda her gün kontrolleri yapılarak 10 gün süreyle inkube edildi. Virusun üremesine bağlı CPE oluşumları gözlemlendi. Üretilen virus suşlarının DKİD₅₀ değerleri Spearman-Kaerber metoduna göre hesaplandı.

3.2.2.2. Deney Hayvanlarının Aşılınması

Tarım ve Orman Bakanlığı'nın aldığı karar ile 2018 yılı itibariyle, koyun keçi çiçek aşısının sığırlarda 5 koyun dozu olarak kullanılmasına karar verildiğinden çalışmada saha dozu olarak 5 doz belirlenmiştir. Çalışmalarda kullanılacak 10 adet sığır 4 gruba ayrıldı ve gruplara ait bilgiler, aşı dozları ve doz titreleri tablo 5'de gösterildi. Grup A zararsızlık çalışmasında kullanılırken, etkinlik çalışması için Grup B ve C'deki

sığırlar kullanıldı. Grup D kontrol olarak belirlenerek aşı uygulanmadı. MDBK hücre kültüründe üretilen aşının 10 dozunun oluşturacağı bağışıklığın incelenmesi için Grup A'da bulunan 2 adet sığır etkinlik çalışmasına dahil edildi.

Liyofilize aşilar ve aşılar a ait sulandırma sıvıları kullanılacağı zamana kadar +4°C'de muhafaza edildi. Kullanılacak aşilar çalışma günü soğuk zincirde çalışma yapılacak olan ahıra sıcaklık indikatörü ile sevk edildi. MDBK hücre kültüründe üretilen aşidan rastgele 5 adet vial seçildi ve 1 adet 100 ml'lik sulandırma sıvısında havuz yapılarak sulandırıldı. 2017/05 seri numaralı Penpox-M koyun keçi çiçek aşısından rastgele 5 adet vial seçildi ve 1 adet 100 ml'lik sulandırma sıvısında havuz yapılarak sulandırıldı. Aşıların uygulama doz miktarları, 5 adet vial için hesaplanarak belirlendi (Prospektüs bilgisi olarak 1 doz Penpox-M aşısı 1ml olarak uygulanmaktadır).

Tablo 5: Denev hayvanı grupları, aşı dozları ve titreleri

Gruplar	Hayvan No	Çalışma Adı	Kullanılan Aşı	Aşı Dozu	Aşı Dozu Titresi (DKİD ₅₀)
Grup A	A-1	Etkinlik ve Zararsızlık	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅	10 Doz	10 ^{-4,75}
	A-2	Etkinlik ve Zararsızlık	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅	10 Doz	10 ^{-4,75}
Grup B	B-1	Etkinlik	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅	5 Doz	10 ^{-4,4}
	B-2	Etkinlik	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅	5 Doz	10 ^{-4,4}
	B-3	Etkinlik	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅	5 Doz	10 ^{-4,4}
Grup C	C-1	Etkinlik	SP(BK)LK ₆₅ (Penpox-M)	5 Doz	10 ^{-3,9}
	C-2	Etkinlik	SP(BK)LK ₆₅ (Penpox-M)	5 Doz	10 ^{-3,9}
	C-3	Etkinlik	SP(BK)LK ₆₅ (Penpox-M)	5 Doz	10 ^{-3,9}
Grup D	D-1	Kontrol	Aşı Uygulanmadı.	-	-
	D-2	Kontrol	Aşı Uygulanmadı.	-	-

3.2.2.3. Zararsızlık Çalışması

Canlı viral aşilar hedef hayvan türünde enfeksiyona sebep verebildiğinden üretilen aşının 10 dozunun zararsızlığının tespit edilmesi gereklidir. Bu nedenle MDBK hücre kültüründe üretilen koyun keçi çiçek aşısının 10 dozunun sığırlardaki zararsızlık

çalışması yapıldı. Çalışma için Grup A'da bulunan 2 adet sığira 2 ml (10 doz) aşı deri altı yolla uygulandı. Aşılama sonrası klinik olarak hayvanlar takip edildi. Aşılama sonrası 12., 20., 27. ve 31. günlerde EDTA'lı ve EDTA'sız tüplere kanları alınarak real time PCR ile Capripoxvirus (CaPV) antijen yönünden aşılama sonrası olası vireminin tespiti, ELISA ve SNT ile aşılama sonrası oluşacak CaPV antikör tespiti için yapıldı (OIE Terrestrial Manual, 2017).

3.2.2.4. Etkinlik Çalışması

Etkinlik çalışmaları için toplam 8 adet sığır kullanıldı ve 3 gruba ayrıldı. Grup A MDBK'da üretilen aşının 10 dozu ile (zararsızlık çalışmasında kullanılan hayvanlar), Grup B MDBK'da üretilen aşının 5 dozu ile, Grup C ise Penpox-M aşısının 5 dozu ile aşılandı. 4. grup kontrol olarak belirlendi ve 2 adet hayvana herhangi bir aşı uygulanmadı. Sığırların aşı uygulaması sonrası rektal sıcaklıkları günlük olarak ölçüldü ve klinik olarak takipleri yapıldı (OIE Terrestrial Manual, 2017).

Aşılama Sonrası Yapılan Moleküler Testler:

Aşılama sonrası 12, 20, 27 ve 31. günlerde EDTA'lı tüplere kanları alındı. Aşılama sonrası olası vireminin tespiti için CaPV yönünden real time PCR testi yapıldı.

Aşılama Sonrası Yapılan Serolojik Testler:

Aşılama sonrası 12., 20., 27. ve 31. günlerde serum örnekleri alındı ve CaPV antikör tespiti için ELISA ve serum nötralizasyon testi yapıldı.

Challenge Çalışması:

Aşılama sonrası 31. günde etkinlik çalışması için aşı ve aşısız tüm hayvanlara patojen LSD virusu ile challenge yapıldı. Çalışmada kullanılan tüm sığırların sağ ve sol göğüs bölgesi tıraş edilip, alkol ile temizliği yapıldı. Log 10 tabanına göre 7 basamak sulandırılan LSDV, her iki göğüs bölgesine her sulandırmadan 4 noktaya olacak şekilde, 0,1 ml deri içi verildi. 25 gün süre ile tüm hayvanların, vücut ısısı, genel durum ve LSD'ye özgü klinik belirtiler yönünden takibi yapılarak kayıtları tutuldu. Virus inokulasyonu sonrası gerçekleşen deri lezyonları günlük olarak takip edildi ve challenge titresleri Spearman-Kärber metoduna göre hesaplandı. Sağ ve sol bölgedeki challenge titrelerinin en yüksek ortalaması challenge titresleri olarak belirlendi. Aşı ve aşısız

sığırlar arasındaki challenge titresinin logaritmik farkları ölçüldü. OIE Terrestrial Manual 2017'e göre logaritmik farkın en az 2,5 veya üstünde olması, aşının koruyuculuğu göstermektedir.

Challenge Sonrası Yapılan Moleküler Testler:

Challenge sonrası LSD virusunun infeksiyon meydana getirip getirmediğinin belirlenmesi için çalışmada kullanılan sığırlardan 9., 11., 15., 21. ve 25. günlerde göz ve burun svapları ve EDTA'lı tüplere kan örnekleri alınarak real time PCR ile LSDV nükleik asit tespiti yapıldı.

Challenge Sonrası Yapılan Serolojik Testler:

Challenge sonrası tüm deney hayvanlarının 9., 11., 15., 21. ve 25. günlerde serum örnekleri alınarak ELISA ve serum nötralizasyon testi ile CaPV yönünden antikor varlığı araştırıldı.

Challenge Sonrası Nekropsi:

Challenge sonrası 25. günde tüm hayvanlara nekropsi yapıldı. LSD yönünden değerlendirme yapabilmek için makroskopik bulgular not edilerek deri ve ödem svabı, kıl kökü, enjeksiyon bölgesi kas dokusu, gluteal kas dokusu, akciğer, kalp, böbrek, karaciğer ve rumen örnekleri taşıma vasatı içeren tüplere alındı. Kontaminasyonu önlemek için steril bisturi ucu ve penset kullanıldı. Homojenizatör yardımı ile doku ve organ örnekleri parçalandı. Parçalanmış doku ve organ örneklerinden hazırlanan inokulum 3000 rpm'de +4°C'de 15 dk. santrifuj edildi. İnokulumu ait üst sıvıdan alınan 200µl lik örnekten DNA ekstraksiyonu kit prosedürüne uygun olarak yapıldı. DNA ekstraksiyonu sonrası real time PCR analizi ile LSDV nükleik asidi nekropsi sonrası alınan doku ve organ örneklerinde arandı.

4. BULGULAR

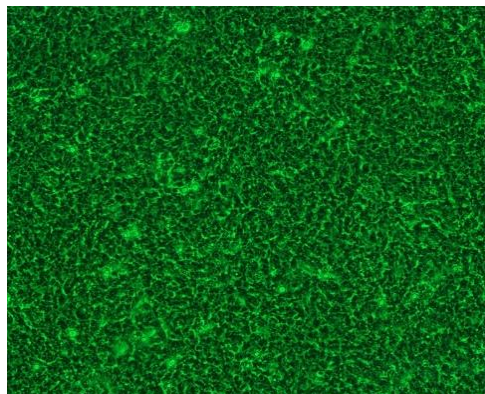
4.1. Aşı Üretim Çalışmaları Bulguları

4.1.1. MDBK Hücre Kültürü Hazırlanması ve Kontrolü

Hazırlanan MDBK hücre hattının mikroskopik incelemesinde hücre yapılarının düzgün olduğu görüldü ve herhangi bir dejeneratif bulgu saptanmadı. Bakteriyel ve fungal kontaminantlar yönünden sıvı ve katı besi yerlerine yapılan ekimler sonucunda herhangi bir üreme tespit edilmedi. Viral kontaminantlar yönünden yapılan H&E boyama sonucunda intrasitoplazmik ve intranükleer inklüzyon cisimciğine rastlanmazken PI3 yönünden yapılan hemadsorbsiyon testinde eritrosit süspansiyonunda hemadsorbsiyon oluşumu gözlenmedi. Pestivirus yönünden yapılan PCR ile virus nükleik asidi tespit edilmedi. Kullanılacak MDBK hücre hattında bakteriyel, fungal ve viral kontaminant tespit edilmedi ve üretim için uygun olduğu belirlendi.

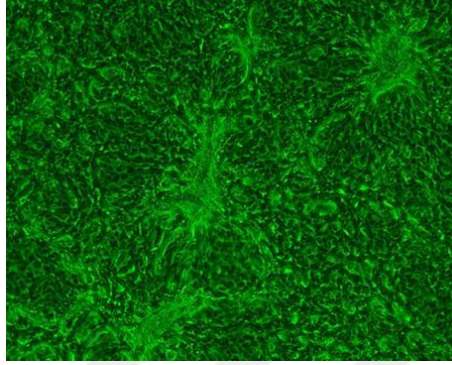
4.1.2. MDBK Hücre Kültürüne Aşı Virusunun Adapte Edilmesi

Aşı virusunun adaptasyonu için titresi $DKID_{50} 10^{-4,0}$ /ml olan SP(Bk)LK₆₀ suşunun MDBK hücre hattına ilk pasajı yapıldı. İnokulasyon sonrası 2. gün %2 FBS içeren DMEM ile vasat değişiminin ardından, 4. günde hücreler monolayer olarak kapladığı alanda sıkışmaya başladı ve 75 cm²'lik flasktan 175 cm²'lik flaska pasajlandı. İnokulasyonun 7. gününde bazı odaklarda hücrelerin yuvarlak hale geldiği ve çevresinde bulunan hücrelerden uzaklaştığı belirlenerek CPE oluşumlarının başladığı saptandı. 10. günde %80 CPE oluşmasının ardından flasklar -80°C'deki derin dondurucuya kaldırıldı (SP(Bk)LK₆₀MDBK₂).



Şekil 8: MDBK hücre kültürü 7. gün negatif kontrol

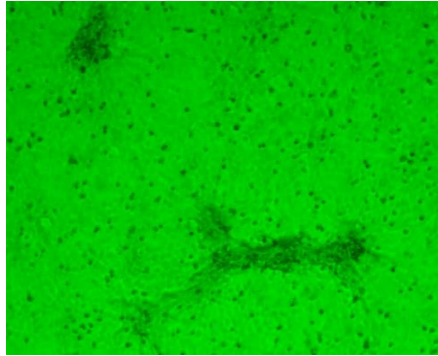
Tekrar MDBK hücre kültürüne ekimleri yapılan virus SP(Bk)LK₆₀MDBK₃ ana tohum suşu, SP(Bk)LK₆₀MDBK₄ ise çalışma tohum suşu olarak stoklandı. MDBK hücre kültüründe en iyi CPE oluşumu 5. pasajda görüldüğünden identifikasyon çalışmasında SP(Bk)LK₆₀MDBK₅ kullanıldı.



Şekil 9: MDBK hücre kültüründe 7. gün CPE görüntüsü

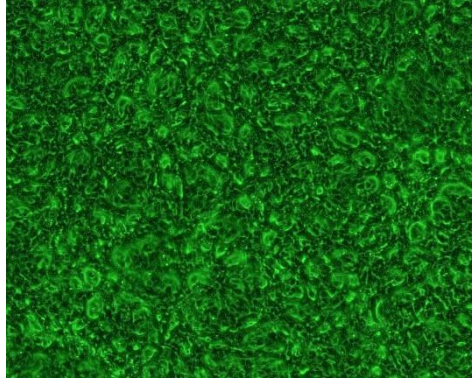
4.1.3. MDBK Hücre Kültürüne Adapte Olan Aşı Virusunun İdentifikasyonu

Virus titrasyon yöntemi ile MDBK hücre kültürüne adapte edilen SP(Bk)Lk₆₀MDBK₅ suşunun DKİD₅₀/ml değeri $10^{-5,75}$ olarak saptandı ve uygun değerlerde olduğu belirlendi (Koyun keçi çiçek aşı virusunun minimum koruyucu titresi 100 doz için $10^{-4,5}$ /ml olmalıdır, OIE Terrestrial Manual, 2017).

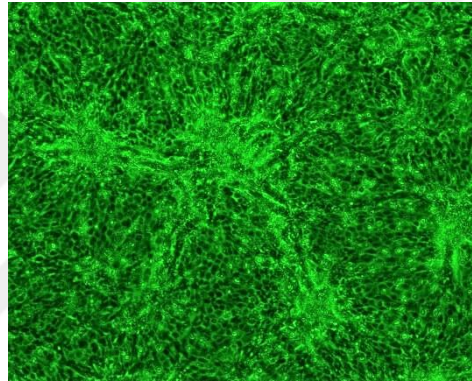


Şekil 10: 10^{-4} virus sulandırmasında CPE görüntüsü

SP(Bk)LK₆₀MDBK₅ suşu ve koyun çiçeği hiperimmun serumu 37°C'de bir saatlik inkubasyonda tutuldu ve ardından MDBK hücre kültürüne ekim yapıldı. 10 günlük inkubasyon süresince MDBK hücre kültüründe herhangi bir CPE odağı gözlenmedi. Kontrol amacıyla nötralizasyon yapılmamış suşun yine aynı hücre hattına ekimi sonucu 4. günden itibaren CPE odaklarının oluştuğu gözlemlendi.



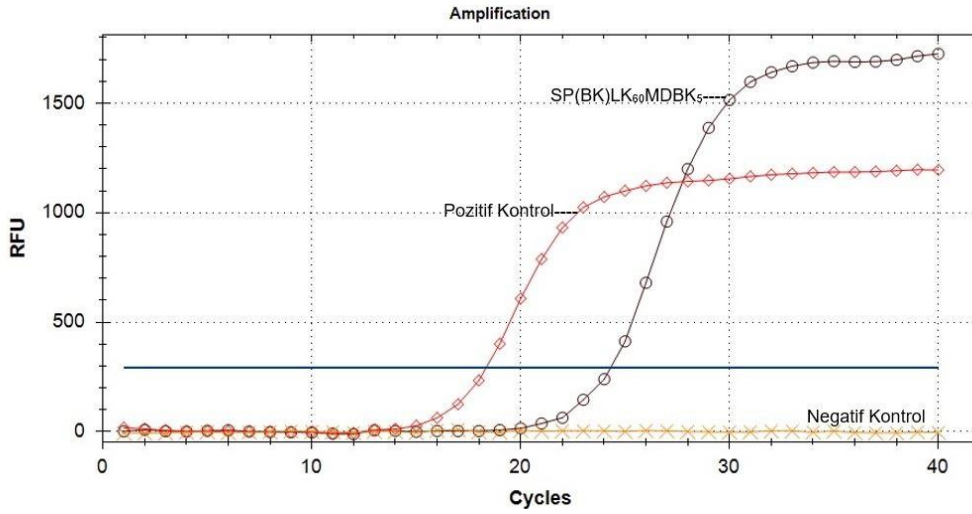
Şekil 11: Nötralizasyon yapılmış MDBK hücre kültürü görüntüsü (10.gün)



Şekil 12: Nötralizasyon yapılmamış MDBK hücre kültüründe CPE (10.gün)

SP(Bk)Lk₆₀MDBK₅ suşunun lameldeki MDBK hücre kültürlerine yapılan ekim sonucu 4. günde virusa ait CPE oluşumları gözlemlendi. Hücrelere yapılan boyama sonucunda koyun çiçeği virusuna özgü intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri tespit edildi.

Real time PCR analizinin validasyon çalışmaları pozitif kontrol olarak kullanılan Bakırköy aşısı suşunun DNA ekstraktı ile yapıldı. 10 katlı sulandırmaları yapılan DNA'lardan yapılan real time PCR ile Threshold Cycle (Ct) değeri 38 ve üzeri olanlar negatif olarak kabul edildi. SP(Bk)LK₆₀MDBK₅ suşunun real time PCR sonucu Ct değeri 24,32 olarak tespit edildi.



Şekil 13: Aşı virusu identifikasyonu için yapılan real time PCR sonuç görüntüsü

4.1.4. Aşı Virusunun MDBK Hücre Kültüründe Üreme Özellikleri

Günlük virus titreleri inkubasyonun 2. gününden 9. gününe kadar saptandı (Tablo 6). Günlük virus titresi 7. günde en yüksek değere ulaşırken 9. günde titrede azalma meydana geldi.

Vasata geçen virus titreleri inkubasyonun 2. gününden 9. güne kadar saptandı (Tablo 6). Vasata geçen virus titresi 7.günde en yüksek tespit edilirken 8. günde azalmaya başladığı belirlendi.

Tablo 6: Vasata geçen ve günlük virus titreleri

İnkubasyon Süresi	Vasata Geçen Virus Titreleri (log 10)	Günlük Virus Titreleri (log 10)
2. Gün	2,75	3,75
3. Gün	3,0	4,5
4. Gün	3,5	4,75
5. Gün	3,5	5,5
6. Gün	3,75	5,5
7. Gün	4,25	5,75
8. Gün	4	5,75
9. Gün	3,75	5,25

5 kez yapılan dondurma ve çözdürme işlemlerinin ardından titre değerleri hesaplandı (Tablo7). Üçüncü dondurma ve çözdürmede en yüksek titreye ulaşılrken 5. çözdürmede virus titresinde azalma meydana geldi.

Tablo 7: Tekrarlanan dondurma ve çözdürme sonucu virus titreleri

Dondurma ve Çözdürme Sayısı	Virus Titreleeri (log 10)
1	5,25
2	5,5
3	5,75
4	5,75
5	5,5

4.1.5. Aşı Virusunun Üretilmesi ve Kontrol Testleri

Roller hücre kültürü şişelerine ekimi yapılan SP(Bk)Lk₆₀MDBK₄ virusunun 2. günü yapılan vasat değişimi sonrası 3. günde virusa özgü CPE'ler görülmeye başlandı. Üreme özellikleri incelemesine istinaden 7. günde %90 oranında CPE oluşumunun ardından kontrol için örnekler alınarak roller şişeler toplandı.

Liyofilizasyon öncesi kontrol edilen SP(Bk)LK₆₀MDBK₅ aşı bulk virusunun DKİD₅₀/ml değeri 10^{-5.75} olarak tespit edildi. Viral kontaminantlar yönünden yapılan Hemadsorbsiyon testi ve PCR sonucunda kontaminasyon tespit edilmedi. Bakteriyel ve fungal kontaminantlar yönünden sıvı ve katı besi yerlerine yapılan ekimler sonucunda herhangi bir üreme saptanmadı.

4.1.6. Liyofilizasyon, Paketleme ve Liyofilizasyon Sonrası Kontrol Testleri

Kontrol sonuçlarının uygun çıkmasının ardından üreme özelliklerinde belirlenen dondurma-çözdürme sayısına göre 3 defa dondurulup çözdürülen aşı virusu yarı yarıya aşı koruma vasatı ile karıştırıldı. Liyofilizasyon programı aşı protokolüne uygun olarak gerçekleşti ve liyofilizasyon sürecinde ve program kayıtlarında herhangi bir sorunla karşılaşılmadı. Liyofilizasyon sonrası yapılan dış bakı görünümünde krem renkli liyofilize pelet olduğu ve aşı vialinde vakum bulunduğu tespit edildi. Aşılar

kapaklandı ve liyofilizasyon sonrası kontroller için örnek alınarak +4°C'de kullanılıncaya dek muhafaza edildi.

Viral kontaminantlar yönünden yapılan hemadsorbsiyon testi ve PCR sonucunda kontaminasyon tespit edilmedi. Bakteriyel ve fungal kontaminantlar yönünden sıvı ve katı besi yerlerine yapılan ekimler sonucunda herhangi bir üreme saptanmadı. Liyofilize edilen koyun keçi çiçek aşısının DKİD₅₀/ml değeri 10^{-5.75} olarak belirlendi.

4.2. Bağışıklık Çalışmaları Bulguları

4.2.1. Çalışma Öncesi Kontrol Testleri

Deney hayvanlarının kontrolü:

Bağışıklık çalışmalarında kullanılacak olan hayvanlardan çalışma öncesi alınan kanlarda real time PCR ile LSDV nükleik asidi tespit edilmedi. Yapılan PCR ile deney hayvanlarında BVDV nükleik asidi tespit edilmedi. Çalışma öncesi CaPV yönünden deney hayvanlarında serolojik kontrol yapıldı. ELISA ve SNT ile yapılan kontrollerde CaPV' ye yönelik seropozitiflik tespit edilmedi ve aşı bağışıklık çalışmaları için kullanılacak sığırların uygun olduğu belirlendi.

Patojen LSD Virusunun Kontrolü:

Viral kontaminantlar yönünden yapılan hemadsorbsiyon testi ve PCR sonucunda kontaminasyon tespit edilmedi. Bakteriyel ve fungal kontaminantlar yönünden sıvı ve katı besi yerlerine yapılan ekimler sonucunda herhangi bir üreme saptanmadı. Challenge çalışmasında kullanılacak patojen PenLSD suşunun titresi hem çalışma öncesi hem de çalışma sırasında yapılan mikro titrasyon testi ile DKİD₅₀/ml 10^{-6.75} olarak belirlendi.

4.2.2. Zararsızlık Çalışması

Zararsızlık çalışması kapsamında MDBK hücre kültüründe üretilen koyun keçi çiçek aşısının 10 dozuyla aşılamanın grup A'da bulunan sığırlarda aşılama sonrası enjeksiyon bölgesinde herhangi bir lezyon görülmedi. Klinik incelemelerinde herhangi bir bulguya rastlanmazken, rektal sıcaklıklarının normal değerlerde olduğu tespit edildi.

Aşı virusunun oluşturacağı olası vireminin saptanması için yapılan CaPV yönünden real time PCR analizi ile aşı virusuna ait nükleik asit tespit edilmedi (Serolojik sonuçlar etkinlik kısmında verildi).

4.2.3. Etkinlik Çalışması

Etkinlik çalışması kapsamında aşılanan tüm hayvanların klinik olarak incelemelerinde herhangi bir bulguya rastlanmadı. Enjeksiyon bölgelerinde lezyon meydana gelmezken, aşılama sonrası ölçülen rektal sıcaklıkların normal değerlerde olduğu görüldü.

Aşılama Sonrası Yapılan Moleküler Testler:

Aşı virusunun oluşturacağı olası vireminin saptanması için yapılan CaPV yönünden real time PCR ile aşı virusuna ait nükleik asit tespit edilmedi.

Aşılama Sonrası Yapılan Serolojik Testler:

Aşılama sonrası 12., 20., 27. ve 31. günlerde alınan kan örnekleriyle yapılan CaPV antikoru yönünden SNT sonucunda seropozitiflik saptanmadı (Tablo 8).

Tablo 8: Aşılama sonrası SNT sonuçları

Hayvan No	Aşı ve Uygulama Dozu	12. Gün	20. Gün	27. Gün	31. Gün
A-1	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 10 Doz	-	-	-	-
A-2	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 10 Doz	-	-	-	-
B-1	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	-	-	-	-
B-2	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	-	-	-	-
B-3	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	-	-	-	-
C-1	Penpox-M / 5 Doz	-	-	-	-
C-2	Penpox-M / 5 Doz	-	-	-	-
C-3	Penpox-M / 5 Doz	-	-	-	-
D-1	Kontrol Grubu	-	-	-	-
D-2	Kontrol Grubu	-	-	-	-

Aynı serum örnekleri ile yapılan ELISA çalışması sonucunda tablo 9'da verilen OD değerleri bulunurken, test sonucunda herhangi bir seropozitiflik saptanmadı.

Tablo 9: Aşılama sonrası ELISA sonuçları ve OD değerleri

Hayvan No	Aşı ve Uygulama Dozu	Challenge Sonrası Serum Örneklemeye Günleri			
		12. Gün	20. Gün	27. Gün	31. Gün
A-1	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ /10 Doz	Negatif 0,105	Negatif 0,099	Negatif 0,09	Negatif 0,101
A-2	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ /10 Doz	Negatif 0,094	Negatif 0,108	Negatif 0,213	Negatif 0,107
B-1	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	Negatif 0,099	Negatif 0,098	Negatif 0,093	Negatif 0,083
B-2	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	Negatif 0,301	Negatif 0,307	Negatif 0,371	Negatif 0,128
B-3	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	Negatif 0,36	Negatif 0,105	Negatif 0,113	Negatif 0,179
C-1	Penpox-M / 5 Doz	Negatif 0,071	Negatif 0,089	Negatif 0,105	Negatif 0,116
C-2	Penpox-M / 5 Doz	Negatif 0,076	Negatif 0,095	Negatif 0,093	Negatif 0,07
C-3	Penpox-M / 5 Doz	Negatif 0,07	Negatif 0,069	Negatif 0,071	Negatif 0,077
D-1	Kontrol Grubu	Negatif 0,093	Negatif 0,074	Negatif 0,081	Negatif 0,066
D-2	Kontrol Grubu	Negatif 0,085	Negatif 0,104	Negatif 0,095	Negatif 0,09
Pozitif OD Değeri Ortalaması		1,078			
Negatif OD Değeri Ortalaması		0,073			

Challenge Çalışması Bulguları:

İlk 3 gün inokulasyon bölgesinde aşırı duyarlılık reaksiyonları görüldü. 4. günden itibaren 10^{-1} virus sulandırmasının inokule edildiği deri bölgesinde şişlik ve lezyonların başladığı görüldü.

Challenge virusunun inokulasyonundan sonra, aşılanmış A-2, B-1, B-3 sığırlarının ve ayrıca kontrol grubu D-1 ve D-2 sığırlarının rektal sıcaklıkları yüksek olarak ölçülürken, diğer aşılanmış sığırlarda normal değerlerde ölçüldü (Tablo11). Aşılı hayvanların klinik muayenelerinde herhangi bir bulgu belirlenmezken, LSD'ye özgü klinik belirtilere de rastlanmadı. Aşısız kontrol grubunda olan D-1'de challenge sonrası

7. günden itibaren yem alımında azalma ve zayıflama görülürken, subscapular lenf yumrularında büyüme tespit edildi.

Grup A'da yapılan challenge çalışmasında; herhangi bir klinik belirti gözlenmedi. Rektal sıcaklık A-2'de 9. günde en yüksek 39,6°C ölçülürken, A-1 ölçümlerinin normal değerlerde olduğu belirlendi (Tablo 11). A-2'de virus inokule edilen bölgede lezyon gelişimi gözlenirken, A-1'de herhangi bir lezyon gelişimi görülmedi ve challenge titresi hesaplanmadı. A-2'nin en yüksek challenge titresi 8.günde ortalama log 2,63 olarak hesaplandı.



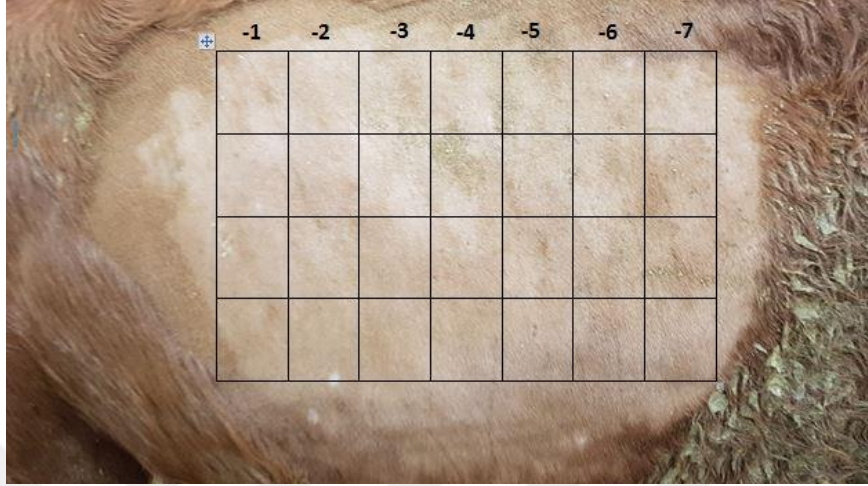
Şekil 14: A-1 numaralı sığırın challenge görüntüsü



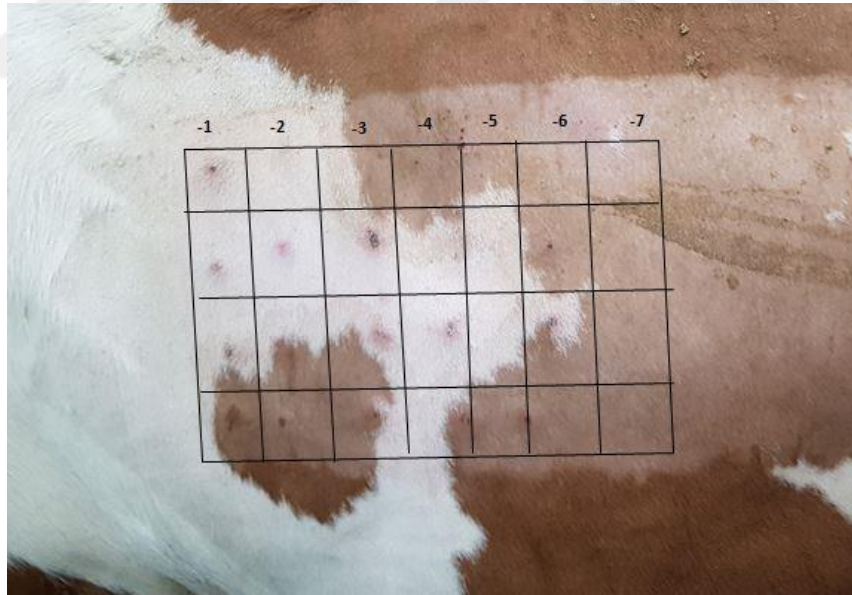
Şekil 15: A-2 numaralı sığırın challenge görüntüsü

Grup B'de yapılan challenge çalışmasında; klinik olarak belirti gözlemlenmedi. Rektal sıcaklık B-1'de en yüksek 9. günde 40,6°C ve B-3'de en yüksek 9. günde 39,5°C ölçüldü. B-2'de sıcaklık ölçümlerinin normal değerlerde olduğu belirlendi. B-1 numaralı hayvanda lezyon gelişimi gözlemlenmediğinden challenge titresi

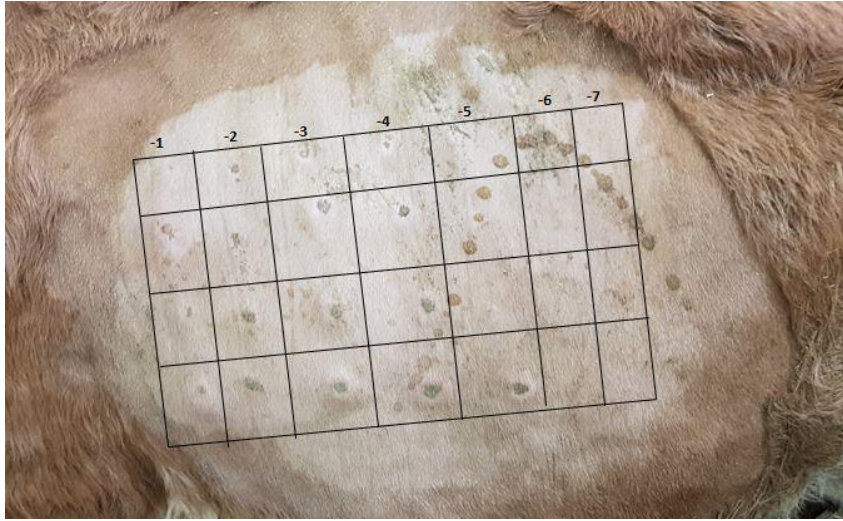
hesaplanmadı. B-2’de en yüksek titre 4. günde ortalama log 3,875 olarak hesaplandı. B-3’de 10. günde en yüksek titre ortalama log 4,88 olarak hesaplandı (Tablo 10).



Şekil 16: B-1 numaralı sığırın challenge görüntüsü



Şekil 17: B-2 numaralı sığırın challenge görüntüsü

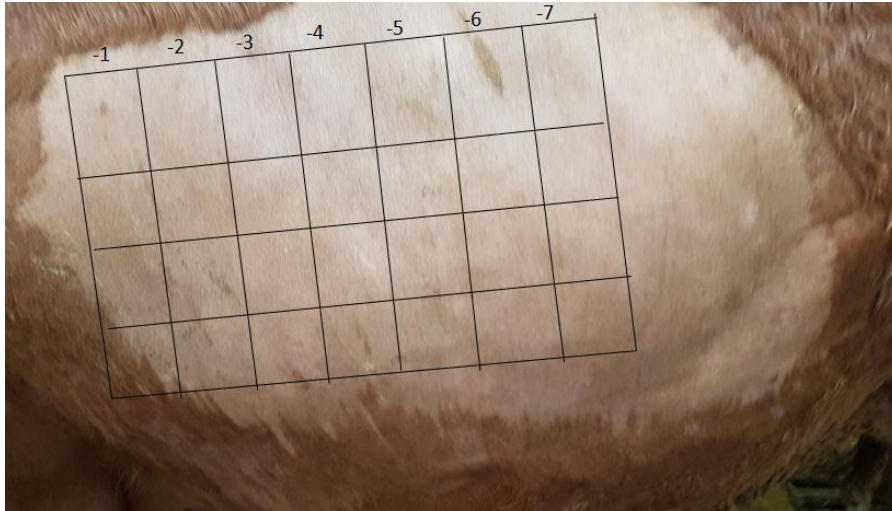


Şekil 18: B-3 numaralı sığırın challenge görüntüsü

Grup C’de yapılan challenge çalışmasında; klinik olarak belirti gözlenmedi. Rektal sıcaklıkların tüm hayvanlarda normal değerlerde olduğu tespit edildi. C-1’de en yüksek titre 4. günde ortalama log 2,375 olarak hesaplandı. C-2’de en yüksek titre 5. günde ortalama log 0,875 olarak hesaplandı. C-3’de en yüksek titre 4. günde ortalama log 2,625 olarak hesaplandı.



Şekil 19: C-1 numaralı sığırın challenge görüntüsü



Şekil 20: C-2 numaralı sığırın challenge görüntüsü



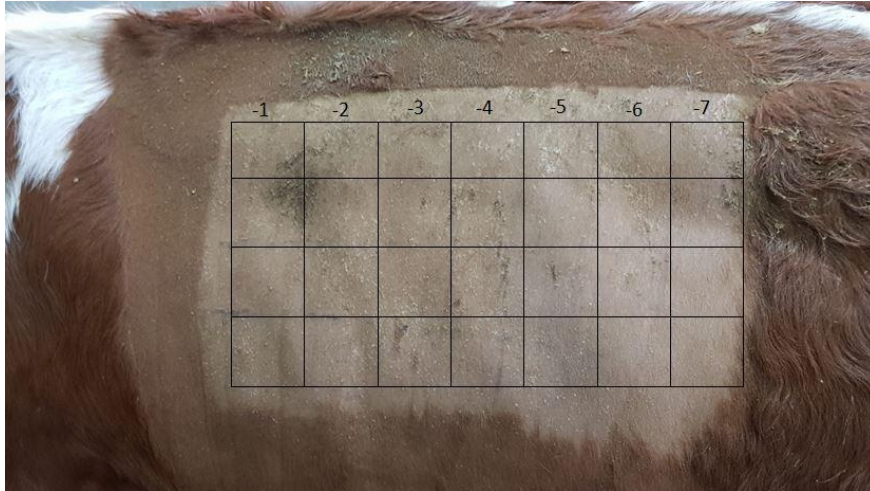
Şekil 21: C-3 numaralı sığırın challenge görüntüsü

Grup D’de bulunan aşısız kontrol sığırlara yapılan challenge çalışmasında; D-1’de challenge sonrası 7. günden itibaren yem alımında azalma ve zayıflama görülürken subscapular lenf yumrularında büyüme tespit edildi. Rektal sıcaklık en yüksek 9. günde 40,8°C olarak ölçülürken, 19. güne kadar genel itibariyle yüksek seyrettiği belirlendi. D-2’de herhangi bir klinik belirti gözlenmedi ve rektal sıcaklık en yüksek 9. günde 40,3°C olarak ölçüldü. D-1’de 8. günde en yüksek titreye ulaşıldı ve ortalama log 5,63 olarak hesaplandı. Sağ bölgede deri içine inokule edilen virusun titresini ile çalışma öncesi hesaplanan challenge virus titresinin aynı olduğu tespit edildi ($10^{-5,75}/100\mu\text{l}$). İnokulasyon bölgesindeki lezyonların aşıllı sığırlardaki lezyonlara göre daha büyük ve

nekroze olduğu görüldü. Kontrol grubu olmasına rağmen D-2’de lezyon gelişimi gözlenmedi ve challenge titresi hesaplanmadı (Tablo 10).



Şekil 22: D-1 numaralı sığırın challenge görüntüsü



Şekil 23: D-2 numaralı sığırın challenge görüntüsü

Logaritmik challenge titresinin aşılammış ve aşılammamış sığırlar arasındaki farkı, D-2’de lezyon gelişimin olmaması nedeniyle, sadece D-1’e ait ortalama 5,63 titre ile hesaplandı. Ayrıca A-1 ve B-1 numaralı sığırlarda, challenge virusuna bağı herhangi bir lezyon gelişimi olmadı ve logaritmik farklılıklar log 5,63 olarak hesaplandı. Logaritmik farklar A-2’de 3, C-1’de 3,26, C-2’de 4,76 ve C-3’te 3,01 olduğu ve minimum koruyucu fark olan log 2,5’ten fazla olduğu belirlendi. Logaritmik farklar B-

2'de 1,76 ve B-3'de 0,75 olduğu ve minimum koruyucu fark olan log 2.5'ten az olduğu belirlendi (Tablo10).

Tablo 10: Challenge titre ortalamaları ve logaritmik farklar

	Hayvan No	Aşı ve Uygulama Dozu	Challenge Titre Ortalaması (log)	Logaritmik Fark
Grup A	A-1	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ /10 Doz	0	5,63
	A-2	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ /10 Doz	2,63	3
Grup B	B-1	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	0	5,63
	B-2	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	3,87	1,76
	B-3	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	4,88	0,75
Grup C	C-1	Penpox-M / 5 Doz	2,37	3,26
	C-2	Penpox-M / 5 Doz	0,87	4,76
	C-3	Penpox-M / 5 Doz	2,62	3,01
Grup D	D-1	Kontrol Grubu	5,63	-
	D-2	Kontrol Grubu	0	-

Tablo 11: Challenge sonrası rektal sıcaklıklar (°C)

GÜN	Grup ve Hayvan Numaraları									
	Grup A		Grup B			Grup C			Grup D	
	A-1	A-2	B-1	B-2	B-3	C-1	C-2	C-3	D-1	D-2
0.Gün	38,5	38,6	38,3	38,3	38,7	39	38,4	38,6	38,6	38,4
1.Gün	38,6	38,6	38,1	38,4	38,8	39,1	38,5	38,6	38,6	38,5
2.Gün	38,6	38,5	38,7	38,7	38,6	38,7	38,3	38,4	38,5	38,2
3.Gün	38,1	38,6	38,8	38,5	38,3	38,5	38,5	38,8	38,3	38,6
4.Gün	39,1	39,5	38,9	38,5	38,2	39,2	38,3	38,5	38,5	38,3
5.Gün	38,8	38	38,4	38,3	38,9	38,6	38,4	38,9	39,1	38,8
6.Gün	38,6	38,3	38,5	38,5	38,8	38,8	38,4	38,9	39,2	38,6
7.Gün	38,6	38,3	39,2	38,3	39,4	38,7	38,4	39	39,9	38,3
8.Gün	39,3	38,5	38,5	38,2	38,5	38,5	39,2	38,3	39,3	38,4
9.Gün	39	39,6	40,6	39,3	39,5	39,3	39,2	39,2	40,8	40,3
10.Gün	39,1	38,8	40,3	38,8	39,1	39,4	39,1	39,1	39,9	39
11.Gün	38,4	38	39,3	38,5	38,4	39	38,5	38,7	40,2	38,3
12.Gün	38	38,3	38,3	38,3	38,3	38,6	38,4	38,2	39,3	38,6
13.Gün	38,1	38,1	38,4	38,4	38,3	38,8	38,4	38,2	39,5	38,8
14.Gün	39,3	38	39,5	38,3	38,5	39,1	39,3	38,3	38,8	38,2
15.Gün	38,2	38,2	38,3	38,5	38,3	38,9	38,2	38,2	38,8	38,1
16.Gün	38,5	38	38,9	38	39,1	39	38,5	38,7	38,9	38,3
17.Gün	39,3	38	38,6	38,6	38,6	38,8	39,3	38,7	39,9	38,1
18.Gün	39,3	38,7	38,5	38,9	38,7	38,3	38,4	38,8	39,7	38,4
19.Gün	39,3	38,3	38,2	38,7	38,5	38,1	38,3	38,5	39,6	38,2
20.Gün	39,2	38,5	38,4	38,6	38,5	38,4	38,3	38,6	38,6	38,1
21.Gün	38,7	38	38,7	38,5	38,4	37,9	38,2	38,1	38,2	38,1
22.Gün	37,9	38,5	38,5	38,7	38,3	38	38,3	38,5	38,2	38,2
23.Gün	38	38,3	38,5	38,5	38,2	38	38,3	38,3	38,5	38,1
24.Gün	38,1	38	38,3	38,3	38,1	38,2	38,2	38,2	38,2	38,2
25.Gün	38,1	38	38,4	38,3	38,2	38,4	38,3	38,4	38,4	38,1

Challenge Sonrası Yapılan Moleküler Test Bulguları:

Challenge sonrası 9, 11, 15, 21 ve 25. gün alınan kan örneklerinde CaPV yönünden yapılan real time PCR sonuçlarına ait Ct değerleri tabloda 12’de gösterildi. MDBK hücre kültüründe üretilen aşının 10 dozuyla aşılana grup A’da bulunan hayvanların 11. gün alınan kan örneklerinde LSDV nükleik asidi tespit edildi. MDBK hücre kültüründe üretilen aşının 5 dozuyla aşılana grup B’de bulunan hayvanların 11. gününde ve aynı grupta bulunan B-3’ün 15. gün kan örneğinde virus nükleik asidi tespit edildi. Grup C’de bulunan Penpox-M ile aşılana hayvanlarda LSD virus nükleik asidi tespit edilmedi. Grup D’de bulunan aşısız kontrol hayvanlarının 11. gün kan örneklerinde virus nükleik asidi tespit edildi.

Tablo 12: Challenge sonrası kan örnekleri real time PCR Ct değerleri

Hayvan No	Aşı ve Uygulama Dozu	Challenge Sonrası Kan Örnekleme Günleri				
		9. Gün	11. Gün	15. Gün	21. Gün	25. Gün
A-1	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ /10 Doz	-	+(32,46)	-	-	-
A-2	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ /10 Doz	-	+(23,63)	-	-	-
B-1	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	-	+(25,46)	-	-	-
B-2	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	-	+(26,87)	-	-	-
B-3	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	-	+(32,58)	+(32,65)	-	-
C-1	Penpox-M / 5 Doz	-	-	-	-	-
C-2	Penpox-M / 5 Doz	-	-	-	-	-
C-3	Penpox-M / 5 Doz	-	-	-	-	-
D-1	Kontrol Grubu	-	+(25,52)	-	-	-
D-2	Kontrol Grubu	-	+(26.60)	-	-	-

Challenge sonrası 9, 11, 15, 21 ve 25. gün alınan burun ve göz svap örneklerinde CaPV yönünden yapılan real time PCR sonuçlarına ait Ct değerleri tablo 13’de gösterildi. Yapılan real time PCR sonucunda svap örneklerinden aşı uygulanan A,B ve C gruplarındaki sığırlarda virus nükleik asidi tespit edilmedi. Kontrol grubunda bulunan

D-1'e ait 15. gün burun ve göz svabı örneklerinde, D-2'ye ait aynı gün alınan burun svap örneğinde virus nükleik asidi tespit edildi.

Tablo 13: Challenge sonrası alınan svap örnekleri real time PCR Ct değerleri

B: Burun Svabı, G: Göz Svabı

Hayvan No	Aşı ve Uygulama Dozu	Challenge Sonrası Svap Örnekleme Günleri									
		9.Gün		11.Gün		15.Gün		21.Gün		25.Gün	
		B	G	B	G	B	G	B	G	B	G
A-1	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ /10 Doz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-2	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ /10 Doz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B-1	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B-2	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B-3	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-1	Penpox-M / 5 Doz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-2	Penpox-M / 5 Doz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-3	Penpox-M / 5 Doz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-1	Kontrol Grubu	-	-	-	-	+29,42	+36,5	-	-	-	-
D-2	Kontrol Grubu	-	-	-	-	+35,36	-	-	-	-	-

Challenge Sonrası Yapılan Serolojik Test Bulguları:

Challenge sonrası yapılan SNT sonuçları tablo 14'de, ELISA sonuçları ise tablo 15'de gösterildi. ELISA ve SNT sonuçlarının, D-10'a ait 25.gün serum numunesi dışında uyumlu olduğu belirlendi. D-10'a ait 25.gün serum numunesinin SNT'de pozitif olmasına rağmen ELISA'da negatif olduğu saptandı. Her iki test sonucuna göre C-1'e ait serum örneklerinde seropozitiflik saptanmadı. Challenge virusu inokulasyonundan

sonra lezyon sayısı fazla olan A-2, B-2 ve B-3’de nötralizan antikorlarda belirgin bir artışın olduğu belirlendi. Challenge sonrası az sayıda lezyonu olan veya olmayan A-1, B-1, C-2 ve C-3’de ise antikor artışının düşük olduğu tespit edildi. Kontrol grubu D-1 ve D-2 sığırlarında ise geç dönemde antikorların arttığı tespit edildi.

Tablo 14: Challenge sonrası SNT sonuçları

Hayvan No	Aşı ve Uygulama Dozu	Challenge Sonrası Serum Örneklemeye Günleri				
		9. Gün	11. Gün	15. Gün	21. Gün	25. Gün
A-1	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ /10 Doz	-	1/2	1/2	1/3	1/3
A-2	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ /10 Doz	1/24	1/48	1/48	1/48	1/48
B-1	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	1/3	1/16	1/16	1/12	1/8
B-2	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	1/192	1/384	1/768	1/768	1/256
B-3	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	1/8	1/768	1/256	1/128	1/128
C-1	Penpox-M / 5 Doz	-	-	-	-	-
C-2	Penpox-M / 5 Doz	1/2	1/12	1/32	1/12	1/6
C-3	Penpox-M / 5 Doz	1/2	1/2	1/2	1/24	1/24
D-1	Kontrol Grubu	-	-	-	1/2	1/6
D-2	Kontrol Grubu	-	1/2	-	-	1/2

Tablo 15: Challenge sonrası ELISA sonuçları ve OD değerleri

Hayvan No	Aşı ve Uygulama Dozu	Challenge Sonrası Serum Örneklemeye Günleri				
		9.Gün	11.Gün	15.Gün	21.Gün	25.Gün
A-1	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ /10 Doz	Negatif (0,378)	Pozitif (0,457)	Pozitif (0,593)	Pozitif (0,555)	Pozitif (0,549)
A-2	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ /10 Doz	Pozitif (1,035)	Pozitif (1,284)	Pozitif (1,148)	Pozitif (1,148)	Pozitif (1,259)
B-1	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	Pozitif (0,699)	Pozitif (1,002)	Pozitif (0,953)	Pozitif (0,885)	Pozitif (0,782)
B-2	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	Pozitif (1,207)	Pozitif (1,483)	Pozitif (1,761)	Pozitif (1,75)	Pozitif (1,611)
B-3	SP(BK)LK ₆₀ MDBK ₅ / 5 Doz	Pozitif (2,627)	Pozitif (2,994)	Pozitif (2,005)	Pozitif (2,319)	Pozitif (2,308)
C-1	Penpox-M / 5 Doz	Negatif (0,116)	Negatif (0,16)	Negatif (0,209)	Negatif (0,155)	Negatif (0,141)
C-2	Penpox-M / 5 Doz	Pozitif (0,615)	Pozitif (0,879)	Pozitif (1,042)	Pozitif (0,72)	Pozitif (0,657)
C-3	Penpox-M / 5 Doz	Pozitif (0,433)	Pozitif (0,537)	Pozitif (0,732)	Pozitif (0,93)	Pozitif (0,973)
D-1	Kontrol Grubu	Negatif (0,112)	Negatif (0,128)	Negatif (0,08)	Pozitif (0,469)	Pozitif (0,798)
D-2	Kontrol Grubu	Negatif (0,191)	Pozitif (0,394)	Negatif (0,256)	Negatif (0,202)	Negatif (0,381)
Pozitif OD Değeri Ort.		1,055				
Negatif OD Değeri Ort.		0,103				

Challenge Sonrası Nekropsi Bulguları:

Challenge süresinin tamamlanmasının ardından aşı ve aşısız tüm sığırlara nekropsi yapıldı. Makroskopik incelemede challenge uygulanan bölgedeki deri altı dokusunda ödem görüldü. Yapılan incelemede makroskopik patolojik bulguya rastlanmadı. Nekropside alınan doku ve organ örneklerinden kontrol hayvanı olan D-1'in deri bölgesinden alınan svap ve kıl kökünde virus nükleik asidi tespit edildi. Diğer hayvanlardan alınan doku ve organ örnekleriyle yapılan real time PCR sonucunda LSD virus nükleik asidi tespit edilmedi (Tablo 16).

5. TARTIŞMA

Lumpy skin disease (LSD) Capripoxvirusların neden olduğu, ateş, lenf yumrularında büyüme, başta ağız mukozası olmak üzere mukoz membranlarda ülseratif lezyonlar, deride sert ve sınırlı nodüller ile karakterize bir hastalıktır (Davies, 1991a). Endemik ülkelerde LSDV'nin yayılımını kontrol etmenin tek etkili yolunun aşılama olduğu kabul edilmektedir (Tuppurainen, 2014). Canlı, attenüe LSD aşıları genellikle etkili olmakla birlikte, birçoğu aşı sonrası reaksiyonlara, hatta hafif klinik hastalığa neden olmakta, bu da homolog LSD aşısının geliştirilmesi ihtiyacını ortaya koymaktadır (Tasioudi, 2016). Koyun çiçek, keçi çiçek ve LSD virusu arasında antijenik yakınlık ve çapraz koruma bulunduğu için bu virusların herhangi birisi aşı suşu olarak LSD'ye karşı kullanılabilir (Kitching, 1983).

Ülkemizde koyun-keçi çiçek hastalığı ve LSD'ye karşı Bakırköy suşundan üretilmiş, primer kuzu böbrek hücre kültüründe attenüe edilmiş, canlı koyun keçi çiçek aşısı kullanılmaktadır (Üretim Protokolü, 2016). Testis ve böbrek hücre kültürleri koyun keçi çiçek virusuna oldukça hassas olup gerek izolasyon amaçlı gerekse aşı üretimi amacıyla kullanılmaktadır (OIE Terrestrial Manual, 2017). Primer hücre kültürlerinin devamlı hücre kültürlerine kıyasla birçok dezavantajı bulunmaktadır. Primer hücre kültürleri belli sayıda pasaja kadar dayanıklılığını koruyabildiğinden, sürekli yeni hücre kültürlerinin yapılmasına sebebiyet vermektedir. Yeni yapılacak olan primer hücre kültürleri ise seri aşı üretiminde dezavantaj oluşturmaktadır (Gülyaz, 2003). Bunun yanında primer hücre kültürlerinin BVDV ve border disease gibi viral hastalıklarla kontamine olma olasılığı daha yüksektir (Giangaspero, 2013). Yapılan bir çalışmada LSD ile mücadelede kullanılan koyun çiçek aşılarında mavi dil virusu kontaminasyonu bildirilmiştir (Bumbarow, 2016). Bu nedenle primer hücre kültürlerinde üretilen aşı viruslarının devamlı hücre hatlarına adapte olması önem kazanmaktadır.

Gülyaz tarafından yapılan bir çalışmada Bakırköy koyun keçi çiçek aşı virusunun Vero hücre kültüründe 5. pasajda CPE meydana getirdiği ve tam olarak 12. pasajda adapte olduğu bildirilmiştir (Gülyaz, 2003). Keçi çiçek virusunun ve koyun çiçek virusunun MDBK hücre kültürlerinde ürettiği çalışmalar da yapılmıştır (Pandey, 1985; Joshi,1995). Bakırköy koyun çiçek virusunun buzağı böbrek hücre kültüründe üreme özellikleri üzerine yapılan çalışmada 6. günde virus titresinin en yüksek seviyeye çıktığı bildirilmiştir (Chifney ve ark.,1973). Bu çalışmada Bakırköy koyun çiçek aşı

virusunun primer kuzu böbrek hücre kültüründeki 60. pasajı MDBK hücre kültürüne inokule edildi. Hücre sıkışmasına bağlı olarak ilk pasajında CPE gözlenmez iken aynı vasat ile 175cm² lik flaska yapılan 2. pasajının 3. gününde (toplamda 10.gün) CPE gözlendi. Bakırköy koyun aşı virusunun 5. pasajda tam olarak MDBK hücre kültürüne adapte olduğu belirlendi. Üreme özellikleri incelenen Bakırköy koyun çiçek aşı virusunun 7. günde en yüksek titreye ulaştığı ve 9. günden sonra titrenin düştüğü tespit edildi. Hücreler içinde kalan virusun hücrelerin patlatılarak açığa çıkarılması için yapılan dondurma çözme işleminde 3. kez yapılan işlemde en yüksek titreye ulaşıldığı, 4. çözmeden sonra titrede düşüş meydana geldiği saptandı. Vasata geçen virus titresinin Gülyaz tarafından yapılan çalışma ile paralellik göstererek 8. günde en yüksek olduğu tespit edildi (Gülyaz, 2003). Üretilen aşı virusunun titresini DKID₅₀/ml 10^{5.75} olarak belirlendi ve 100 dozluk koyun keçi çiçek aşısı üretim standardı olan en az 10^{4.5}/ml titre değerinin üstünde olduğu (OIE Terrestrial Manual, 2017) belirlenerek MDBK hücre kültüründe aşı üretiminin virus titresine herhangi bir olumsuz etkiye yol açmadığı tespit edildi.

Bu çalışmada aşılama sonrası alınan belirli günlerdeki kan örneklerinden yapılan ELISA ve SNT sonucunda herhangi bir seropozitiflik rastlanmadı. Koyun keçi çiçek aşısıyla aşılanmış hayvanlarda aşılama sonrası gerçekleşecek bağışıklık, büyük bir oranda hücrel immun yanıt olması sebebiyle antikor yanıtının olmayabileceği literatürlerde de bildirilmiştir (Kitching, 1986; Tuppurainen ve Galon, 2016). Spesifik antikor varlığının tespit edilemediği durumlarda hücrel bağışıklığın, infeksiyon sonrası iyileşme ve uzun süreli korumada en önemli bileşen olduğu bildirilmiştir (Babiuk ve ark., 2008a).

LSD'ye karşı üretilen aşılamanın etkinlik ve güvenliği, seronegatif genç LSDV'ye duyarlı sütçü ırklar kullanılarak istatistiksel olarak geçerli aşılama-challenge çalışmaları ile kanıtlanması gerektiği bildirilmiştir (OIE Terrestrial Manual, 2017). Bu çalışmada aşı etkinlik ve zararsızlık çalışmasında kullanılan 10 adet simental ırkı sığıra patojen LSDV ile challenge yapıldı. MDBK hücre kültüründe üretilen aşının 10 dozuyla aşılanan A grubunda logaritmik farkın 2,5'den yüksek olduğu ve hastalığı yaymadığı belirlendi. Ancak aşının challenge virusuna bağlı viremiyi durduramayarak LSD'ye karşı tam olarak koruma sağlamadığı belirlendi. MDBK hücre kültüründe üretilen aşının 5 dozyla aşılanan grup B'de, sığırların challenge virusunu yaymadığı belirlense de B-2 ve B-3'de logaritmik farkın 2,5'dan az olduğu, B-1 ve B-3'de rektal sıcaklıkların

yüksek olduğu, challenge virusuna bağlı vireminin gerçekleştiği ve aşının koruma sağlamadığı belirlendi. Penpox-M ile 5 doz aşılama grup C'de, logaritmik farkın 2,5'dan fazla olduğu, rektal sıcaklıkların normal değerlerde olduğu, viremi gerçekleşmediği, hayvanların challenge virusunu yaymadığı ve aşının tam olarak koruma sağladığı belirlendi. Kontrol olarak belirlenen Grup D'de, D-1 numaralı sığırdaki deri lezyonları gerçekleşirken, çalışma öncesi yapılan kontrol testinde belirlenen challenge virus titresini ($DKID_{50} / 100\mu l 10^{-5,75}$) bu hayvanın sol göğüs bölgesine yapılan inokulasyonda tespit edildi ve challenge virusunun titresini böylelikle doğrulandı. Aynı hayvana ait rektal sıcaklıkların yüksek olduğu belirlenirken, LSDV nükleik asidi challenge sonrası 11. gün kan örneğinde, 15.gün göz ve burun svap örneklerinde tespit edildi. D-2'de lezyon gelişimi olmamasına karşın 11. günde viremi tespit edilmesi ve burun svap örneğinde LSDV tespit edilmesiyle bu hayvanda sublinik infeksiyon meydana geldiği saptandı ve challenge virusunun aşısız kontrol grubunda virulent olduğu doğrulandı.

A-1 ve B-1'de lezyon gelişimi olmadığı, ancak bu sığırlarda 11.günde challenge virusuna bağlı viremi tespit edilmesiyle sublinik infeksiyon gerçekleştiği tespit edildi. Bu çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu olarak Tuppurainen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada LSDV inokule edilen hayvanların sadece %40-50'sinde hastalık belirtileri gözlemlendiği bildirilmiştir (Tuppurainen ve ark., 2005). A-1 ve B-1'de LSDV'nin göz ve burun svabında tespit edilmemesi viremi gerçekleşmesi nedeniyle aşının bu hayvanlarda tam olarak koruma sağlamasa da, hastalığın yayılımını durdurduğunu ortaya koymaktadır.

MDBK hücrelerinde üretilen aşının 5 dozu ile 10 dozunun etkinliğinin karşılaştırılmasında, 10 doza (grup A) gelişen lezyonların daha küçük ve logaritmik farkın 2,5'ten büyük olduğu belirlenirken, 5 doz uygulanan hayvanlardaki lezyonların daha büyük olduğu ve logaritmik farkın 2,5'ten az olduğu belirlendi. 10 doz uygulanan gruptaki hayvanlarda challenge sonrası gerçekleşen viremi, MDBK hücre kültüründe üretilen aşının tam olarak bağışıklık sağlamadığını göstermektedir. Bu durum MDBK hücre kültüründe üretilen aşının 10 dozdan daha yüksek olarak uygulandığında bağışıklık oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Bu LSD ile mücadelede kullanılacak canlı ve attenüe aşların 10 dozunun zararsız olması gereklidir (OIE Terrestrial Manual, 2017). Homolog canlı, attenüe LSD aşılarının daha etkili olduğu bilinse de aşılama sonrası ciddi klinik belirtilere yol açtığı

ve aşının geliştirilmesi gerektiği bildirilmiştir (Tasioudi, 2016; Ben-Gera, 2015). Yapılan bir saha çalışmasında ticari olarak kullanılan homolog LSD aşısının aşılama sonrası %12 oranında lokal reaksiyonlara yol açtığı rapor edilmiştir (Tasioudi, 2016, Katsoulos, 2018). LSD ile mücadelede kullanılan bir diğer aşı Yugoslavya RM65 suşundan üretilmiş koyun çiçek aşısıdır (Carn, 1993). Bir çalışmada RM65'den üretilen koyun çiçek aşısının 1 dozu (1×10^{-3} DKİD₅₀), 5 dozu ($1 \times 10^{-3.5}$ DKİD₅₀) ve 10 dozu ($1 \times 10^{4.5}$ DKİD₅₀) ile hayvanların aşılandığı, 1 ve 5 dozla aşılanan hayvanlarda klinik lezyon görülmezken 10 dozla aşılama sonrası 7-17. günlerde deri nodüllerinin görüldüğü ve 11-17 gün boyunca lezyonların kaldığı, ateş, yem alımında ve süt üretiminde azalma meydana geldiği bildirilmiştir (Abutarbush, 2018). Bu çalışmada MDBK hücre kültüründe üretilen aşının 10 dozuyla aşılanan sığırlarda enjeksiyon bölgesinde şişlik, ateş, viremi ve herhangi bir klinik belirti gözlenmedi ve aşının zararsız olduğu anlaşıldı. Başka bir çalışmada Bakırköy suşundan üretilmiş koyun keçi çiçek aşısının 5 dozunun ve 10 dozunun farklı yaş gruplarındaki sığır ve gebe ineklerde uygulandığı, aşılama sonrası herhangi bir klinik belirti gözlenmediği, abortlara, anomalili doğumlara yol açmadığı bildirilmiştir (Uzar ve ark., 2018). RM65 suşunu içeren koyun keçi çiçek aşısıyla 10 dozla ($1 \times 10^{-4.5}$ DKİD₅₀) aşılanan hayvanlarda deri reaksiyonu şekillendiği bildirilmiştir (Abutarbush ve ark., 2018). Bu çalışma Bakırköy koyun keçi çiçek aşısı suşunun, daha fazla titrede uygulanmasına rağmen ($1 \times 10^{-4.75}$ DKİD₅₀), RM65 koyun çiçek aşısı suşuna göre daha güvenli olduğunu göstermektedir.

Aşılama sonrası hiçbir hayvanda seropozitiflik tespit edilmedi ancak challenge sonrası ELISA ve SNT ile belirli günlerde nötralizan antikorlar tespit edildi. Serum antikor titreleri, lezyonların yoğun olduğu aşı sığırlarda daha yüksek olduğu tespit edildi. Aşılanmayan kontrol hayvanlarında (D grubu) serum antikor titrelerinin 21. günden sonra artmaya başladığı saptandı. CaPV antikorları, klinik belirtilerin başlamasından sonra 2. günden itibaren tespit edilebildiği ancak titrede anlamlı bir artışın genellikle 21-42. günlerde görüldüğü bildirilmiştir (OIE Terrestrial Manual, 2017). Aşıya karşı oluşan lokal yanıtın, genellikle iyi antikor üretimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Hunter ve Wallace, 2001). Bir çalışmada, interlökin-10 benzeri (IL-10) ve interferon gama reseptörü benzeri (IFN- γ) genler çıkarılan virulent LSD saha izolatlarından türetilen aşılardan uygulanmasından sonra deri lezyonlarının meydana geldiği ve nötralizan antikorların tespit edildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada LSD Neethling suşu aşılamasından sonra sığırlarda nötralizan antikor gelişiminin tespit

edilemediği bildirilmiştir (Kara ve ark. 2018). LSDV aşılılarıyla aşılanan hayvanlarda az sayıda antikör oluşması ya da hiç antikör saptanmamasına rağmen, koruyuculuğun devam ettiği bazı çalışmalarda da bildirilmiştir (Hunter ve Wallace 2001; Kara ve ark.,2018). Bu çalışmada Penpox-M aşısının 5 dozu ile aşılana grup C’de aşılama sonrası herhangi bir nötralizan antikör tespit edilmemesine rağmen challenge çalışması ile hayvanların LSD’ye karşı bağışık olduğu belirlenmesi, belirtilen çalışmalarla da uyumluluk göstermektedir.

Bu çalışmada serolojik olarak 10 adet sığıra ait toplam 90 adet serum örneği incelenmiştir. ELISA testi ile SNT sonuçlarına göre 89 örneğin paralellik gösterdiği belirlenirken, 1 adet serum örneği ELISA testinde negatif olmasına rağmen, SNT’de pozitif bulunmuştur. SNT’nin gold standart bir yöntem olduğu bilinmektedir. Bazı çalışmalarda ELISA’nın SNT ile benzer sonuçlar verdiğini ancak SNT’nin ELISA’ya göre daha spesifik bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Babiuk ve ark., 2009). Farklı çalışmalarda gözlemlendiği gibi, düşük ya da yüksek dozlarda virulent LSDV izolatları ile inokulasyonu takiben, hayvanlarda gözlemlenen bağışıklık tepkilerinde değişkenlik çok farklı olduğundan daha büyük örnek büyüklükleri dikkate alınması gerektiği bildirilmiştir (Carn ve Kitching, 1995a; Kitching, 2003; Wallace ve Viljoen, 2005). Bu çalışma ile bağışıklık ve serolojik testlerin karşılaştırılmasının daha geniş çaplı çalışmalarla mümkün olacağı anlaşılmıştır.

Challenge çalışmasının tamamlanmasının ardından hayvanlara ötenazi uygulanarak nekropsi yapıldı. Nekropsi sonrası makroskopik olarak inokulasyon bölgesi deri altı dokusunda ödem görüldü. Real time PCR incelemesinde aşıli hayvanlardan alınan doku ve organ örneklerinde LSDV’ye ait nükleik asit tespit edilmedi ve her iki aşının challenge virusunun vücutta yayılımına engel olduğu belirlendi. D grubunda bulunan aşılammış D-1’e ait kıl kökü ve deri svap örneğinde LSD virus nükleik asidi tespit edildi. Her iki örnek inokulasyon bölgesi haricinde alınması sebebiyle challenge sonrası lezyon gelişen bu hayvanın LSDV’yi deri dokusunda bulundurduğu tespit edildi. Yapılan çalışmalarda da LSDV’nin kıl folikülü epitellerinde replike olduğu bildirilmiştir (Babiuk ve ark., 2008b; Awadin ve ark., 2011).

Yapılan bu çalışmada sığır orijinli MDBK hücre hattına adapte olup aşı olarak vücuda enjekte edilecek canlı, attenuue koyun çiçek aşı virusunun sığırdan daha kolay çoğalıp daha iyi bağışıklık oluşturması beklenirken, MDBK hücre kültüründe üretimi sırasında immunojenitesinde azalma meydana geldiği tespit edildi ve hedef hayvan

türünde istenilen bağışıklığı sağlamadığı belirlendi. Primer kuzu böbrek hücre kültüründe üretilen Bakırköy koyun keçi çiçek aşısı ise sığırlarda LSD'ye karşı tam olarak bağışıklık sağladığı tespit edildi. LSD'ye karşı kullanılan canlı viral aşılar hücre kültürü (Davies ve Mbugwa, 1985) ya da embriyolu yumurtada (Van rooyen, 1969) çok sayıda pasaj uygulanarak attenue olmaktadır. Yapılan bu çalışma canlı viral aşuların üretiminin yapılacağı hücre hattının gerek immunojenite, gerekse attenuasyon üzerinde önemli etkisi olduğunu göstermektedir.

SONUÇ VE ÖNERİ

- MDBK hücre kültüründe yapılan 5 pasajın koyun çiçek aşısı virusu genomu üzerinde nasıl bir değişikliğe sebebiyet verdiği çalışmalarla ortaya konmalıdır. Hücre kültürlerinde seri pasajlamalarla yapılan aşısı virusu attenüasyonunun, virus genomunda meydana getirdiği değişikliğin ortaya konması ileride yapılacak olan aşısı çalışmalarına da ışık tutacaktır.

- Koyun çiçek aşısı virusunun 60. pasajdan daha düşük pasajlarda MDBK hücre kültürüne adapte edilerek sığırlarda bağışıklığı araştırılabilir.

- CaPV aşısı ile oluşan hücresel immün yanıt ile ilgili de detaylı araştırılma yapılabilir.

Sonuç olarak bu çalışma ile koyun keçi çiçek aşısının MDBK hücre hattında üretilebilmesine rağmen, sığırlarda LSD'ye karşı tam olarak koruma sağlamasa da virus saçılımına engel olduğu, Penpox-M ticari adlı koyun keçi çiçek aşısının ise sığırlarda LSD'ye karşı koruduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abutarbush, S.M., Ababneh. M.M., Al Zoubil, I.G., Al Sheyab, O.M., Al Zoubi, M.G., Alekish, M.O. ve Al Gharabat, R.J. (2013). Lumpy Skin Disease in Jordan: Disease Emergence, Clinical Signs, Complications and Preliminary-associated Economic Losses. *Transboundary and Emerging Diseases*, **62**, 549-554.
- Abutarbush, S.M. ve Tuppurainen, E.S. (2018). Serological and clinical evaluation of the Yugoslavian RM65 sheep pox strain vaccine use in cattle against lumpy skin disease. *Transboundary and Emerging Diseases*, **65**, 1657-1663.
- Al Salihi, K.A., Hassan, I.Q. (2015). Lumpy Skin Disease in Iraq: Study of the Disease Emergence. *Transboundary and Emerging Diseases*, **62**, 457-462.
- Annandale, C.H., Irons, P.C., Bagla, V.P., Osuagwuh, U.I., Venter, E.H. (2010). Sites of persistence of lumpy skin disease virus in the genital tract of experimentally infected bulls. *Reprod. Domest. Anim.*, **45**, 250-255.
- Awadin, W., Hussein, H., Elseady, Y., Babiuk, S. ve Furuoka, H. (2011). Detection of lumpy skin disease virus antigen and genomic DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from an Egyptian outbreak in 2006. *Transboundary and Emerging Diseases*. **58**, 451-457.
- Babiuk, S., Parkyn, G., Copps, J., Larence, J.E., Sabara, M.I., Bowden, T.R., Boyle, D.B. ve Kitching, R.P. (2007). Evaluation of an ovine testis cell line (OA3.Ts) for propagation of capripoxvirus isolates and development of an immunostaining technique for viral plaque visualization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **19**, 486-491.
- Babiuk, S., Bowden, T.R., Boyle, D.B., Wallace, D.B. ve Kitching, R.P. (2008a). Capripoxviruses: an emerging worldwide threat to sheep, goats and cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, **55**, 263-272.
- Babiuk, S., Bowden, T.R., Parkyn, G., Dalman, B., Manning, L., Neufeld, J., Embury-Hyatt, C., Copps, J. ve Boyle, D.B. (2008b). Quantification of lumpy skin disease virus following experimental infection in cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, **55**, 299-307.
- Babiuk, S., Wallace, D.B., Smith, S.J., Bowden, T.R., Dalman, B., Parkyn, G., Copps, J. ve Boyle, D.B. (2009). Detection of antibodies against Capripoxviruses using an

- inactivated Sheeppox virus ELISA. *Transboundary and Emerging Diseases*, **56**, 132-141.
- Babiuk, S. ve Kitching, P.R. (2011). Capripoxvirus. İçinde Tidona, C. ve Darai, G. (Ed.). *Springer Index of Viruses* (2 edition). New York, ABD: Springer, 1459.
- Bagla V.P., Osuagwuh U.I., Annandale C.H., Irons P.C. ve Venter E.H. (2006). Elimination of toxicity and enhanced detection of lumpy skin disease virus on cell culture from experimentally infected bovine semen samples. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **73**, 263-268.
- Barnard, B., Munz, E., Dumbell, K. ve Prozesky, L. (1994). Lumpy skin disease. *Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa*, **1**, 604-612.
- Ben Gera, J., Klement, E., Khinich, E., Stram, Y. ve Shpigel, N.Y. (2015) Comparison of the efficacy of Neethling lumpy skin disease virus and x 10RM65 sheep-pox live attenuated vaccines for the prevention of lumpy skin disease - The results of a randomized controlled field study. *Vaccine*, **33**, 4837-4842.
- Bhanot, V., Balamurugan, V., Bhanuprakash, V., Venkatesan, G., Sen, A., Yadav, V., Yogisharadhy, R. and Singh, RK. (2009). Expression of P32 protein of goatpox virus in *Pichia pastoris* and its potential use as a diagnostic antigen in ELISA. *Journal of Virological Methods*, **162**, 251-257.
- Bowden, T.R., Babiuk, S.L., Parkyn, G.R., Copps J.S. ve Boyle D.B. (2008). Capripox virus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology*, **371**, 380–393.
- Brenner, J., Haimovitz, M., Oron, E., Stram, Y., Fridgut O.B.V., Kuznetzova L., Oved Z., Wasserman, A., Garazzi, S., Perl, S., Lahav, D., Edery, N. ve Yadin H. (2006). Lumpy Skin Disease in a large dairy herd in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, **61**, 3-4.
- Brenner, J., Bellaiche, M., Gross, E., Elad, D., Oved, Z., Haimovitz, M., Wasserman, A., Friedgut, O., Stram, Y., Bumbarov, V. ve Yadin, H., (2009). Appearance of skin lesions in cattle populations vaccinated against lumpy skin disease: statutory challenge. *Vaccine*, **27**, 1500-1503.
- Buller, R.M., Arif, B.M., Black, D.N., Dumbell, K.R., Esposito, J.J., Lefkowitz, E.J., McFadden, G., Moss, B., Mercer, A.A., Moyer, R.W., Skinner, M.A. Tripathy, D.N. (2005). Poxviridae. İçinde *Virus Taxonomy Viruses* (C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J.

- Maniloff, U. Desselberger & L.A. Ball, (Ed.), *Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Oxford: Elsevier Academic Press; 117-133.
- Bumbarow V. (2016). Detection and isolation of Bluetongue virus from commercial vaccine batches. *Vaccine*, **34**, 3317-3323
- Carn, V.M. (1993). Control of capripoxvirus infections., *Vaccine*, 11(13), 1275-1279
- Carn, V.M. ve Kitching, R.P. (1995a). An investigation of possible routes of transmission of lumpy skin disease virus (Neethling). *Epidemiol. Infect.*, **114**, 219-226.
- Carn, V.M. ve Kitching, R.P. (1995b). The clinical response of cattle experimentally infected with lumpy skin disease (Neethling) virus. *Arch.Virol.* **140**, 503-513.
- Chaudhary SS., Pandey KD., Singh RP., Verma PC. ve Gupta PK. (2009). A vero cell derived combined vaccine against sheep pox and Peste des Petits ruminants for sheep. *Vaccine*. **27**, 2548-2553.
- Chifney, S.T., Martin, W.B., Ergin, H. ve Köylü, A. (1973). Factors associated with the production of attenuated sheep pox vaccines. *Res Vet Sci.*, **14(1)**, 62-68.
- Chihota, C.M., Rennie L.F., Kitching, R.P. ve Mellor, P.S. (2001). Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Epidemiol. Infect.* **126**, 317-321.
- Chihota, C.M., Rennie, L.F., Kitching R.P. ve Mellor P.S. (2003). Attempted mechanical transmission of lumpy skin disease virus by biting insects. *Med. Vet. Entomol.*, **17(3)**, 294-300.
- Coetzer, J.A.W. (2004). Lumpy skin disease, İçinde Coetzer, J.A.W. ve Tustin, R.C. (Ed.). *Infectious diseases of livestock*. Cape Town: Oxford University Press Southern Africa, **2**, 1268-1276.
- Das, A., Babiuk, S. ve McIntosh, M.T. (2012). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of capripoxviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, **50**, 1613-1620.
- Davies, F.G. ve Otema, C. (1981). Relationships of capripox viruses found in Kenya with two Middle Eastern strains and some orthopox viruses. *Res Vet Sci.*, **31(2)**, 253-255.
- Davies, F.G. ve Mbugwa, G. (1985). The alterations in pathogenicity and immunogenicity of a Kenya sheep and goat pox virus on serial passage in bovine foetal muscle cell cultures. *J. Comp. Pathol.* **95**, 565-572.

- Davies, F.G. (1991a). Lumpy skin disease of cattle: A growing problem in Africa and the Near East. *World Animal Review*, **68**, 37 – 42.
- Davies, F.G. (1991b). Lumpy skin disease, an African Capripoxvirus disease of cattle. *Br. Vet. J.*, **147(6)**, 489-503.
- EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2014. Scientific Opinion on sheep and goat pox. *EFSA Journal* 12(11), 3885.
- European Food and Safety Agency (EFSA) (2015). Scientific opinion on lumpy skin disease. *EFSA Journal*. **13(1)**, 3986.
- Gari, G., Biteau-Coroller, F., LeGoff, C., Caufour, P. and Roger, F. (2008). Evaluation of indirect fluorescent antibody test (IFAT) for the diagnosis and screening of lumpy skin disease using Bayesian method. *Veterinary Microbiology*, **129**, 269-280.
- Gelaye, E., Lamien, C.E., Silber, R., Tuppurainen, E.S., Grabherr, R. ve Diallo, A. (2013). Development of a cost-effective method for capripoxvirus genotyping using snapback primer and dsDNA intercalating dye. *PLoS One*, **8**, e75971.
- Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü (GKGM) Hayvan hastalıkları ile mücadele ve hayvan hareketleri kontrolü genelgesi (2018/02). (Erişim 14.11.2018) <https://kms.kaysis.gov.tr/Home/Goster/141352>.
- Giangaspero, M. (2013). Pestivirus Species Potential Adventitious Contaminants of Biological Products. *Trop Med Surg* **1**, 153.
- Greth, A., Gourreau, J.M., Vassart, M., Nguyen Ba, Vy., Wyers, M. ve Lefevre, P.C. (1992). Capripoxvirus disease in an Arabian oryx (*Oryx leucoryx*) from Saudi Arabia. *J. Wildl. Dis.* **28(2)**:295–300, 1992.
- Gülyaz V. (2003). Koyun keçi çiçek aşısının Vero hücre kültüründe üretimi ve bağışıklık çalışmaları, Doktora Tezi, *İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü*.
- Hazıroğlu, R. ve Milli, Ü. (2001). *Veteriner Patoloji*. Malatya: Medipres yayıncılık.
- Hunter, P. ve Wallace, D. (2001). Lumpy skin disease in Southern Africa: A review of the disease and aspects of control. *Journal of the South African Veterinary Association*, **72**, 68-71.
- Irons, P.C., Tuppurainen, E.S.M., ve Venter, E.H. (2005). Excretion of lumpy skin disease virus in bull semen. *Theriogenology*, **63(5)**, 1290-1297.
- Joshi, R.K., Garg, S.K., Chandra, R. ve Sharma, V.D. (1995). Growth and cytopathogenicity of goat pox virus in MDBK cell line. *Indian Journal of Virology*, **11**, 31–33.

- Kara, P.D., Mather, A.S., Pretorius, A., Chetty, T., Babiuk, S. ve Wallace, D.B. (2018). Characterisation of putative immunomodulatory gene knockouts of lumpy skin disease virus in cattle towards an improved vaccine. *Vaccine*, **36(31)**, 4708-4715.
- Katsoulos, P.D., Chaintoutis, S.C., Dovas, C.I., Polizopoulou, Z.S., Brellou, G.D., Agianniotaki, E.I., Tasioudi, K.E., Chondrokouki, E., Papadopoulos, O., Karatzias, H. ve Boscos, C. (2018) Investigation on the incidence of adverse reactions, viraemia and heamatological changes following field immunization of cattle using a live attenuated vaccine against lumpy skin disease. *Transboundary and Emerging Diseases*, **65**, 174-185.
- Knipe, D.M. ve Howley, P.M. (2007). *Fields Virology* (Fifth Edition). ABD: Lippincott Williams & Wilkins
- Kitching, R.P. (1983). Progress towards sheep and goat pox vaccines. *Vaccine*, **1**, 4-9.
- Kitching, R.P. ve Taylor, W.P. (1985). Clinical and antigenic relationship between isolates of sheep and goat pox viruses. *Tropical Animal Health and Production*, **17**, 64-74.
- Kitching, R.P. (1986). The control of sheep and goat pox. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. des Epizoot.*, **5** (2), 503-511.
- Kitching, R.P. ve Mellor, P.S. (1986). Insect transmission of Capripoxvirus. *Res. Vet. Sci.*, **40**, 255-258.
- Kitching, R.P. ve Smale, C. (1986). Comparison of the external dimensions of capripoxvirus isolates. *Res Vet Sci.*, **41(3)**, 425-427.
- Kitching, R.P., Hammond, J.M. ve Black D.N. (1986). Studies on the major common precipitating antigen of capripoxvirus. *The Journal of general virology*, **67**, 139-148.
- Kitching, R.P. ve Hammond J.M. (1992). Poxvirus, infection and immunity. İçinde *Encyclopaedia of immunology*, (Eds Roitt, I. M. and Delves), London: Academic press 1261- 1264.
- Kitching, RP. (2003). Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox. *Dev Biol (Basel)*, **114**, 161–167.
- Kulshreshtha, A.K., Pathak, P.N., Moghe, M.N. ve Tanwani S.K. (1991). Studies on comparative efficacy of different sheep pox viruses as vaccines. *Indian Veterinary Journal*, **68**, 506-509.
- Lamien, C.E., Lelenta, M., Goger, W., Silber, R., Tuppurainen E., Matijevic, M., Luckins, A.G. ve Diallo, A. (2011a). Real time PCR method for simultaneous

- detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses. *Journal of Virological Methods*, **171**, 134-140.
- Lamien, C.E., Le Goff, C., Silber, R., Wallace, D.B., Gulyaz, V., Tuppurainen, E., Madani, H., Caufour, P., Adam, T., El Harrak, M., Luckins, A.G., Albina, E. ve Diallo A. (2011b). Use of the Capripoxvirus homologue of Vaccinia virus 30 kDa RNA polymerase subunit (RPO30) gene as a novel diagnostic and genotyping target: development of a classical PCR method to differentiate Goat poxvirus from Sheep poxvirus. *Veterinary Microbiology*, **149**, 30-39.
- Lubinga, J.C., Tuppurainen E.S.M., Mahlare, R., Coetzer, J.A.W., Stoltsz, W.H. ve Venter E.H. (2012). Evidence of Transstadial and mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Amblyomma hebraeum* ticks. *Transboundary and Emerging Diseases*, **62**, 174-182.
- Maclachlan, N.J. ve Dubovi, E.J. (Ed.). (2011). *Fenner's Veterinary Virology*. (Fourth Edition). Burlington, ABD: Academic Press.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A. ve Maguire, D. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology*. (2.Ed.). Edinburgh, UK: Elsevier Health Sciences, 580.
- Mangana-Vougiouka, O., Markoulatos, P., Koptopoulos, G., Nomikou, K., Bakandritsos, N. ve Papadopoulos, P. (2000). Sheep poxvirus identification from clinical specimens by PCR, cell culture, immunofluorescence and agar gel immunoprecipitation assay. *Molecular and Cellular Probes*, **14**, 305-310.
- Mellor, P.S., Kitching, R.P. ve Wilkinson, P.J. (1987). Mechanical transmission of Capripoxvirus and African swine fever virus by *Stomoxys calcitrans*. *Res. Vet. Sci.*, **43(1)**, 109-112.
- Mercer, A.A. (Ed.). (2007). *Poxviruses*. Basel CH: Birkhauser.
- Mercier, A., Arsevska, E., Bournez, L., Bronner, A., Calavas, D., Cauchard, J., Falala, S., Caufour, P., Tisseuil, C., Lefrançois, T. ve Lancelot, R. (2017). Spread rate of lumpy skin disease in the Balkans, 2015-2016. *Transboundary and Emerging Diseases*, **65**, 240-243.
- Murray, L., Edwards, L., Tuppurainen, E.S., Bachanek, B.K., Oura, C.A., Mioulet, V. ve King, D.P. (2013). Detection of capripoxvirus DNA using a novel loop-mediated isothermal amplification assay. *BMC veterinary research*, **9**, 90.

- OIE (Office International des Epizooties) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. (2017).
- Osuagwuh, U.I., Bagla, V., Venter, E.H., Annandale, C.H. ve Irons, P.C. (2007). Absence of lumpy skin disease virus in semen of vaccinated bulls following vaccination and subsequent experimental infection. *Vaccine*, **25(12)**, 2238-2243.
- Pandey, K.D., Rai, A., Goel, A.C., Mishra, S.C. ve Gupta, B.K. (1985). Adaptation and growth cycle of sheep pox virus in MDBK cell line. *Indian Journal of Virology*, **1**, 133-138.
- ProMED-mail. Lumpy skin disease, bovine - Turkey (KM). ProMED-mail 2013; 31 Ağus: 20130831.1915595. <<http://www.promedmail.org>>. Erişim: 01.12.2018.
- ProMED-mail. Lumpy skin disease, bovine - Azerbaijan (BS, CL). ProMED-mail 2014; 17 Tem: 20140719.2621294. <<http://www.promedmail.org>>. Erişim: 01.12.2018.
- ProMED-mail. Lumpy skin disease, bovine - Kuwait (JA). ProMED-mail 2015a; 05 Ocak: 20150105.3072591. <<http://www.promedmail.org>>. Erişim: 01.12.2018.
- ProMED-mail. Lumpy skin disease, bovine - Saudi Arabia (SH). ProMED-mail 2015b; 30 Nis: 20150430.3333997. <<http://www.promedmail.org>>. Erişim: 01.12.2018.
- ProMED-mail. Lumpy skin disease, bovine - Greece (MH). ProMED-mail 2015c; 21 Ağus: 20150821.3594203. <<http://www.promedmail.org>>. Erişim: 01.12.2018.
- ProMED-mail. Lumpy skin disease, bovine – Russia (DA). ProMED-mail 2015d; 03 Eyl: 20150904.3622855. <<http://www.promedmail.org>>. Erişim: 01.12.2018.
- ProMED-mail. Lumpy skin disease, bovine - Russia (02) (CN). ProMED-mail 2015e; 03 Eyl: 20150921.3659823. <<http://www.promedmail.org>>. Erişim: 01.12.2018.
- Sadri, R., Masoudi, S., Kargar, R., Khedmati, K., Varshovi, H. ve Haghghi, S. (2002). A single radial haemolysis technique for rapid diagnosis of goat pox diseases. *Archives of Razi Institute*, **54**, 93-99.
- Saraç, F., Gülyaz, V., Satır E., Uzar, S. ve Sayı, O. (2017). Lumpy Skin Disease: Situation, surveillance and control activities in Turkey. *FAO Empres Animal Health* **360**, **47**,12-15.
- Stubbs. S., Oura, C.A., Henstock, M., Bowden, T.R., King, D.P. ve Tuppurainen, E.S. (2012). Validation of a high-throughput real-time polymerase chain reaction assay for the detection of capripoxviral DNA. *Journal of Virological Methods*, **179**, 419-422.

- Tasioudi, K.E, Antoniou S.E, Iliadou, P., Sachpatzidis, A., Plevraki, E., Agianniotaki, E.I, Fouki, C., Mangana-Vougiouka, O. ve Chondrokouki E, D.C. (2016). Emergence of lumpy skin disease in Greece. *Transboundary and Emerging Diseases*, **63**, 260-265.
- Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Kutish G.F. ve Rock D.L. (2001). Genome of lumpy skin disease virus. *J. Virol.*, **75**, 7122-7130.
- Tulman, E.R., Afonso, C.L., Lu, Z., Zsak, L., Sur, J.H., Sandybaev, N.T., Kerembekova, U.Z., Zaitsev, V.L., Kutish, G.F. ve Rock, D.L. (2002). The genomes of sheeppox and goatpox viruses. *J. Virol.*, **76 (12)**, 6054-6061.
- Tuppurainen, E.S., Venter, E.H., ve Coetzer, J.A.W. (2005). The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **72**, 153-164.
- Tuppurainen, E.S., Stoltz, W.H., Troskie, M., Wallace, D.B., Oura, C.A.L., Mellor, P.S., Coetzer, J.A.W. ve Venter, E.H. (2011). A potential role for Ixodid (Hard) tick vectors in the transmission of Lumpy Skin Disease Virus in cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, **58**, 93–104.
- Tuppurainen, E.S., Lubinga, J.C., Stoltz, W.H., Troskie, M., Carpenter, S.T., Coetzer, J.A.W., Venter E.H. ve Oura C.A.L. (2012). Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Rhipicephalus appendiculatus* male ticks. *Epidemiol. Infect.*, **141(2)**, 425-430.
- Tuppurainen, E.S. ve Oura, C.A. (2012). Review: lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the Middle East and Asia. *Transboundary and Emerging Diseases*, **59**, 40-48.
- Tuppurainen, E.S., Pearson, C.R., Bachanek-Bankowska, K., Knowles, N.J., Amareen, S., Frost, L., Henstock, M.R., Lamien, C.E., Diallo, A. ve Mertens, P.P. (2014). Characterization of sheep pox virus vaccine for cattle against lumpy skin disease virus. *Antiviral Res.*, **109**, 1-6.
- Tuppurainen, E.S. ve Galon, N. (2016). Lumpy Skin Disease: Current situation in Europe and neighbouring regions and necessary control measures to halt the spread in South-East Europe. *OIE 2016 Europe Regional Commission*. Erişim 03.12.2018 http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Publications_%26_Documentation/docs/pdf/TT/2016_EUR2_Tuppurainen_A.pdf

- Tuppurainen, E.S., Alexandrov, T. ve Beltrán-Alcrudo, D. (2017). Lumpy skin disease field manual – A manual for veterinarians. *FAO Animal Production and Health Manual No. 20*. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Tuppurainen E.S., Babiuk, S. ve Klement E. (Ed.). (2018). *Lumpy Skin Disease*. Cham,Ch: Springer International Publishing.
- Uzar, S., Enul, H., Sarac, F., Satır, E., Parmaksız, A. ve Colak, G. (2018). The safety and innocuity study of sheep and goat pox vaccine in cattle. *2nd International Congress of Veterinary Microbiology*. Poster Presentation. 16-19 October 2018, Antalya.
- Üretim Protokolü, Koyun Keçi Çiçek Aşısı (2016). *İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü*.
- Van Rooyen, P. J., Munz, E.K. ve Weiss, K.E. (1969). The optimal conditions for the multiplication of Neethling-type LSDV in embryonated eggs. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **36**, 165-174.
- Venter, E.H. (2014) Lumpy Skin Disease. İçinde Liu D (Ed.). *Manual of Security Sensitive Microbes and Toxins*. New York, ABD: CRC Press Taylor and Francis Group; 639-645.
- Wallace D.B. ve Viljoen, G.J. (2005). Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine*, **23**, 3061–3067.
- Woods, JA. (1988). Lumpy skin disease- a review. *Tropical Animal Health and Production*. **20**, 11-17.
- Yeruham, I., Nir, O., Braverman, Y., Davidson, M., Grinstein, H., Haymovitch, M. ve Zamir, O. (1995). Spread of lumpy skin disease in Israeli dairy herds. *Veterinary Record*, **137**, 91-93.
- Young, E., Basson, P.A., and Weiss, K.E. (1970). Experimental infection of game animals with lumpy skin disease virus (prototype strain Neethling). *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **37**, 79-88.

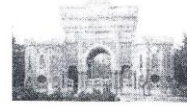
Zhao, Z., Fan, B., Wu, G., Yan, X., Li, Y., Zhou, X., Yue, H., Dai, X., Zhu, H., Tian, B., Li, J. ve Zhang, Q. (2014). Development of loop-mediated isothermal amplification assay for specific and rapid detection of differential goat Pox virus and Sheep Pox virus. *BMC Microbiology*, **14**, 1-10.



ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2015/ 104

28/12/2015

Sayın Prof. Dr. Nuri TURAN
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Karar No 2015/ 104

Başvuru : 22.12.2015

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen, **Doktora Öğrencisi Serdar UZAR**'a ait "Koyun-Keçi Çiçek Aşısının MDBK Hücre Kültüründe Üretilmesi ve Lumpy Skin Disease 'e (LSD) karşı Sığırlarda Bağışıklık Çalışması" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sığır
	Cinsiyeti	Dişi
	Sayısı	18
Proje Başlangıç Bitiş Tarihi	01.01.2016/01.10.2017	

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIK
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Prof. Dr. İlhan İRİTÇİ
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Yard. Doç. Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye

Dr. Burak OLGUN
Mak. Yük. Müh.
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KOYUN KEÇİ ÇİÇEK AŞISININ MDBK HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ÜRETİLMESİ VE LUMPY SKİN DİSEASE'E KARŞI SIĞIRLARDA BAĞIŞIKLIK ÇALIŞMASI

ORJİNALLIK RAPORU

%2	%1	%1	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
2	GÜLYAZ, Veli, SARAÇ, Fahriye, HASÖKSÜZ, Mustafa, ÇAKIROĞLU, Hüseyin and ARSLAN, Zeynel. "Contagious Ecthyma Virusu (ORF) İzolasyonunda FLK-BLV-044 Hücre Kültürünün Kullanılması", Veteriner Merkez Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, 2016. Yayın	<%1
3	PESTİL, Züleyha, GÜLYAZ, Veli and HASÖKSÜZ, Mustafa. "Marmara Bölgesinde Yeni Doğan Buzağı İshallerinde Bovine Coronavirusların Saptanması ve Patojenite Çalışması", Veteriner Merkez Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, 2016. Yayın	<%1
4	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Serdar	Soyadı	Uzar
Doğ.Yeri	Devrek/ZONGULDAK	Doğ.Tar.	12/03/1985
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	10892905116
Email	uzarserdar@gmail.com	Tel	0505 5779152

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	-	
Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2010
Lise	Devrek Anadolu Lisesi	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Laboratuvar Şefi	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü	2018 - ...
2.	Veteriner Hekim	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü	2011 - 2018
3.			

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	68,75	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	76,66	69,79	61,15
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Ms Office	İyi

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):