

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

***CLOSTRIDIUM CHAUVOEI* AŞILARININ POTENSİNİN
BELİRLENMESİNDE ELISA PROSEDÜRÜNÜN
KULLANILMASININ ARAŞTIRILMASI**

DEHA ALİ DENİZ
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-15066 proje numarası ve TAGEM tarafından TAGEM/HSGYAD/17/A05/P01/91 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çerçevesinde Deha Ali DENİZ tarafından hazırlanan “*Clostridium chauvoei* Aşılarının Potensinin Belirlenmesinde ELISA Prosedürünün Kullanılmasının Araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11/09/2018

Üye (Tez Danışmanı):	Prof. Dr. Şükrü KIRKAN	ADÜ
Üye	: Prof. Dr. Mehmet AKAN	AÜ
Üye	: Prof. Dr. Murat YILDIRIM	KÜ
Üye	: Prof. Dr. Cavit KUM	ADÜ
Üye	: Prof. Dr. Serap SAVAŞAN	ADÜ

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca bana bilgi ve tecrübelerini özveriyle aktaran, yetişmemde büyük katkıları olduğuna inandığım değerli Hocam Prof. Dr. Şükrü KIRKAN ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine, tez çalışmamın metodolojisinin oluşturulması, verilerin yorumlanması ve istatistiksel analiz aşamasında bilgi ve deneyimlerini sabırla paylaŐan Veteriner Biyolojik Ürün Kontrolü Bölüm Őefi Dr. Ahmet ARSLAN'a, çalışmam boyunca verilerin elde edilmesi ve laboratuvar çalışmalarındaki değerli katkılarından dolayı Dr. Zahide DİLİK'e, deney hayvanları çalışmamda desteğini esirgemeyen Dr. Nejdet ÇÖVEN'e ve tüm desteklerinden dolayı Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdür'ü Sayın Hasan AKTAR'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. <i>Clostridium chauvoei</i> ve Yanıkara	7
2.2. Epidemiyoloji	9
2.3. <i>Clostridium chauvoei</i> 'nin Patogenezi	10
2.4. <i>Clostridium chauvoei</i> 'nin Antijenik Karakterizasyonu	11
2.4.1. Flagella	11
2.4.2. Toksinler	11
2.4.2.1. Hemolizin	11
2.4.2.2. Beta Toksin	11
2.4.2.3. Gamma Toksin (Hyalüronidazlar).....	12
2.4.2.4. Nöromidaz	12
2.4.3. Hücre Duvarı	12
2.5. Tanı	13
2.6. Tedavi	13
2.7. Koruma	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Gereç	16
3.1.1. Kullanılan Deney Hayvanları	16
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	16
3.1.2.1. Kaplama Solüsyonu	16
3.1.2.2. Tuzlu Fosfat Buffer Solüsyonu (PBS)	16
3.1.2.3. Bloklama Solüsyonu	17

3.1.2.4. Yıkama Solüsyonu	17
3.1.2.5. Stop Solüsyonu	17
3.1.2.6. Kalsiyum Klorit Solüsyonu (%7,5)	17
3.1.2.7. Diğer Kimyasallar	18
3.1.3. Monoklonal, Poliklonal Antikorlar ve Konjugat	18
3.1.3.1. <i>Clostridium chauvoei</i> Flagella-Spesifik Monoklonal Antikor (MAb)	18
3.1.3.2. <i>Clostridium chauvoei</i> Flagella-Spesifik Tavşan Poliklonal Antikor	18
3.1.3.3. Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Konjugat)	18
3.1.4. <i>Clostridium chauvoei</i> Spor Süspansiyonu	18
3.1.5. Kullanılan Cihazlar	19
3.2. Yöntem	19
3.2.1. İş akışı ve Koordinasyon	19
3.2.2. Aşıların Hazırlanması ve Temini	19
3.2.3. Kobaylarda <i>Clostridium chauvoei</i> Epruvasyon testi	21
3.2.3.1. <i>Clostridium chauvoei</i> Epruvasyon Testi Prosedürleri	21
3.2.4. Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi (ELISA)	22
3.2.4.1. Bakterinlerin ELISA Testi İçin Hazırlanması ve Antijen Elüsyon İşlemi	22
3.2.4.1.1. Alüminyum adjuvantlı bakterinler için	23
3.2.4.1.1.1. Sodyum sitratla yıkama	23
3.2.4.1.1.2. Fosfat buffer ile yıkama.....	23
3.2.4.1.2. Yağlı adjuvantlı bakterinler için	23
3.2.4.2. ELISA Testinin Yapılışı	23
3.2.5. Referans Aşının Oluşturulması	26
3.2.6. Test Sonuçlarının İstatistikî Hesaplanması ve Yorumlanması	26
4. BULGULAR	27
4.1. Kobay Epruvasyon Testi Bulguları	27
4.2. ELISA Bulguları	29
4.3. Pre-validasyon Verileri	34
4.3.1. Sensivite (Duyarlılık)	34
4.3.2. Spesifite (Özgüllük)	34
4.3.3. Relatif Doğruluk (Efektiflik)	34
4.3.4. Tekrarlanabilirlik	35
4.3.5. Tekrar Üretilirlik	35
5. TARTIŞMA	37

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
7. KAYNAKLAR	48
8. ÖZGEÇMİŞ	55



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AF	: Avrupa Farmakope
APHIS	: Animal and Plant Health Inspection Service
CFR	: Code of Federal Regulations
CV	: Coefficient of Variation
CVB	: Center for Veterinary Biologics
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
ECVAM	: European Centre for the Validation of Alternative Methods
ELISA	: Enzime Bağlı İmmünosorban Yöntem
EDQM	: The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare
FAVN	: The Fluorescent Antibody Virus Neutralization
FAO	: The Food and Agriculture Organization
FDA	: Food and Drug Administration
GKGM	: Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü
HIM	: Hemaglütinasyon İnhibisyon Metodu
IgG	: İmmunglobulin G
LD₅₀	: Letal Doz 50
MAb	: Monoklonal Antikor
NIH	: National Institutes of Health
OD	: Optik Dansite
OIE	: World Organisation for Animal Health
OMCL	: Official Medicines Control Laboratory
PCR	: Polymerase chain reaction
PD₅₀	: Protektif Doz 50
RFFIT	: Rapid Fluorescent Focus İnhibition Test
RPM	: Revenue Per Mille
RNA	: Ribo Nükleik Asit
RP	: Relatif Potens
RSD	: Relative Standard Deviation
SAM	: Spatial Analysis Method

TMB	: Tetrametilbenzidin Substratı
TNT	: Toksin Nötralizasyon Testi
ToBI	: Toxin-binding İnhibition Test
USDA	: The United States Department of Agriculture
WHO	: World Health Organization



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Yanıkara patogenezi	10
Şekil 2. <i>Clostridium chauvoei</i> epruvasyon testi	21
Şekil 3. İndirekt double sandviç ELISA test prosedürü	22
Şekil 4. İki katlı seri dilüsyon yapılışı	24
Şekil 5. Referans aşıya ait grafik	29
Şekil 6. Çalışmada kullanılan aşuların RP değerlerinin dağılımı	31
Şekil 7. Yüksek relatif potense sahip aşıya ait bir grafik	32
Şekil 8. Düşük relatif potense sahip bir aşıya ait grafik	32
Şekil 9. <i>C. chauvoei</i> komponenti içermeyen klostridial aşıya ait grafik	33
Şekil 10. Klostridial komponent içermeyen inaktif bir aşıya ait grafik	33

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Referans ve test örnekleri üzerindeki sonuçları gösteren bir ELISA pleyti 30



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Başlıca <i>Clostridium</i> Türleri	3
Tablo 2. <i>C. chauvoei</i> 'nin biyokimyasal, kültürel ve fizyolojik karakterizasyonu	8
Tablo 3. Çalışmada kullanılan aşılardan içerikleri	20
Tablo 4. Aşıların ve referansın pleyte yerleştirilmesi	25
Tablo 5. <i>C. chauvoei</i> komponenti içeren aşıların Epruvasyon ve ELISA test sonuçları	28
Tablo 6. ELISA testi doğru ve yanlış cevap dağılımı	34
Tablo 7. ELISA prosedüründe pleyt içi OD varyasyon katsayısı	35
Tablo 8. <i>C. chauvoei</i> ELISA metodunun tekrarlı ölçümlerindeki varyasyon katsayısı	36



ÖZET

***CLOSTRIDIUM CHAUVOEI* AŞILARININ POTENSİNİN BELİRLENMESİNDE ELISA PROSEDÜRÜNÜN KULLANILMASININ ARAŞTIRILMASI**

**Deniz D.A. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji Programı Doktora Tezi, Aydın, 2018.**

Günümüzde *Clostridium chauvoei* içeren veteriner bakterin aşılarının potens testleri; aşı ile immunize edilmiş kobaylara patojen *C. chauvoei* suşunun verilerek kontrol edilmesi prensibine dayanmaktadır. *C. chauvoei* epruvasyon testinde, in vivo test prensibine dayanması, çok fazla miktarda deney hayvanı kullanıma ihtiyaç duyulması, hayvanların bireysel duyarlılık, direnç ya da kondisyonlarına göre sonuçların değişkenlik göstermesi, tekrar edilebilmesinin güçlüğü, test süresinin uzunluğu, test sonuçlarının değerlendirilmesinin hayvanlardaki letalite ya da spesifik semptomlara dayalı olması ve hayvan refahı yönünden uygun bulunmaması nedeniyle in vitro alternatif testler önem kazanmaya başlamıştır. Araştırmamızda, *C. chauvoei* içeren aşılarda potens testlerinde kullanılmakta olan epruvasyon testine alternatif olarak bir ELISA prosedürünün uygulanabilirliğinin araştırılması hedeflenmiştir. Araştırma materyalini 15 adet *C. chauvoei* komponenti içeren ve olası yalancı reaksiyonların tespiti için 5 adet bu komponenti içermeyen farklı marka ve serilerde 20 adet aşı oluşturmaktadır. Araştırmamızda, Yanıkara aşılarının kontrolünde standart metot olan kobay epruvasyon testinde, tüm *C. chauvoei* içeren aşılarda geçme kriterlerini karşıladığı, bu komponentin bulunmadığı aşılarda ise herhangi bir koruyucu vasıf sergilemediği gözlenmiştir. *C. chauvoei* bulunan aşılarda koruyucu yanıt %90 ile %100 arasında (4 adet aşıda %90, 11 adet aşıda %100 koruma) seyretmiştir. Araştırmamızda ELISA yöntemi olarak, indirekt double sandviç ELISA prosedürü kullanılmıştır. *C. chauvoei* komponenti içeren ve epruvasyon testi ile geçer sonuç veren 15 adet aşının 14'ünde relatif potens sonuçlarının kabul kriterine göre dağılımında $RP \geq 1$ bulunmuştur. Kabul limitini karşılayan pozitif aşılarda relatif potens değerleri 1,020 ile 5,438 arasında seyretmiştir. Araştırmamızda kullanılan ELISA prosedürünün sensitivitesi %93,33, spesifitesi %100 ve relatif doğruluk oranı ise %95 olarak bulunmuştur. Araştırmamızda elde edilen sonuçlar doğrultusunda, ELISA metodu ile epruvasyon prosedürleri arasında mukayese edilebilir doğruluk ve kesinlikte sonuçlar alındığı, iki metodun iyi bir korelasyon gösterdiği ve in vitro metot dönüşümünün önemli avantajlara sahip olduğu görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Clostridium chauvoei*, Veteriner aşı, Epruvasyon, ELISA, Relatif Potens

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE USING ELISA PROCEDURE IN DETERMINING TO POTENCY OF *CLOSTRIDIUM CHAUVOEI* VACCINES

Deniz D.A. Aydın Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Department of Microbiology, PhD Thesis, Aydın, 2018

At the present time, potency tests of veterinary bacterin vaccines containing *Clostridium chauvoei* are based on the administration of a pathogenic *C. chauvoei* strain to guinea pigs. Although *C. chauvoei* challenge test is a valid procedure in the control activities aimed to determine the potency of the vaccine; in vitro alternative tests are gaining in importance due to this test being based on an in-vivo test principle as in the control of all other Clostridial vaccines, the need for using too many laboratory animals, change in results according to the individual sensitivities, resistance or condition of laboratory animals, hardships in repeatability, length of the test procedure, the evaluation of the test results being based on specific symptoms or lethality in animals and their unsuitability in terms of animal welfare. In our study, it was aimed to investigate the feasibility of an ELISA procedure as an alternative to the challenge test used in the potency test of *C. chauvoei* containing vaccines. The research material consists of different trademarks and series 20 vaccine, which 15 vaccine included with *C. chauvoei* components and 5 vaccines not included these components for the detection of possible pseudo-reactions. In our study, the guinea-pig challenge test which is the standard method for the control of the Blackleg vaccine examined of investigation of the vaccines. The all of the vaccines containing *C. chauvoei* met the criteria for acceptance and the vaccines without this component did not show any protective qualities. The protective response to vaccines containing *C. chauvoei* was between 90% and 100% (4 vaccine protect 90% and 11 vaccine protect 100%). In our study, indirect double sandwich ELISA procedure was used as a method. It was found to relative potency $RP \geq 1$ in the distribution of relative potency results according to acceptance criteria on the 14 of 15 vaccines which containing *C. chauvoei* component and providing the criteria for passing in the guinea-pig challenge test. Relative potency values ranged from 1,020 to 5,438 in positive vaccines providing the acceptance limit. The sensitivity, specificity and relative accuracy of the ELISA procedure used in our study was found to be respectively 93.33%, 100% and 95%. In the results of our study, it is seen that comparable accuracy and exact results are obtained between the ELISA and challenge procedures, the two methods show good correlation and the in vitro method conversion has significant advantages.

Keywords: *C. chauvoei*, Veterinary Vaccine, Challenge, ELISA, Relative Potency

1. GİRİŞ

Klostridiumlar spor formunda obligat anaerobik bakteriler olup, birçok türü aerobik şartlarda gelişemez ve vejetatif formları oksijenli ortamlarda yaşayamaz. Ancak spor oluşturan türleri, dış etkenlere ve yüksek ısıya dayanıklıdır. Sporları, anaerobik ortamı ve yeterli besin maddelerini buldukları zaman tekrar vejetatif forma geçerler. Klostridiumların genç kültürleri gram pozitiflik gösterir iken kültürleri yaşlandıkça gram negatife dönüşebilmektedir. Klostridiumlar, Gram pozitif, yuvarlak veya sivri uçlu çubuk şeklinde, sporları terminal ve subterminal, peritrik flagellaya sahip (bazı türler) olan bakterilerdir. Ancak *Clostridium piliforme* gram negatif olarak bunların dışında yer almaktadır. (Songer ve Post, 2012; Public Health England, 2015).

Clostridium genusu insan ve hayvanlarda son derece patojeniktir (Public Health England, 2015). Doğada her yerde rastlanan, yaygın besin ve yara kontaminantlarından biri olarak kabul edilen genusun yaklaşık olarak 200 türü bulunmaktadır. Bunların sadece 14'ünün veteriner sahada önemli olduğu bilinmektedir (Markey ve ark, 2013). Vejetatif formları olumsuz koşullar altında (oksijenle temas gibi) kuruma ve ısıya direnç göstermek için endosporlar şekillendirirler. *Clostridium* türleri bu sayede mera ve yaşam alanlarında canlı kalabilmekte, biyogüvenlik tedbirlerine direnç gösterebilmekte ve sağlıklı canlılara kolaylıkla bulaşabilmektedirler (Prescott, 2013). Genel olarak en çok toprakta bulunurlar. Denizlerin dibinde, çürümüş bitki ve hayvanlarda, hayvan artıklarında, lağım sularında *Clostridium* türlerine rastlanabilir (Arda ve ark, 1997).

Klostridial hastalıklar genel olarak iki şekilde etki gösterir; bunların birincisinde vejetatif hücreler ya dokularda lokal birikim yaparak ya da aktif invazyon yoluyla, klinik tablonun oluşmasına (*C. chauvoei*, *C. novyi*) neden olur iken, ikinci yol olarak bakteriyel toksinler (*C. perfringens*, *C. tetani*) vasıtasıyla etkili olmaktadır. Genellikle mekanik zedelenme ile zarar görmüş kas dokusunda *Clostridium* sporlarının germinasyonu sonucu kas nekrozu oluşmaktadır (Songer ve Post, 2012).

Patojen klostridiumların çoğu bir veya daha fazla toksin üretebilirler. Toksinlerin absorpsiyonu ile sistemik intoksikasyon ve akabinde şok ve ölüme giden bir enfeksiyona neden olurlar. Enteretoksemi vakalarının bazılarında, önceden salınan klostridial toksinlerin sindirimi sonucu hastalık olduğundan, intestinal lezyonlar az görülmektedir. Bununla birlikte hastalığı oluşturmaya sebep olan toksin miktarı çok düşük olduğundan immunité sağlanamamakta ve hayvanlarda akut ya da perakut seyreden enfeksiyonlara neden olarak tedavileri güçleştirmektedir (Markey ve ark, 2013; Songer ve Post, 2012; Bonistalli, 2013).

Hayvan patojeni klostridiumlar genellikle nörotoksik, enterik ve histotoksik olarak kategorize edilmektedirler. Ancak bazıları heterojen karakterde olup, etkilenen konak ve sistemlere göre oldukça kozmopolit davranır iken, diğerkleri tek ve iyi bilinen bir sendroma neden olmaktadır. Hayvanlar için önemli olan klostiridial enfeksiyonlar; *C. chauvoei* (Yanıkara), *C. hemolyticum* (Basillar Hemoglobinüri), *C. tetani* (Tetanoz), *C. septicum* (Malignant Ödem, Bradzot), *C. novyi* tip B (Kara Hastalık), *C. perfringens* tip D (Yumuşak Böbrek Hastalığı), *C. perfringens* tip B (Kuzu Dizanterisi), *C. novyi* tip A (Büyük Baş, Malignant Ödem), *C. perfringens* tip C (Buzağı ve Kuzularda Ani Ölüm Hastalığı), *C. sordellii* (Nekrotizan Doku Enfeksiyonu, Abomazitis) ve *C. botulinum* (Botilismus)'dan ileri gelmekte olup, konakçı ve ortaya çıkan enfeksiyona göre başlıca *Clostridium* türleri Tablo 1'de verilmiştir (Songer ve Post, 2012; McVey ve ark, 2013).



Tablo 1. Başlıca *Clostridium* türleri

	<i>CLOSTRIDIUM</i> TÜRLERİ	HASTALIK	KONAKÇI
HISTOTOKSİK	<i>C. chauvoei</i>	Yanıkara	Sığır Koyun Domuz
	<i>C. septicum</i>	Malignant Ödem Bratzot	Sığır Koyun Domuz
	<i>C. novyi Tip A</i>	Büyük Baş Hastalığı Gazlı Gangren	Koyun Sığır
	<i>C. novyi Tip B</i>	Kara Hastalık	Koyun Sığır
	<i>C. haemolyticum</i> (<i>C. novyi Tip D</i>)	Basillar Hemoglobinüri	Koyun Sığır
ENTERİK	<i>C. sordelli</i>	Gazlı Gangren	Koyun Sığır At
	<i>C. perfringens Tip B</i>	Enterotoksemi Kuzu Dizanterisi	Kuzu Buzağı Tay
	<i>C. perfringens Tip C</i>	Nekrotik Enterititis Hemorojik Enterotoksemi	Koyun Kuzu Tay Tavuk Buzağı
	<i>C. perfringens Tip D</i>	Yumuşak Böbrek Hastalığı	Koyun Keçi Buzağı
	<i>C. difficile</i>	İshal, Antibiyotik İlişkili İshal, Psödomembranoz kolit	İnsan
	<i>C. colinum</i>	Bıldırcın Hastalığı	Tavuk Bıldırcın Hindi Keklik
	<i>C. spiroforme</i>	Enterotoksemi	Tavşan ve diğer laboratuvar hayvanları
	<i>C. piliforme</i>	Tyzzler Hastalığı	Tavşan Fare Köpek Tay Buzağı İnsan
NÖROTOKSİK	<i>C. botulinum</i>	Botulismus	Birçok hayvan türü İnsan
	<i>C. tetani</i>	Tetanoz	At Ruminant İnsan ve Diğer hayvanlar

Quinn (1994) ve Songer ve Post (2012)' dan modifiye edilmiştir.

Klostridial enfeksiyonların tedavisinde, genellikle toksine özgü antiserumlar ve antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak hastalığın hızlı seyretmesi teşhis ve tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bu bakımdan klostridial enfeksiyonlar, ülkemiz de dahil olmak üzere tüm dünyada ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Antiserum ve antibiyotiklerin, koruma ve tedavide her zaman yeterli olmaması nedeniyle, hastalıktan korunmada, bakterin toksoid karakterde hazırlanmış inaktif veteriner biyolojik ürünlerle immunizasyon yapılması önem taşımaktadır (Baş ve Alp, 2005; Prescott, 2013). Piyasada (*C. perfringens* Tip A, B, C ve D; *C. chauvoei*; *C. novyi*; *C. septicum*; *C. tetani*; *C. sordellii* ve *C. haemolyticum*) farklı içeriklere ve etkenlere sahip inaktif klostridial aşılar bulunmaktadır. Aşılar, monovalan ya da polivalan olarak hazırlanmaktadır. Aşılama, ürün prospektüsü dikkate alınarak genelde 4-8 hafta ara ile yılda 2 kez yapılmakta ve altı aylık ya da yıllık tek rapel şeklinde devam etmektedir. Damızlık hayvanların doğumdan önce aşılansması doğacak yavrularda pasif bağışıklık oluşturmada oldukça önemlidir (Acar ve Yipel, 2015). Yıllık yaklaşık olarak 40 milyon doz klostridial aşı, ülkemiz pazarına sürülmektedir. Klostridial aşılarn üretim teknolojisi genel olarak; toksin üretimini maksimize edecek şekilde dizayn edilmiş bir fermantasyon prosesidir. Bu amaçla mikroorganizmanın logaritmik proliferasyonu ve toksin oluşumunun indüklenmesi, üreyen kültür ve toksin konsantrasyonun arzu edilen düzeye ulaşmasını takiben canlı hücrelerin öldürülmesi ve toksinin toksoide dönüştürülmesi amacıyla formaldehit ile inaktive edilmesi ve final formülasyon esnasında adjuvantla kombinasyonu prensibine dayanmaktadır (Baş ve Alp, 2005; Bonistalli, 2013).

Aşı, serum gibi veteriner biyolojik ürünlerin hayvanlardaki güvenlik ve etkinliğinin gösterilmesi amacıyla hem üreticiler, hem de yetkili otoriteler tarafından bir dizi kalite kontrol testi uygulanmakta ve genel olarak bu testler; fizikokimyasal parametrelerin kontrolü yanında, sterilite, zararsızlık ve etkinlik testlerini kapsamaktadır. Biyolojik ürünün karakterine göre uygulanacak testler, çeşitli uluslararası monograflarda (Avrupa Farmakope, 9CFR, OIE Manual, İngiliz Farmakope gibi) tanımlanmaktadır (EDQM, 2017b; USDA APHIS, 2017a).

Günümüzde *C. chauvoei* aşılarnın potensinin belirlenmesi kabul edilen test kobay epruvasyon testidir (EDQM, 2017b). Bu test, çok sayıda deney hayvanı kullanımına bağlı bir test olup test sonuçlarının değerlendirilmesi deney hayvanlarındaki letalite ya da spesifik semptomların gözlenmesi prensibine dayanmaktadır. Bu da hayvan refahı açısından etik görülmemektedir. Ayrıca in vivo biyolojik testlerin, canlı hayvanların bireysel kondisyonlarına bağlı olması gerekçesi ile stabil olmaması, değişken sonuçlar verebilmesi ve buna bağlı olarak çok sayıda test tekrarına gereksinim duyulması, yapılan test tekrarlarının iş

gücünü ve test maliyetini yükseltmesi nedeniyle bu tür metotların doğrulanmasının çeşitli zorlukları bulunmaktadır (Romberg ve ark, 2011).

Resmi İlaç Kontrol Laboratuvarları (OMCL) ağı üzerinden organize edilen çalışmalar ile biyolojik ürün kontrolünde alternatif metotlarının geliştirilmesi, uygulamaya konması ve validasyonu konusunda AB içinde çeşitli projeler yürütülmektedir. Bu kapsamda yürütülen çalışmalar dahilinde AB içinde ELISA testleri gibi alternatif metotlar karşılıklı tanıma (Mutual Recognition) prosedürü içinde klostridial aşuların potens testlerinde uluslararası bir test olarak yerini almaya başlamıştır (Romberg ve ark, 2011). Avrupa Farmakopeye korelasyon ve validasyonu gösterilmek kaydıyla biyolojik ürünlerin etkinlik testlerinde immunokimyasal metotların kullanılabileceği belirtilmektedir (EDQM, 2017a; DeHaven, 2003). Ayrıca Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı'na bağlı Hayvan ve Bitki Sağlığı Denetim Servisi de aşı monografların da alternatif prosedürleri yayınlamaya başlamıştır (Ludemann ve Hyde, 2015). Avrupa Alternatif Metotların Validasyonu Merkezi (ECVAM) hayvansal modellere alternatif in vitro metotların doğrulanarak uygulamaya aktarılması konusunda pratik ve alt yapısal gereklilikler açısından 5 temel aşama belirlemiştir. Bunlar, test geliştirme, prevalidasyon, validasyon, bağımsız değerlendirme ve metodun yasal onayı süreçleri olup; bunlardan prevalidasyon adımı, protokol oluşturma, metod transferi ve metod performansının değerlendirilmesi aşamalarını kapsamaktadır (Hendriksen ve ark, 1998). Bu bağlamda alternatif metotların geliştirilmesi ve uygulamaya aktarılmasında metod performansının araştırılması ve doğrulanmasına yönelik araştırma projelerinin önemli olduğu görülmektedir.

Klostridial aşuların potens testlerinde alternatif metotlar olarak; immunize edilmiş hayvanların serum örneklerinde ELISA metotları, hücre kültüründe yapılan serolojik tabanlı çalışmalar ile aşıdaki hücresel ya da flagellar antijen miktarının ölçülmesine yönelik immunokimyasal metotlar kullanılmıştır (Halder, 2001; Hendriksen, 2009; Redhead ve ark, 2011; Romberg ve ark, 2011). Bunlardan serum örnekleri üzerinde uygulanan ELISA teknikleri; testlerde kullanılan hayvan sayısının azaltılması, kolay uygulanabilirliği, hızlı, paralel, tekrarlanabilir ve doğrulanabilir sonuçlar vermesi, daha kesin ve stabil sonuçlar alınması gibi gerekçelerle alternatif metotlar içinde önem kazanmış olmakla birlikte (Romberg ve ark, 2011), doğrudan antijen içeriğinin ölçülmesine dayanan metotlar hayvan deneylerinin tamamen ortadan kaldırılması ve test sürelerinin ciddi oranda kısaltılarak iş gücünün azaltılmasında önemli avantajlar getirmiştir (Kulpa-Eddy ve ark, 2011).

Bu amaçla araştırmamızda, *C. chauvoei* içeren bakterin aşuların potens testinde konvansiyonel patojen kültürle epruvasyon uygulanması yerine, aşının içerdiği antijen

miktarının (flagellar yüzey proteinin) ölçülmesine dayanan bir ELISA prosedürü uygulanarak iki yöntemin karşılaştırmasının yapılması ve *C. chauvoei* aşılarının potensinin belirlenmesinde in vitro ELISA prosedürünün uygulanabilirliğinin araştırılması hedeflenmiştir. Araştırmamız, *C. chauvoei* içeren inaktif veteriner biyolojik ürünlerde flagellar antijen miktarının ölçümüne dayanan bir alternatif prosedürün performansının (doğruluk ve kesinliğinin) değerlendirilmesi açısından önemlidir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Clostridium chauvoei* ve Yanıkara

Arloing, Cornevin ve Thomas, yanıkara hastalığına sebep olan organizmayı 1880 yılında ortaya çıkarmışlardır. *C. chauvoei* adı Fransız Veteriner Auguste Chauveau onuruna verilmiştir (Parte, 2009). *C. chauvoei* gram pozitif, hareketli, obligat anaerop, çubuk şeklinde olup boyutları $0.5-1.7 \times 1.6-9.7$ µm kadardır. Hücre duvarları lizin içerir. Sporları oval şeklinde ve subterminal-subsentral olarak yerleşir. Vejetatif yapısı, hem suda hem de katı ortamda kolayca spor formuna dönüşmektedir. *C. chauvoei* hassas bir bakteri olduğundan üreyebilmeleri için kontrollü anaerobik ortam, sistein ve suda çözünen vitaminlerden zengin bir ortama ihtiyaç duyarlar (Parte, 2009). Katı besi yerinde üreyen koloniler, smooth yapıda (S tipli) görünür ve iki gün içerisinde boyutları 4 mm'ye ulaşır. Kanlı agarda hemoliz varlığı değişkenlik göstermektedir. *C. chauvoei*'e ait biyokimyasal, kültürel ve fizyolojik karakterizasyonlar Tablo 2'de verilmiştir (Parte, 2009).

C. chauvoei sporları liyofilize olarak yıllarca canlı kalabilmektedir. Kaynar suya 2-5 dakika dayanıklıdır. Fenol, alkol ve kватerner amonyum gibi dezenfektanlara karşı dirençlidirler. *C. chauvoei*, duyarlı ve dirençli türlerin bağırsakları, karaciğerleri ve diğer dokularında bulunurlar. Enfeksiyonun patogenezinin de alfa toksin, ödem faktörü, gama toksin (hiyalüronidaz), beta toksin (DNase), delta toksin (oksijen labil hemolozin) ve nöraminidaz etkin rol oynamaktadır (Uzal ve ark, 2016).

Tablo 2. *C. chauvoei* 'nin biyokimyasal, kültürel ve fizyolojik karakterizasyonu

Karakter	Reaksiyon
Motalite	Hareketli (<i>C. perfringens</i> hariç)
H ₂ üretimi	+
İndol üretimi	-
Lesitinaz üretimi	-
Lipaz üretimi	-
Eskulin hidrolizi	+
Nişasta hidrolizi	-
Nitrat indigenmesi	d
<u>Asit Üretimi;</u>	
Amigdalın	-
Arabinoz	-
Fruktoz	z/-
Galaktoz	z/+
Glikojen	-
İnülin	-
Laktoz	z/+
Maltoz	z/+
Mannitol	-
Mannoz	z/+
Melesitoz	-
Melibiyoz	-
Rafinoz	-
Ramnoz	-
Riboz	+
Salisin	-
Sorbitol	-
Sükroz	z/+
Trihaloz	-
Ksiloz	-
Et sindirimi	-

z: zayıf d: değişken

Parte ve ark. (2009)' den modifiye edilmiştir.

2.2. Epidemiyoloji

Histotoksik klostridialar grubuna dahil olan *C. chauvoei*, 1950'lerden bu yana yarım asırı aşkın bir süredir dört farklı kıtada izole edilmiş bir bakteridir. *C. chauvoei*'nin neden olduğu yanıkara enfeksiyonuna sığır, koyun, keçi, domuz, geyik, mink, tatlısu balığı, balinalar ve kurbağalar duyarlı iken insanlar, kuşlar, kediler, köpekler (köpek ve kedi yaralarından izole edilmelerine rağmen) ve tavşanlar dirençlidir (Parte, 2009). Hastalık çoğunlukla ruminantlarda, nadiren diğer evcil hayvanlarda görülmektedir. Sığırlarda bu hastalığın görülme sıklığı, 9 ay ve 2 yaş arasında yüksek, 6-9 ay ve 2-3 yaş aralığında biraz azalmakta ve 3 yaş üzerinde daha düşük olmaktadır. Hastalık özellikle yaz mevsiminde hayvanların meralarda otlatıldığı zamanlarda görülmektedir. Hastalığın görülmesi çoğunlukla nemli meralar ve mikroorganizmanın hızlı çoğalması ile ilişkilidir, fakat aynı zamanda bazı kurak otlak alanlarında da problem oluşturmaktadır. Bulaşma sporların genelde sindirim yolu, bazen de deri yolu ile alınması sonucu meydana gelmektedir (Useh ve ark, 2006b; Cooper BJ ve ark, 2016; Abreu ve ark, 2017).

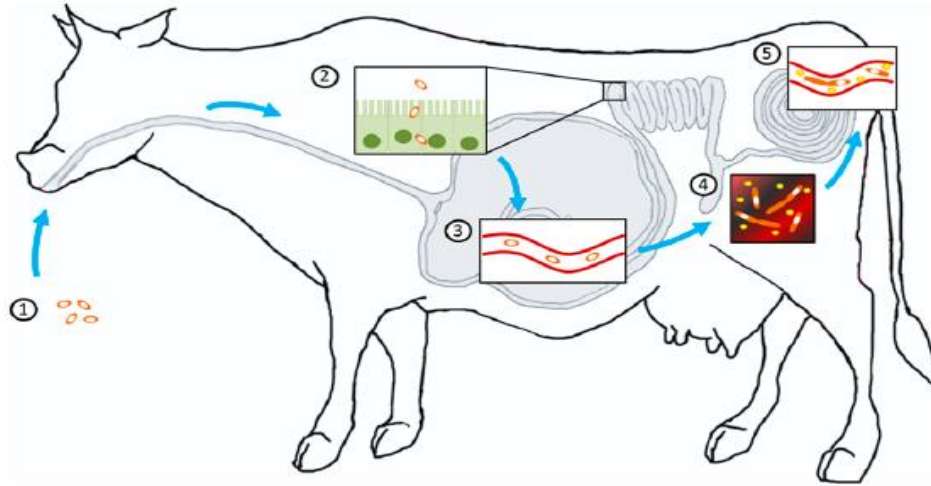
Yanıkara hastalığı zoonotik bir enfeksiyon olmamasına rağmen gazlı gangren ve enterokolitin görüldüğü iki insan vakası rapor edilmiştir (Nagano ve ark, 2008; Weatherhead ve Tweardy, 2012). *C. chauvoei* fare, kobay ve hamsterler da doku invazyonu yoluyla patojenite göstermektedir. Deneysel olarak enfeksiyonların oluşturulmasında; doku yıkımlarının desteklenmesi amacıyla kalsiyum klorür (CaCl_2) ile beraber enjekte edilmesi önem arz etmektedir (Parte, 2009).

Yanıkara hastalığı, büyük kas kütlelerinde amfizematöz yangı, sero hemorajik akıntı ve gangren oluşumu ile karakterizedir. (Useh ve ark, 2006b). Sporlar ile kontamine olmuş toprakta yetişen ruminantlarda, ciddi toksemiye ve yüksek düzeyde mortaliteye neden olurlar. Hayvancılıkta büyük kayıplara neden olmakla birlikte ruminantlardan başka hayvanlara nadiren saçılım (bulaşma) göstermektedir. (Abreu ve ark, 2017).

Hastalığın inkübasyon periyodu 1-5 gündür. Hastalığın perakut formu çok hızlıdır ve klinik belirtiler meydana gelmeden ölüm şekillenir. Akut form ise en sık görülen formudur. Yanıkara'nın sığırlarda görülen klinik belirtileri ekstremitelerde şişlik, depresyon, anoreksi, yüksek kalp atışı (100–120/dak), akut rumen timpanisi, yüksek ateş, dil ve boğaz şişmesi, amfizem, krepitasyon, uyluk kaslarının sertliği ve kuru cilttir. Koyundaki hastalığın klinik belirtileri sığırlara benzerdir, ancak bu krepitasyon ve şişlik hissedilemez (Useh ve ark, 2006b).

2.3. *Clostridium chauvoei*'nin Patogenezi

Bu *Clostridia* türü birçok hayvanın sindirim sisteminde bulunur ve enfeksiyon sonucu ölen hayvanların karkasları ile toprağa geçerler. Bakteriler, sığırların otladığı alanlarda çok sayıda bulunur. Hastalığın patogenezi duyarlı hayvanlar tarafından bu etkenin sporlarının oral yolla alınması ile başlar (Şekil 1). Sporlar daha sonra gastrointestinal sistemi geçerek kan dolaşımına girer. Buradan da tüm dokulara yayılır. Hastalık aktive oluncaya kadar dokuda uyku durumunda kalırlar. Koşulların uygun olduğu durumlarda sporlar, özellikle iskelet kası ve bağırsaklarda vejetatif forma geçer ve çoğalmaya başlar. Çoğalan bakteriler toksin ve ölümcül olabilecek antijenik bileşikler üretirler. Bu toksin ve bileşikler kanama, miyofibriller nekrozla karakterize lokal lezyonlar oluşturur. Lezyonların merkezi bakteriyel fermantasyon nedeniyle koyu amfizemik hale gelirken, perifer kısımları ödematöz ve hemorajiktir. Yanıkara hastalığında ölüm sonrası yapılan nekropsi sonucunda etkilenen bölgenin siyah, renksiz, şişmiş ve kokuşmuş olduğu görülür. Acımsız tereyağı kokusu tipik olarak alınır (Hirsh ve ark, 2004). Etkilenen kas dokusu serö-müköz ve kabarcıklı bir yapıya sahiptir. Vücut boşlukları fazla miktarda sıvı içerir. Dokuların genel ayrışması hızlıdır. Kalp kasının etkilendiği durumlarda kalp çevresinde büyük miktarlarda fibrin bulunan sıvı birikimi bulunur. Klinik olarak yüksek ateş, anoreksiya, depresyon, akut topallama ve nihayetinde ölüm görülür. Bazen hayvanlarda ani ölümler de görülebilmektedir (Uzal ve ark, 2016; Abreu ve ark, 2017).



Şekil 1. Yanıkara patogenezi. (1) *C. chauvoei* sporları başlangıçta kontamine topraktan yutulur (2). İntestinal mukoza boyunca kan dolaşımına geçer (3). Sporlar daha sonra birçok dokuya yayılır, primer olarak iskelet kaslarında uydu durumuna geçer (4). Daha sonra, düşük oksijen varlığında iskelet kaslarında, genellikle akut bir yaralanma sonucu sporlar vejetatif forma dönüşür. Bakteri lokal nekroz ve inflamasyona neden olan güçlü ekzotoksinler üretir (5). En sonunda, çoğalan bakteriler ve toksinler kan dolaşımına girerek ekzotoksemiye neden olur ve nihayetinde ölüm gerçekleşir (Abreu ve ark, 2017).

2.4. *Clostridium chauvoei*'nin Antijenik Karakterizasyonu

2.4.1. Flagella

C. chauvoei peritrik flagellaya sahip olup bakterinin patojenitesini sağlayan en önemli virulans faktörlerinden biridir. Flagellin denilen bir proteine sahiptir. Flagellin hem koruyucu hem de teşhis metotlarında ayırt edici olarak kullanılabilen bir proteindir. Yapılan bazı çalışmalarda flagellanın ilgili enfeksiyona karşı koruyucu antikolar oluşturabileceği ortaya konulmuştur (Usharani ve ark, 2015). *C. chauvoei*'nin flagellasına spesifik olan monoklonal antikolara (MAbs) karşı anti-idiotipik antikoların bir aşısı olarak kullanılabilceği tespit edilmiş, ayrıca yanıkara aşılarında flagellar antijen miktarını ölçmek için monoklonal antikolar kullanılabilceği belirtilmiştir (Kojima ve ark, 1999).

2.4.2. Toksinler

2.4.2.1. Hemolizin

Bakterilerin, çeşitli hayvan türlerinden eritrositleri lize edebilen hemolizin ürettiği bilinmektedir. Çalışmalar hemolizin üreten bakterilerin üretmeyen bakterilere göre daha öldürücü olduğunu göstermiştir (Cavaliere ve Snyder, 1982). Hemolizin, 27 kDa ağırlığında, *C. chauvoei* enfeksiyonunun virulans faktörlerinden biridir (Hatheway, 1990). *C. chauvoei*'nin kültür ortamında hemolizin ürettiği iyi bilinmektedir. *C. chauvoei*'nin ürettiği hemolizinin; filtrelenebilir nitelikte, ısı karşısında kararsız, aktif olarak antijenik özellikte ve amonyum sülfat ile çöktürülebilir olduğu bildirilmiştir (Usharani, 2014).

2.4.2.2. Beta Toksin

Beta toksini bir DNazdır. Princewill and Oakley tarafından 1976 yılında keşfedilmiştir. Ayrıca sığırlardan izole edilen diğer klostridia suşlarında da tespit edilmiştir (Usharani, 2014). Beta toksin ısı stabil, metal iyonları ile aktive veya inhibe olabilen, şelat oluşturan maddeler tarafından nötralize edilen ve amonyum sülfat ile çöktürülebilme özelliğe sahiptir. Beta-toksinin, kas hücresi nükleuslarında dejenerasyona sebep olabilmesi önemlidir (Ramachandran, 1969; Coral, 2009).

2.4.2.3. Gamma Toksin (Hyalüronidazlar)

C. chauvoei'nin gama toksini, bağ dokusunda temel madde olan hyalüronik asidin glüküronik asit ve N asetilglukozamin arasındaki glikozidik bağları hidroliz eden bir enzimdir. Bu yolla hyalüronik asidin parçalanmasına neden olur. Bakteriyel hyalüronidazlar, cilt veya mukozal yüzeylerde enfeksiyonları başlatan bir kısım Gram pozitif patojen bakteriler tarafından üretilir. Mukozal veya cilt yüzeyinde enfeksiyon oluşturabilen birçok patojenik bakteri, hyaluronidaz enzimi üretir. Hyaluronidaz üretebilen Gram-pozitif organizmalar arasında *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Streptomyces* ve *Clostridium*'un çeşitli türleri bulunur. Stafilokoklar arasında patojen *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus hyicus subsp. hyicus* suşlarında hyalüronidaz üretimi görülmektedir. Hyalüronat bağ dokusunu oluşturan ana maddelerden olduğu için özellikle cilt ve mukozalarda hyaluronidaz, patojenlerin ilk enfeksiyon yerinden yayılmasının sağlanmasında önemli bir bileşendir. Bu toksinin yanıkara hastalığının patolojisinde önemli bir rolü gösterilememiştir (Ghazaei, 2014). *C. chauvoei* genomunun, iki farklı hyalüronidaz [hyalüronoglukosaminidaz (nagH) ve β -N-asetilglukozaminidaz (nagJ)] için gen barındırdığı bilinmektedir (Dangi ve ark. 2017).

2.4.2.4. Nörominidaz

Yanıkara hastalığının sebebi olan *C. chauvoei* nörominidaz ürettiği rapor edilmiştir. Nörominidazlar bazı bulaşıcı hastalıkların patogenezinde yer alırlar (Useh ve ark, 2006a). *C. chauvoei*'nin sahip olduğu nöraminidaz, ökaryotik hücrelerin hücre duvarlarındaki glikokonjugatlardan sialik asidi parçalar ve böylece hücreler arası matris bozulmalarına neden olur. *C. chauvoei* nöraminidaz enziminin moleküler ağırlığı 65 kDa'dır. *C. chauvoei* 16 nöraminidaz, kırmızı kan hücrelerini hidrolize etme kapasitesine sahiptir. Bu durum Yanıkara enfeksiyonlarında görülen hipovolemiyi açıklamaktadır (Useh ve ark, 2012).

2.4.3. Hücre Duvarı

Peptitoglikan tabakasının teikotik asiti somatik 'O' antijenini oluşturur. Bu hücre duvarı antijenleri ısıya dayanıklıdır. Güçlü bir bağışıklık yanıtı sağlar. *C. chauvoei*'nin koruyucu yanıt oluşturan antijenleri genellikle hücre ile birleşik halde bulunur (Ghazaei, 2014).

2.5. Tanı

Yanıkara tanısı anemnez, klinik bulgular, post mortem bulgular, organizmaların morfolojisi, biyokimyasal özellikler ve patojenite testleri ile gerçekleştirilir. Kesin tanı otopside lezyonlu bölgelerin renginin siyah, koyu kırmızı veya yeşilimtrak kırmızı renkte gazlı, serömüköz tabiatta sıvı içeren nekrotik kasların görünümü ve etkenin izolasyonu ile yapılır. Ancak konvansiyonel metotlarla ve serolojik testlerle doğrulanması gerekmektedir. Ayırıcı tanıda *C. chauvoei*'nin *C. septicum*'dan ayırt edilmesi gereklidir (Songer ve Post, 2012). Lange ve arkadaşları (2010) geliştirdikleri PCR metodu ile elde ettikleri klinik izolatlarda *C. chauvoei* tespit etmişlerdir. Son yapılan çalışmalarda *C. chauvoei*'nin tanısında rekombinant flagelline dayalı bir ELISA metodu geliştirilmiştir (Usharani ve ark, 2015). Ayrıca formalinle tespit edilip parafine gömülmüş dokularda streptavidin-biyotin immunperoksidaz tekniği kullanılarak da *C. chauvoei*'nin tespiti yapılmıştır (Uzal ve ark, 2003).

2.6. Tedavi

Hastalığın seyri hızlı olduğundan prognoz olumsuzdur. Tedavide penisilin, penisilin ve streptomisin kullanılabilir. Lokal olarak gazlı ve ödemli bölgelerdeki deri üzerine uzunlamasına ensizyonlar yapılarak, oksijenli ve potasyum permanganatlı sularla yıkanmalıdır. Ayrıca hastalar yüksek dozda antiserum verilerek sağaltım çalışılır. Kesilen ve ölen hayvanların etleri değerlendirilmez (Alaçam ve Şahal, 2002).

2.7. Koruma

Aşılama bu hayvanlarda bilinen en etkili ve en ucuz koruma yöntemidir. Aşılama, kültürlerden hazırlanmış ticari aşılar kullanılır. Bu aşılar genellikle polivalan aşı şeklinde piyasaya sunulmaktadır. *C. chauvoei* karşı geliştirilen aşılar genellikle somatik ve flagellar antijen içermektedir. Yanıkara hastalığı enzootik bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Bu yüzden kullanılan aşı içeriklerinin koruyucu kapasitesinin yüksek olabilmesi için yerel suşlar kullanılması önemlidir (Mattar ve ark, 2002).

Klostridial aşuların intramüsküler enjeksiyonu kaslara önemli ölçüde zarar verir. Bu nedenle yanıkara aşularının boyun bölgesine uygulanması gerekmektedir. Bu bölgeye yapılan enjeksiyon olası kas hasarlarının oluşumunu önler. Sığırlar ilk defa 3-6 aylık iken aşılanmaya

başlanır. Birçok klostridial aşıda ilk aşılamaı takiben 4-6 hafta içerisinde rapel aşılama yapılması gereklidir. Aşılamalar, sahada enfeksiyonun yaygınlığına bağılı olarak, altı aylık veya yıllık rapeller halinde tekrar edilir. Aşılama hastalıktan 2 hafta önce yapılmalıdır. Salgın sırasında tüm hayvanlar aşılanır ve uzun etkili penisilin kullanılır. Gebe hayvanlar enfeksiyonun sık görüldüğü yerlerde doğumdan 3 hafta önce aşılanmalıdır. Kuzuların genç yaşlarda aşılanması gerekebilir. Özellikle mera değişikliği durumlarında hayvanların aşılanması tavsiye edilmektedir (Radostits ve ark, 2007).

Aşılama uygulamalarında doğaldır ki, uygulanan biyolojik ürünün güvenli ve hedeflenen enfeksiyon grubu üzerinde etkin olması beklenir. Biyolojik ürünlerde yapılan kontrol testleri de bu amaca yönelik dizayn edilmiş testlerdir. Konvansiyonel yaklaşım ile aşı türü ne olursa olsun bir biyolojik ürünün kontrolü fizikokimyasal, sterilitate, zararsızlık ve etkinlik (potens) testleri kapsamında gerçekleştirilmektedir. Bunlardan etkinlik testleri aşının içinde yer alan antijenin immunojenitesinin belirlenmesini hedefler. *C. chauvoei* aşıların da immunojenitenin belirlenmesinde; in vivo bir metot olan patojen kültürle (veya spor süspansiyonu) ile epruvasyon uygulanması prensibine dayanan epruvasyon prosedürü uygulanmaktadır. Bu prosedürde; deney hayvanları 21-28 gün aralıkla 2 defa aşı ile immunize edilmekte, bunu takip eden 14 gün sonra da, immunize edilmemiş kontrol grubuyla birlikte patojen *C. chauvoei* kültürünün 100 LD₅₀ dozunda verilmesi ile epruve edilmekte ve gruplar arasında letalite bulgularının değerlendirilmesiyle ürünün etkinliği konusunda karar verilmektedir. Epruvasyon kültürünün minimal lethal dozunun belirlenmesi de dahil bu prosedürün uygulanabilmesi için çok sayıda kobay kullanılmakta ve yaklaşık 35-42 günlük bir test süresine gereksinim olmaktadır (EDQM, 2017b). Hem aşı üreticilerinin hem de otorite adına kontrol yapan merkezlerin bu testleri ayrı ayrı yürüttükleri dikkate alındığında kontrol için geçen test süreleri ve harcanan iş gücü oldukça büyüktür. Ayrıca büyük miktarlarda deney hayvanı kullanılmaktadır. Avrupa'da kullanılan deney hayvanlarının yaklaşık %10'unun veteriner aşıların güvenli ve potens testlerinde kullanıldığı (Hendriksen ve ark, 1998), sadece veteriner klostridial aşı ve antijenlerin test edilmesinde yıllık onbinlerce farede test yapıldığı (Redhead ve ark, 2011) değerlendirildiğinde kullanılan deneme hayvanı sayılarının büyüklüğü ortaya çıkmaktadır. Bu bakımdan deney hayvanı sayılarının azaltıldığı ya da deneme hayvanı ihtiyacını ortadan kaldıran in vitro alternatif prosedürlerin geliştirilmesi ve uygulamaya aktarılması önem arz etmektedir. Bu gereklilikler dikkate alınarak planlanan bu çalışmada, *C. chauvoei* içeren bakterin aşıların potens testinde konvansiyonel patojen kültürle epruvasyon uygulanması yerine, hayvanlarda immunizasyon yapılmadan aşının içerdiği antijen miktarının (flagellar yüzey proteinin) ölçülmesine dayanan bir ELISA

prosedürünün uygulanabilirliğinin değerlendirilmesi; gerek deneme hayvanı ihtiyacının ortadan kaldırılması gerekse test sürelerinin kısaltılması açısından değerlidir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Deney Hayvanları

Çalışmada kullanılan Wistar Albino ırkı, 350-450 g ağırlığında sağlıklı kobaylar Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Deney Hayvanları Biriminden temin edilmiştir. Her aşı için 10 adet kobaya immunizasyon yapılmış, 5 adet kobay ise aşısız kontrol grubu olarak (15 kobay) kullanılmıştır.

Kobaylar, deney boyunca, her kafes içerisinde 5 adet olacak şekilde, 21-25 °C sıcaklık, % 50-65 bağıl nem ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ışık periyodu altında muhafaza edilmiştir. Kobaylara % 20-22 oranında protein ihtiva eden kobay yemi ve içme suyu verilerek ad libitum besleme yapılmıştır. Araştırmanın gerçekleştirilmesinde, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Deney Hayvanları Etik Kurulunun 26.08.2015 tarihli 71705440-904/7303 sayılı karar numarası ile etik açıdan sakınca bulunmadığı bildirilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

3.1.2.1. Kaplama solüsyonu

Na ₂ CO ₃ (Carlo Erba®)	1,59 g
NaHCO ₃ (Roth®)	2,93 g
Distile Su	q.s. 1 L

Manyetik karıştırıcıda eritilerek pH'sı 7.2'ye ayarlanmıştır.

3.1.2.2. Tuzlu Fosfat Buffer Solüsyonu (PBS)

NaCl (Merck®)	8,50 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (Sigma®)	0,25 g
Na ₂ HPO ₄ (Merck®)	1,19 g
Distile Su	q.s. 1 L

Manyetik karıştırıcıda eritilerek pH'sı 7.2'ye ayarlanmıştır.

3.1.2.3. Bloklama solüsyonu

Yağsız süt tozu (Santa Cruz®)	10 g
PBS (Bakınız 3.1.2.2.)	500 mL

Yağsız süt tozu, 500 mL PBS solüsyonu içerisinde manyetik karıştırıcı kullanarak eritilmiştir.

3.1.2.4. Yıkama solüsyonu

NaCl (Merck®)	8,5 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (Sigma®)	0,25 g
Na ₂ HPO ₄ (Merck®)	1.19 g
Tween 20 (Sigma®)	0,5 mL
Distile Su	q.s. 1 L

Manyetik karıştırıcıda eritilerek pH'sı 7.2'ye ayarlanmıştır.

3.1.2.5. Stop Solüsyonu

H ₂ SO ₄ (2,5 M) (Sigma®)	13,6 mL
Distile Su	q.s. 100 mL

Manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

3.1.2.6. Kalsiyum Klorit solüsyonu (%7,5)

CaCl ₂ (Riedel de Haen®)	0,75 g
Distile Su	10 mL

Manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

3.1.2.7. Diğer Kimyasallar

- 3,3',5,5'-Tetrametil benzidin solüsyonu (TMB) (Thermo®)
- Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH₂PO₄) (Merck®)

3.1.3. Monoklonal, Poliklonal Antikorlar ve Konjugat

3.1.3.1. *Clostridium chauvoei* Flagella-spesifik Monoklonal Antikor (MAb)

Clostridium chauvoei Flagella-spesifik (7D11/YD7) Monoklonal Antikor (MAb) (IRP 608) Amerikan Tarım Bakanlığından temin edilerek - 20 °C'de muhafaza edildi. Kaplama solüsyonu içerisinde 1/1000 oranında dilüe edildi.

3.1.3.2. *Clostridium chauvoei* Flagella-spesifik Tavşan Poliklonal Antikor (Tespit Antikoru)

Clostridium chauvoei Flagella-spesifik Poliklonal Antikor (Tespit Antikoru) (IRP 440) Amerikan Tarım Bakanlığından temin edilerek -20 °C'de muhafaza edildi. Bloklama solüsyonu içerisinde 1/20000 oranında dilüe edildi.

3.1.3.3. Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Konjugat)

Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Konjugat) Jackson Immunoresearch Laboratories (111-001-003) firmasından temin edilerek -20 °C'de muhafaza edildi. Bloklama solüsyonu içerisinde 1/5000 oranında dilüe edildi.

3.1.4. *Clostridium chauvoei* Spor Süspansiyonu

Saf spor süspansiyonu, Amerikan Tarım Bakanlığından temin edilerek (IRP 631-BBDAT1039.05) - 80 °C'de muhafaza edildi. Epruvasyon amacıyla steril % 0,85'lik sodyum klorür solüsyonu içerisinde 1/28.000 oranında dilüe edilerek kullanıldı.

1/28.000'lik dilüsyonu elde etmek için önce 1/100 dilüsyon hazırlanır (1 ml saf spor süspansiyonu 99 ml steril % 0,85'lik sodyum klorür solüsyonuyla karıştırılır). Daha sonra elde edilen bu 1/100'lük dilüsyondan 1/2.800 'lik spor süspansiyonu hazırlanır (1/100'lik spor

süspansiyonundan 2 ml alınarak 54 ml steril % 0,85'lik sodyum klorür solüsyonuyla karıştırılır). 1/2.800'lik dilüsyondan 1/28.000'lik final dilüsyon hazırlanır (1/2800'lik dilüsyondan 3 ml alınarak steril 27 ml % 7.5'lik kalsiyum klorür solüsyonu ile karıştırılır.)

3.1.5. Kullanılan Cihazlar

- Manyetik Karıştırıcı (Stuart CB161)
- Tartı Sartorius (CP3202)
- ELISA Okuyucu (Biotek Epoch)
- ELISA mikropleyt Yıkayıcı (Thermo well-wash)
- İnkübatör (Stuart)
- Çoklu Karıştırıcı (CAT S 20)
- Vortex (CAT VM2)

3.2. Yöntem

3.2.1. İş akışı ve koordinasyon

Proje çerçevesinde planlanan tüm çalışmalar Adnan Menderes Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ile Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Bölümünde yürütülmüştür.

3.2.2. Aşıların Hazırlanması ve Temini

Bu tez çalışmasında, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Veteriner Biyolojik Ürün Kontrol Bölümüne, satışa esas kontrole gelen, 15 adet *Clostridium chauvoei* komponenti içeren ve olası yalancı reaksiyonların tespiti için 5 adet bu komponenti içermeyen farklı marka ve serilerde 20 adet aşı, kobayların immunizasyonunda ve ELISA testinde kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan aşıların içerikleri Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan aşuların aktif içerikleri

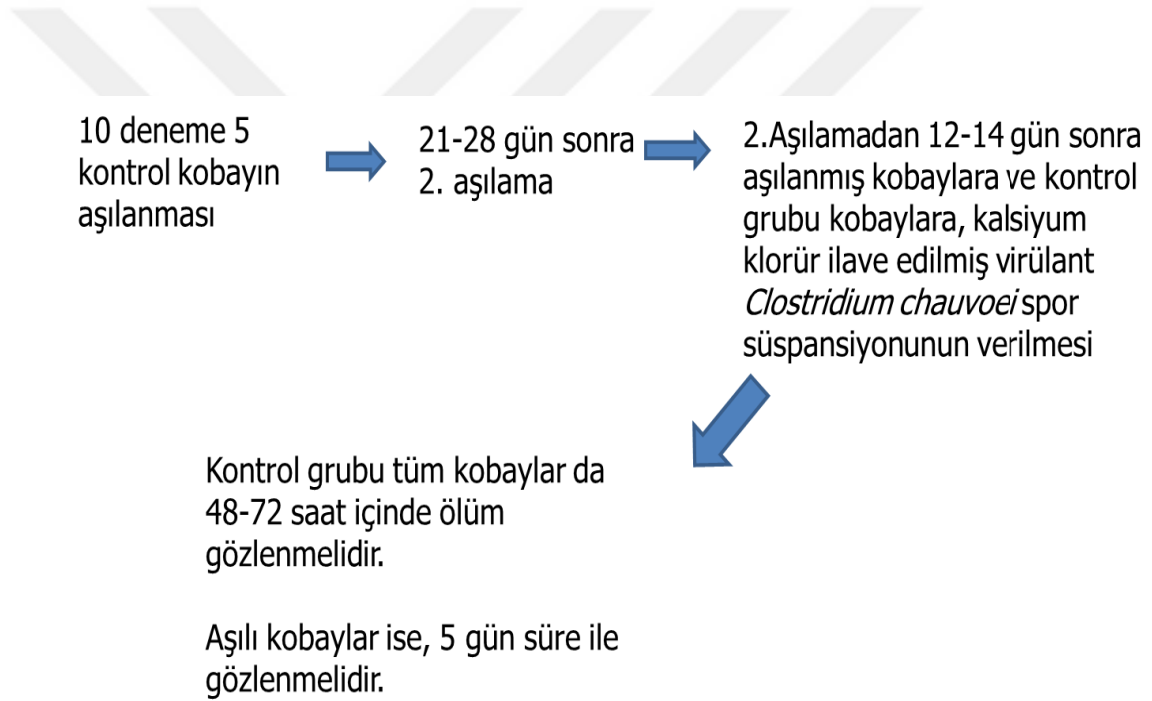
	Aşı 1	Aşı 2	Aşı 3	Aşı 4	Aşı 5	Aşı 6	Aşı 7	Aşı 8	Aşı 9	Aşı 10	Aşı 11	Aşı 12	Aşı 13	Aşı 14	Aşı 15	Aşı 16	Aşı 17	Aşı 18	Aşı 19	Aşı 20
<i>C. chauvoei</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
<i>C. perfringens</i> Tip A				X	X	X														
<i>C. perfringens</i> Tip B				X	X	X	X		X	X	X	X					X			
<i>C. perfringens</i> Tip C	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X		
<i>C. perfringens</i> Tip D	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X		
<i>C. haemolyticum</i>	X	X	X																	
<i>C. sordelli</i>	X	X	X				X			X	X	X			X					
<i>C. septicum</i>	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X			X					
<i>C. novyi</i>	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X					
<i>C. tetani</i>										X	X	X								
<i>C. botulinum</i>										X	X	X								
<i>Pasteurella multocida</i> Tip A															X					
<i>Mannheimia haemolytica</i> Tip 1															X					
<i>Bacillus anthracis</i>																			X	
<i>E. coli</i>							X													
<i>J-5 E. coli</i>																				X

3.2.3. Kobaylarda *Clostridium chauvoei* Epruvasyon Testi

C. chauvoei potens testinde kobayların immunizasyonu, üretici firmanın protokol dosyası esas alınarak yapılmıştır.

3.2.3.1. *Clostridium chauvoei* epruvasyon testi prosedürleri

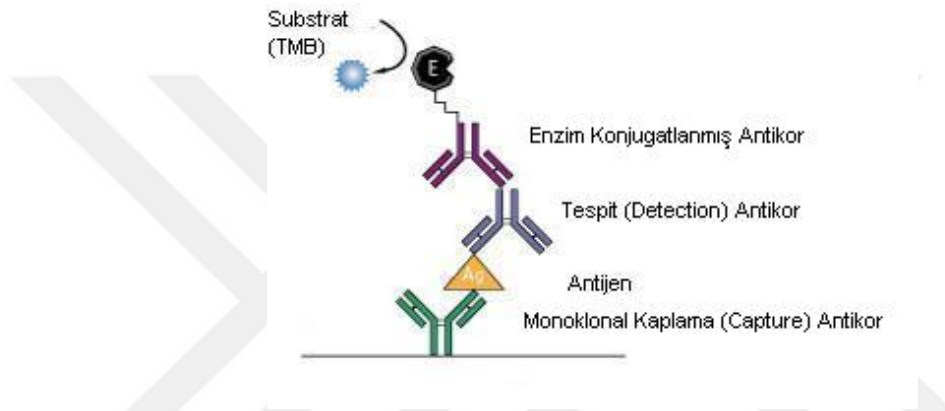
Kobaylara 21-28 gün ara ile iki aşılama yapılmıştır. İkinci aşılamadan 12-14 gün sonra aşılanmış kobaylara ve kontrol grubu kobaylara, kalsiyum klorür ilave edilmiş virülant *C. chauvoei* spor süspansiyonundan, uygun dozda kas içi yolla enjekte edilmiştir. Kontrol grubu kobaylar 48-72 saat, aşıli kobaylar 5 gün süre ile gözlendi (Şekil 2) (EDQM 2017b).



Şekil 2: *Clostridium chauvoei* epruvasyon testi

3.2.4. Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi (ELISA)

İnaktive edilmiş *C. chauvoei* bakterin aşılarının potensinin belirlenmesine yönelik mikroorganizmanın flagellar protein miktarının ölçümüne dayanan indirekt double sandviç ELISA prosedürü (Şekil 3) kullanılmıştır. Aşının relatif potensi, referans bakterinin flagellar protein miktarı ile test edilen aşındaki flagellar protein miktarının kıyaslaması yapılarak belirlenmiştir (Ludemann ve Hyde, 2015).



Şekil-3: İndirekt Double Sandviç ELISA test prosedürü

3.2.4.1 Bakterinlerin ELISA testi için hazırlanması ve antijen elüsyon işlemi

Bakterinlerin ELISA prosedürü için hazırlanmasında antijen elüsyon ve/veya sonikasyon işlemleri uygulanmıştır. Bu prosesin amacı flagellar proteinlerin yakalanma seviyesini artırmaktır. Ancak bazı bakterinler için antijen elüsyon işlemi ve sonikasyon işlemi gerekmez. Referans bakterin ve test bakterinlerin her birinin, antijen elüsyon işlemi ve/veya sonikasyon işlemi, aynı prosedürle uygulanmıştır (Ludemann ve Hyde 2015).

Antijen elüsyon işleminin etkinliğinin tespiti için bakterinler (bir seri), antijen elüsyon işlemli ve antijen elüsyon işlemsiz olarak test edilmiş, antijen elüsyon işleminin flagellar proteinin yakalanmasını artırmadığı tespit edilen bakterinler için, antijen elüsyon işlemi uygulanmamıştır. Elüsyon işlemi, alüminyum adjuvantlı ve yağ adjuvantlı bakterinler için ayrı ayrı prosedürler halinde uygulanmıştır.

3.2.4.1.1. Alüminyum adjuvanth bakterinler için

Adjuvant olarak alüminyum hidroksit içeren bakterinler sodyum sitrat ya da fosfat buffer ile yıkanmıştır.

3.2.4.1.1.1. Sodyum sitratla yıkama

10 ml bakterin içine 1 gr sodyum sitrat (Sigma) eklenir (10% w/v). 24 saat orbital shaker (yaklaşık olarak 120 rpm) içinde 35-37 °C’de bekletilmiştir. Yıkanmış bu bakterin, dilue edilmemiş olarak kabul edildi (Ludemann ve Hyde, 2015).

3.2.4.1.1.2. Fosfat buffer ile yıkama

1 ml bakterin içine 1 ml fosfat buffer katılır. 24 saat orbital shaker (yaklaşık olarak 120 rpm) içinde 35-37 °C’ de bekletilmiştir. Yıkanmış bu bakterin, ½ dilue olarak kabul edildi. Bazı bakterinler bu aşamada sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur (Ludemann ve Hyde, 2015).

3.2.4.1.2. Yağlı Adjuvanth Bakterinler İçin

1ml 0.5% sodium desoxycholate ile 1 ml bakterin karıştırılır. 24 saat orbital shaker (yaklaşık olarak 120 rpm) içinde 35-37 °C’ de bekletilmiştir (Ludemann ve Hyde, 2015).

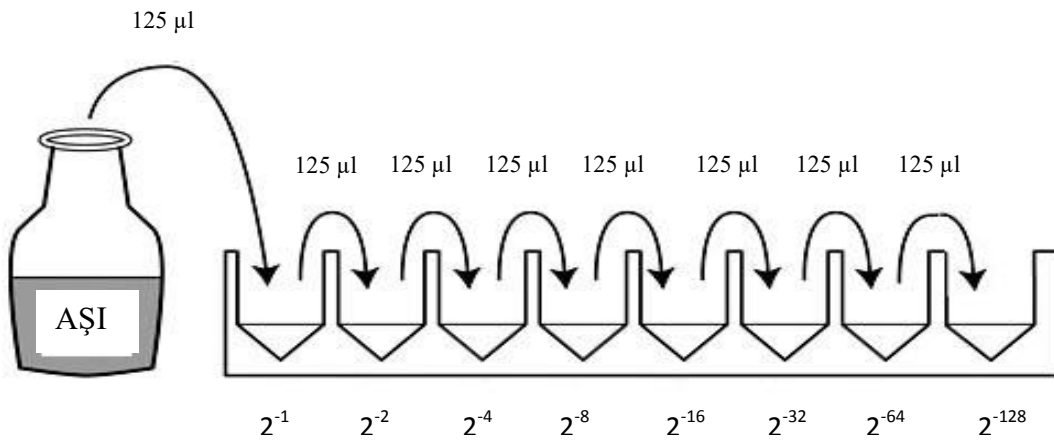
3.2.4.2. ELISA Testinin Yapılışı

a) Monoklonal antikor (MAb), üretim lotunda belirtilmiş olan dilüsyon oranında, karbonatlı kaplama buffer solusyonu içinde dilüe edildi ve 96 gözlü F tabanlı mikropleyitin (ThermoFisher Nunc MaxiSorp flat-bottom) tüm kuyucuğuna 100 µl koyuldu. Mikropleyt, pleyt sızdırmazlık bandı ile kapatıldı ve karanlık ortamda, dakikada 80-120 rpm çalkalama sağlayan orbital shakera yerleştirilerek, 16 saat oda sıcaklığında (20-25 °C) inkübasyona bırakıldı.

b) Mikropleyt 300 µl/kuyucuk olacak şekilde 3 defa yıkandı Mikropleytin tüm kuyucuklarına 200 µl bloklama solüsyonu koyuldu ve 37 °C’de 75 dakika inkübasyona bırakıldı. Bloklama sonrası fazla sıvı uzaklaştırıldı. Mikropleyt boşaltıldı.

c) Mikropleyt 300 µl/kuyucuk olacak şekilde 3 defa yıkandı.

d) Ayrı bir U tabanlı 96 gözlü mikropleytle test ve referans bakterinin 2 katlı seri dilüsyonu yapıldı (Şekil-4). Mikropleytle tüm kuyucularına 125 µl bloklama solüsyonu konuldu. Her bir bakterine minimum 2 kolon kuyucuk ayrıldı ve bu ayrılan 2 kolon kuyucukların ilk gözlerine 125 µl bakterin konuldu. Çok kanallı mikropipet ile bakterinlerin iki katlı dilüsyonu yapıldı. Her iki kolonun son kuyucukları bakterin içermeyen blank olarak ayrıldı (Tablo-4). İki katlı dilüsyonlar 7 seri olacak şekilde yapıldı. Seçilen bakterin dilüsyonları, antijen miktarını (antijen yoğunluğundan-azlığına kadar) veren sigmoid eğriyi oluşturacak şekilde ayarlandı.



Şekil-4: İki katlı seri dilüsyon yapılışı

e) Dilüe edilmiş olan bakterinler, test mikropleytlede belirlenmiş olan ilgili kuyucuklarına 100 µl/kuyucuk olacak şekilde aktarıldı (Tablo 4). Pleyt kapatılarak 75 dakika 35-37 °C de inkübe edildi.

		AŞI-1		AŞI-2		AŞI-3					
R	R	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	-----	-----	-----	-----
R	R	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	-----	-----	-----	-----
R	R	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	-----	-----	-----	-----
R	R	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	-----	-----	-----	-----
R	R	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	-----	-----	-----	-----
R	R	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	-----	-----	-----	-----
R	R	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	-----	-----	-----	-----
BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	-----	-----	-----	-----

Tablo-4. Aşıların ve referansın pleyte yerleştirilmesi

R: Referans BLK: Blank

f) Mikropleyt 300 µl/kuyucuk olacak şekilde 3 defa yıkandı.

g) Tespit (Detection) antikoru, mevcut lot durumunda belirtilen dilüsyon oranında bloklama solüsyonu ile dilüe edildi ve mikropleytin tüm kuyucuğuna 100 µl konuldu. Pleyt kapatılarak 75 dakika 35-37 °C de inkübe edildi.

h) Mikropleyt 300 µl/kuyucuk olacak şekilde 3 defa yıkandı.

i) Anti-rabbit horseradish peroksidaz konjugat üretici firmanın belirlediği dilüsyon oranında dilüe edildi ve mikropleytin tüm kuyucuğuna 100 µl aktarım yapıldı. Pleyt kapatılarak 75 dakika 35-37 °C de inkübe edildi.

j) Konjugatın inkübasyonu süresince TMB şişesinin oda sıcaklığına gelmesi beklendi.

k) Mikropleytin tüm kuyucuğuna 100µl TMB substrat solusyonundan konuldu. Oda sıcaklığında 10-30 dk inkube edildi.

l) Mikropleytin tüm kuyucuğuna 100µl stop solüsyon konuldu.

ELISA da 450 nm dalga boyunda okutuldu. Blank kuyucuklarının absorbans değeri hesaplandı. Hesaplanan blank kuyucuklarının absorbans değeri ile bakterin test kuyucuklarının absorbans değerlerinin bilgisayarda GEN 5 programı (3.0.2 numaralı sürüm) kullanılarak relatif potens hesaplaması yapıldı. Relatif potens, benzer yapıda olan iki örneğin belirli bir özelliğinin birbirleriyle karşılaştırılması temeline dayanmakta olup, bu amaçla test örneği kabul limiti belirlenmiş aynı antijen içeriğine sahip referans aşı ile kıyaslanmıştır.

3.2.5. Referans Aşının Oluşturulması

Referans ürünün, bir aşı serisi, sadece bakteri, bu bakterilerin alt ünitesini içeren saf bir ürün veya adjuvantlanmamış mikroorganizma kültüründen oluşabileceği bilinmektedir (Karlı ve Rippke, 2015). Referans aşı oluşturulması DeHaven (2003)'e göre yapılmıştır. Aşının PBS içerisinde on seri iki katlı dilüsyonlar yapıldı. Bu dilüsyonların her biri, 5 adet kobaya, ürünün final ürün kontrol testlerinde, kobaylar için belirtilen uygulama yolu ve dozunda verildi. İmmunize edilen kobayların dışında 5 adet kobay da kontrol olarak tutuldu. Kobayların immunizasyonundan sonra, aşı ve kontrol kobay grupları virülant *C. chauvoei* spor süspansiyonu (100 LD₅₀) ile eprüve edilerek 5 gün süre ile gözlemlendi. Her bir seri dilüsyon grubundaki kobayların sağ kalanları dikkate alınarak, aşının koruyucu doz 50 değeri (PD₅₀) Reed and Muench yöntemine göre belirlendi (Ramakrishnan, 2016). Uluslararası monograflarda (USDA APHIS, 2017a, EDQM 2017b) *C. chauvoei* aşılarının % 87,5-100 oranında koruma sağlaması beklenmektedir Bu doğrultuda aşının PD₅₀ değeri bulunan dilüsyon noktasından, aşı kobayları % 100 koruyan bir üst dilüsyon noktası referans antijen miktarı olarak belirlenmiştir.

3.2.6. Test Sonuçlarının İstatistiksel Hesaplanması ve Yorumlanması

ELISA prosedüründe sonuçların referans ile karşılaştırılması ve relatif potensin hesaplanmasında 4 parametrelili paralel doğru analizi kullanıldı (Karlı ve Rippke, 2015; Ludemann ve Hyde, 2015). Relatif potens değeri $\geq 1,0$ olanlar ürünlerin geçme kriterlerini karşıladığı kabul edildi. Limit değerden düşük olarak bulunan aşılar bağımsız olarak 2 defa test edildi.

ELISA ve epruvasyon test sonuçları arasındaki korelasyon (her iki testte de geçer kriterleri karşılayan aşılara 1, karşılamayan aşılara 0 verilerek) Pearson Korelasyon Katsayısı yöntemi (çift yönlü) ile IBM SPSS İstatistik Programı kullanılarak hesaplandı. Aynı çalışma günündeki çift örnekler arasındaki pleyt içi varyasyon ile farklı günlerde 6 örneğin 6 tekrarlı çalışılması ile belirlenen pleytler arası varyasyonun bulunmasında relatif standart sapma (varyasyon katsayısı, CV) kullanılmıştır (Türkbal, 2011). Ayrıca referans kabul edilen epruvasyon prosedürüne göre ELISA metodunun spesifite, sensitivite, pozitif ve negatif sapma oranı ile relatif doğruluk oranı belirlenmiştir (Duygu ve Udoh, 2017).

4. BULGULAR

Bu araştırmada polivalan ya da monovalan karakterde *C. chauvoei* içeren 15 adet aşı ile olası yalancı pozitif reaksiyonların gözlenebilmesi için bu mikroorganizmayı içermeyen, ancak aynı adjuvant ve üretim teknolojisi ile üretilmiş farklı klostridial komponentlerden oluşan 3 adet klostridial aşı yanında *Clostridia* türünde mikroorganizma bulunmayan 2 adet aşı kullanılmıştır. Aşıların etkinliği iki farklı prosedür ile test edilmiştir. Bunlardan birincisi aşı ile immunize edilen deneme hayvanlarına belli konsantrasyonda patojen mikroorganizmanın verilmesi ile hayvanlardaki spesifik semptomların ya da letalitenin değerlendirilmesine dayanan epruvasyon prosedürü, bir diğeri ise herhangi bir immunizasyon prosedürü uygulanmaksızın aşı içindeki flagelllar antijen konsantrasyonun, monospesifik antikolar kullanılarak ölçülmesi temeline dayanan ELISA prosedürüdür. Her iki metot ile alınan sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

4.1. Kobay Epruvasyon Testi Bulguları

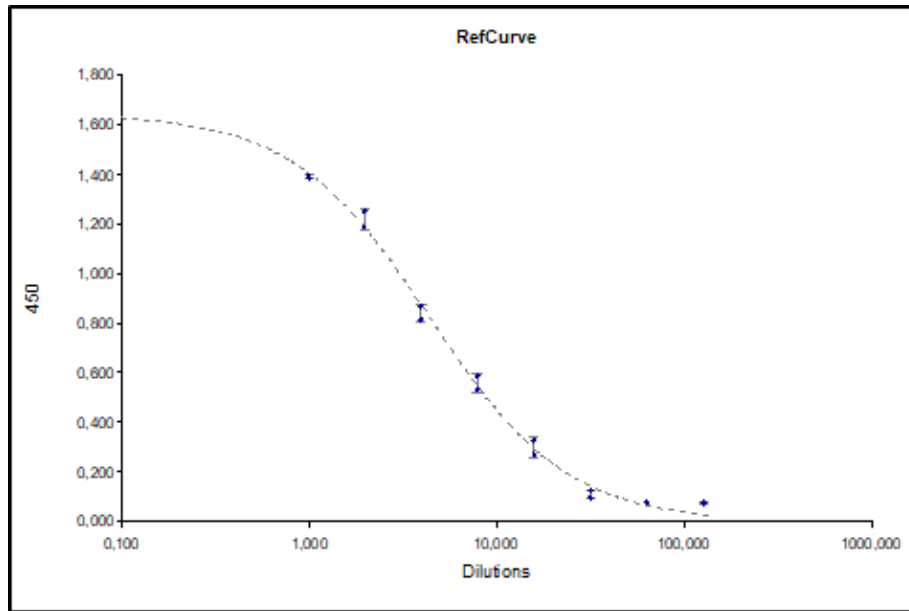
Tablo 5'te belirtildiği ve beklendiği gibi, Yanıkara aşılarının kontrolünde standart metot olan kobay epruvasyon testinde; tüm *C. chauvoei* içeren aşıların geçme kriterlerini karşıladığı, bu komponentin bulunmadığı aşıların ise herhangi bir koruyucu vasıf sergilemediği gözlenmiştir. *C. chauvoei* bulunan aşılarda koruyucu yanıt %90 ile %100 arasında (4 adet aşıda %90, 11 adet aşıda %100 koruma) seyretmiştir. Aşılı gruplarda gözlemlere 5 gün süresince devam edilmiştir. Kontrol grubu kobaylarda patojen mikroorganizmanın verilmesinden sonraki 48 saat içinde tüm hayvanlarda ölüm görülmüştür. *C. chauvoei* içermeyen aşılarla immunize edilmiş kobaylarda da kontrol grubundakilere benzer şekilde 48 saat içinde letalite bulgusu gelişmiştir.

Tablo 5: *C. chauvoei* komponenti içeren aşların Epruvasyon ve ELISA test sonuçları

	KOBAY EPRUVASYON TESTİ				Koruyuculuk	ELISA TESTİ
	Kontrol Kobay		Deneme Kobay			
	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü		
Aşı-1	0	5	10	0	% 100	5,245
Aşı-2	0	5	10	0	% 100	3,872
Aşı-3	0	5	9	1	% 90	5,438
Aşı-4	0	5	10	0	% 100	1,109
Aşı-5	0	5	10	0	% 100	1,907
Aşı-6	0	5	9	1	% 90	1,226
Aşı-7	0	5	10	0	% 100	1,152
Aşı-8	0	5	10	0	% 100	0,037
Aşı-9	0	5	9	1	% 90	1,801
Aşı-10	0	5	10	0	% 100	1,020
Aşı-11	0	5	9	1	% 90	1,068
Aşı-12	0	5	10	0	% 100	1,078
Aşı-13	0	5	10	0	% 100	2,791
Aşı-14	0	5	9	1	% 90	1,479
Aşı-15	0	5	10	0	% 100	2,037
Aşı-16	0	5	0	10	% 0	0,032
Aşı-17	0	5	0	10	% 0	0,031
Aşı-18	0	5	0	10	% 0	0,055
Aşı-19	0	5	0	10	% 0	0,020
Aşı-20	0	5	0	10	% 0	0,036

4.2. ELISA Bulguları

ELISA yöntemi olarak indirekt double sandviç ELISA prosedürü kullanılmıştır. Pleytler monoklonal antikorla kaplanmış, takiben antijen buna bağlanarak sırasıyla poliklonal tespit antikorunu, peroksidaz işaretli IgG ve substrat ile reaksiyon görünür hale getirilmiştir. ELISA prosedürü uygulanmadan önce metod optimizasyon ve antijen elüsyon işlemleri yapılmıştır. Bu çalışmalar sırasında farklı karakterdeki biyolojik ürünlerin farklı elüsyon prosedürlerine (sodyum sitratla muamele, fosfat bufferla yıkama, sonikasyon işlemi gibi) değişik yanıtlar verdiği görülmüş ve ürünlere özgü en iyi yanıtların alındığı antijen ayrıştırma prosedürleri belirlenmiştir. Ayrıca PD₅₀ çalışması ile seri dilüsyonları yapılan bir ürünün epruvasyon testinde protektif yanıt gösterdiği en düşük antijen konsantrasyonu belirlenmiş ve bu ürün ELISA prosedüründe relatif potensin belirlenmesinde referans aşısı olarak kullanılmıştır. Şekil-5’de referans kabul edilen aşıya ait seri dilüsyon noktalarında elde edilen OD sonuçları esas alınarak oluşturulan referans eğri görülmektedir. Referans üründe doza bağlı yanıt; maksimum (üst asimptot) ve minimum (alt asimptot) aralık içinde dilüsyon katsayısı oranında giderek lineer bir azalma göstermiştir (Şekil 5). Referans eğri her çalışma pleytinde ayrı olarak oluşturulmuştur.

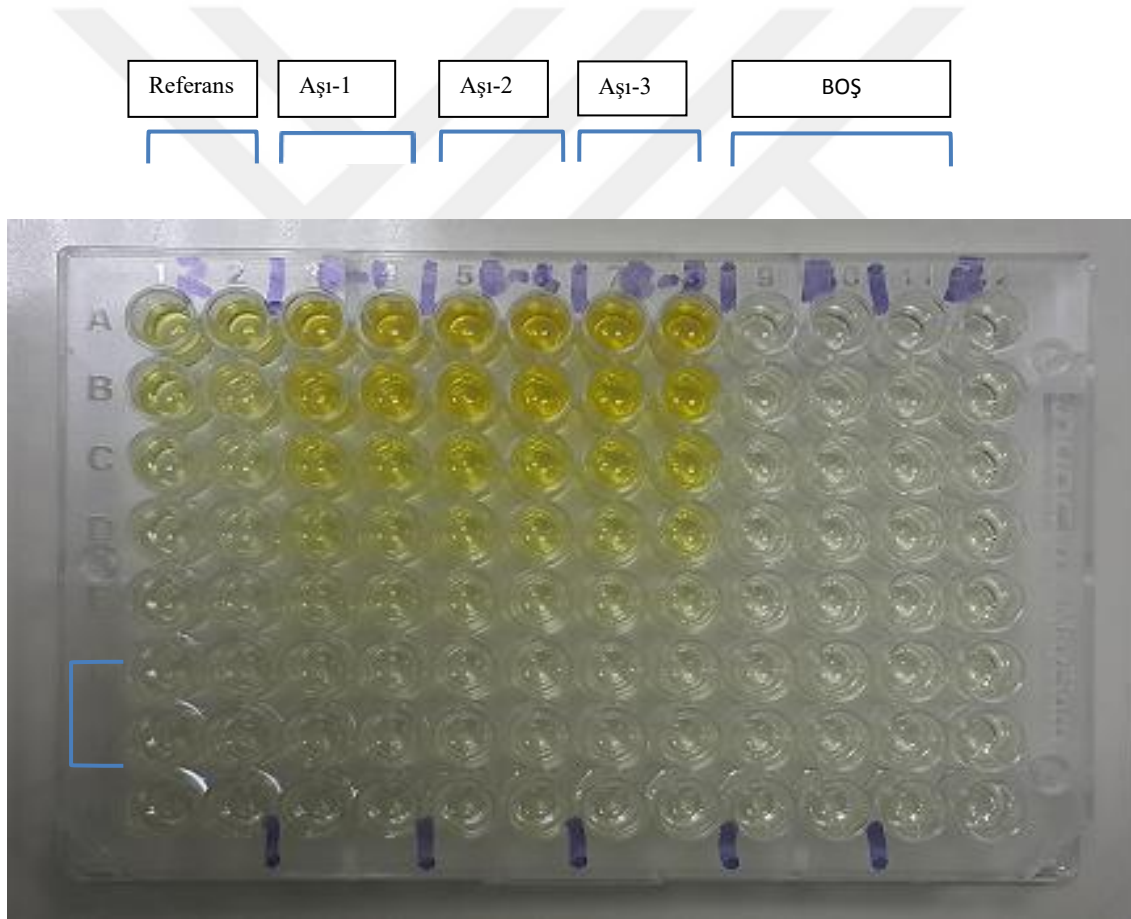


Şekil 5: Referans aşıya ait grafik

Uygulanan ELISA prosedürü ile referans ve test örneklerinin aynı anda işlem gördüğü pleytlerden (Resim 1) alınan OD sonuçları üzerinden relatif potens değerleri hesaplanmıştır.

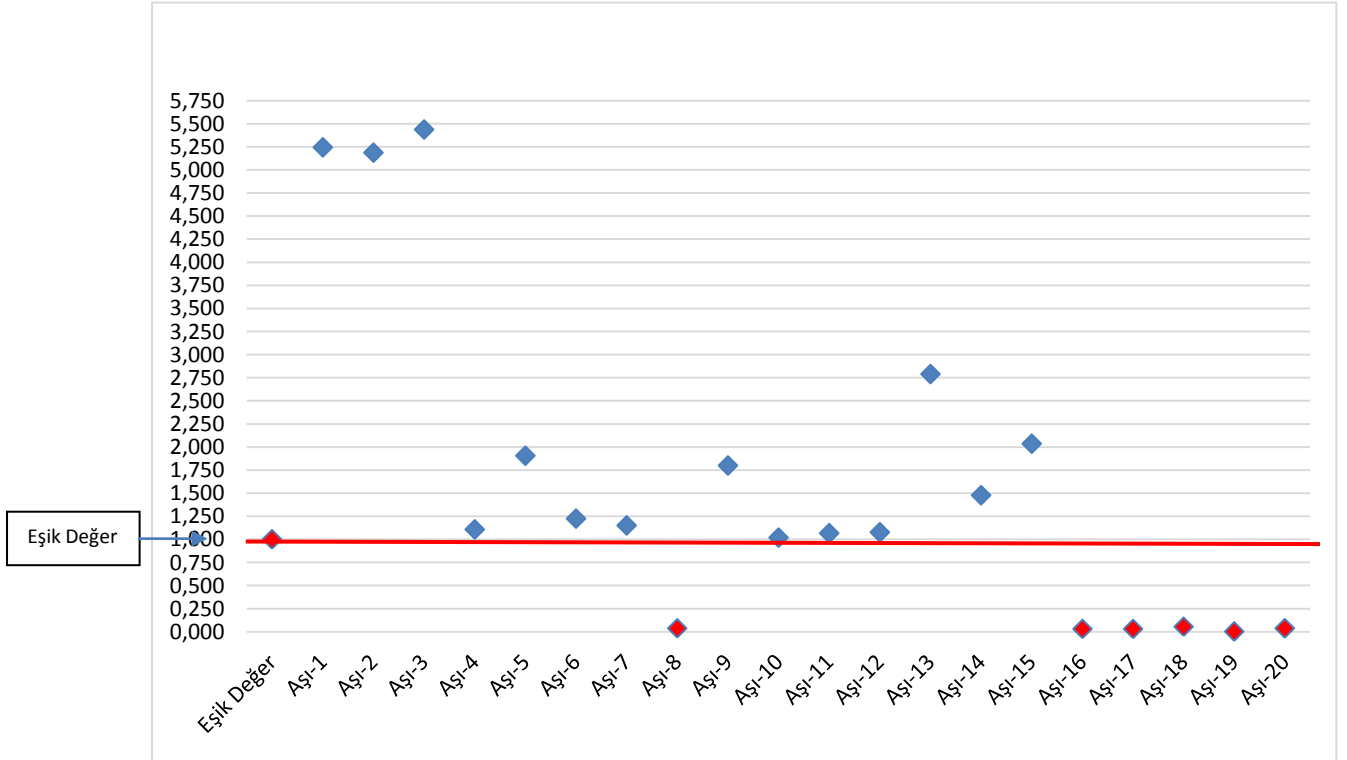
Minimum protektif antijen içeriğine sahip olduğu kabul edilen referans ürüne göre, test örneklerinin antijen içeriğini ortaya koyan ve potens değerlendirilmesinde doz yanıt ilişkisi temeline dayanan matematiksel bir parametre olan relatif potens sonuçları; çalışan tüm örnekler (pozitif ya da negatif test örnekler) için Tablo 5’de gösterilmiştir. Ayrıca *C. chauvoei* içeren aşılarda relatif potens sonuçlarının kabul kriterine ($RP \geq 1$) göre dağılımı Şekil 6’daki grafikte gösterilmektedir. Tablo 5 ve Şekil 6’daki verilerden de anlaşılacağı gibi, *C. chauvoei* komponenti içeren ve epruvasyon testi ile geçer sonuç veren 15 adet aşının 14’ünde $RP \geq 1$ bulunmuş, 1 adet aşı ise ELISA prosedürü kabul kriterini ($RP \geq 1$ olması) karşılamamıştır.

Resim 1: Referans ve test örnekleri üzerindeki sonuçları gösteren bir ELISA pleyti



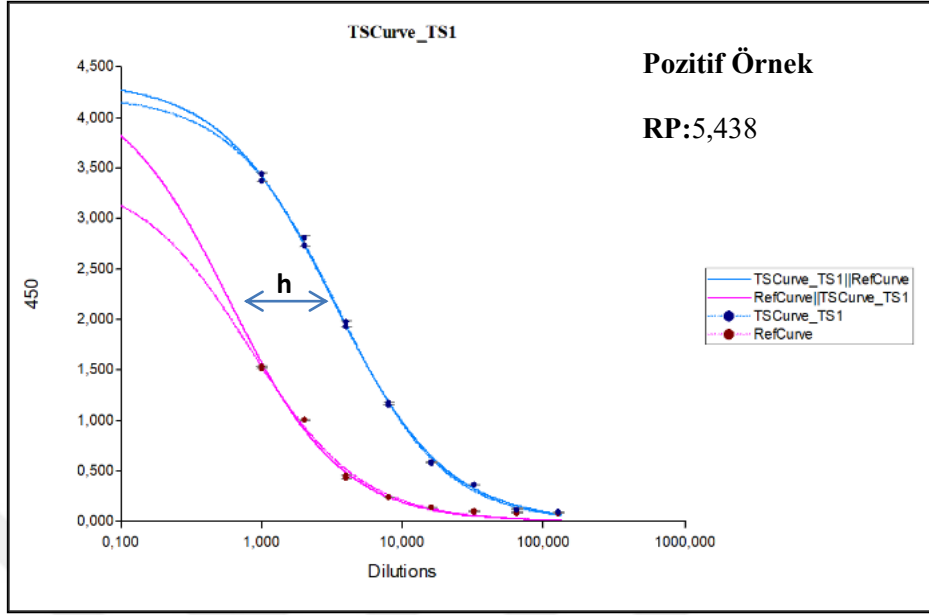
C. chauvoei hariç diğer *Clostridia* türlerini içeren aşılarda ile *Clostridia* türlerini içermeyen aşılarda tümünde flagellar monoklonal antikora spesifik yalancı reaksiyon alınmamış ve bunun sonucu negatif aşılarda tümünde relatif potens sıfıra yakın bulunmuştur. Kabul limitini karşılayan pozitif aşılarda relatif potens değerleri 1,020 ile 5,438 arasında

seyretmiştir (Tablo 5, Şekil 6). Kabul limiti üzerinde sonuç veren aşılarından relatif potens değeri yüksek (RP: 5,438) ve düşük (RP: 1,020) birer aşı örneğine ait test sonucunun referans aşığı göre kıyaslanmasını gösteren relatif potens eğri grafiğı sırasıyla Şekil 7 ve Şekil 8’de verilmiştir. Relatif potens değeri büyüdükçe referans ve test örneğine ait eğriler arasındaki horizontal aralık (h) büyümektedir. Kabul limitini karşılamayan aşılarına ait relatif potens eğrisi örnekleri Şekil 9 ve Şekil 10’da bulunmaktadır. Bu şekillerden de görüleceğı gibi, negatif örneklerde (RP<1) test numunesine ait sonuç, referansa benzer şekilde sigmoid bir eğri oluşturmamakta, dilüsyon noktalarında yatay bir seyir izlemektedir.

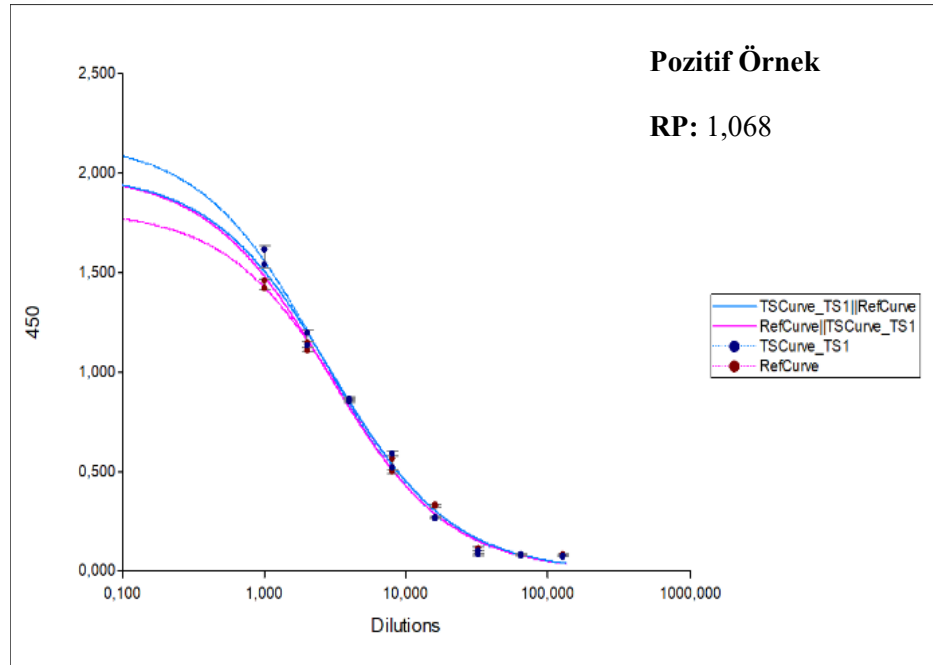


Şekil-6: Çalışmada kullanılan aşıların RP sonuçlarının dağılımı

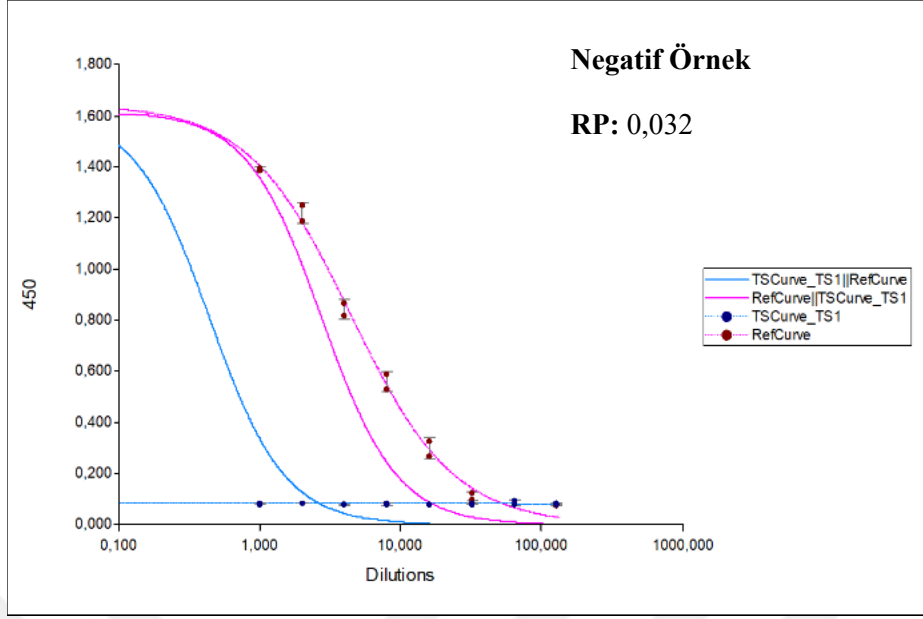
Her iki test metodu ile de, test kabul kriterini karşılayan örneklere 1 (bir), karşılamayan örneklere 0 (sıfır) verildiğinde, iki metot ile alınan pozitif ve negatif sonuçların birbirine korelasyonu kuvvetli ($r=0,8819$) olarak bulunmuştur.



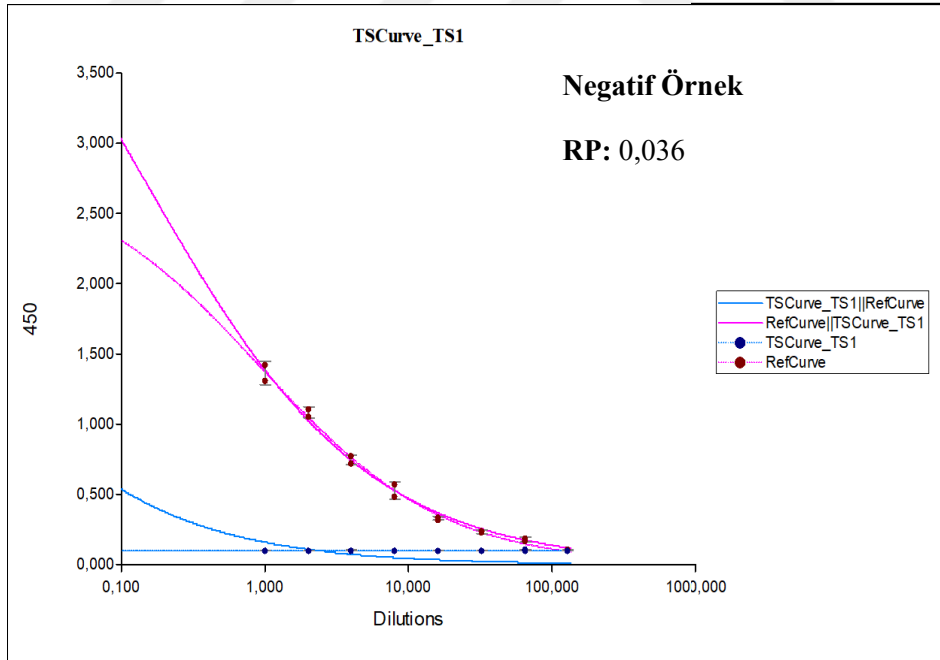
Şekil 7: Yüksek relatif potense sahip aşuya ait bir grafik



Şekil 8: Düşük relatif potense sahip bir aşuya ait grafik



Şekil 9: *C. chauvoei* komponenti içermeyen klostridial aşıya ait grafik



Şekil 10: Klostridial komponent içermeyen inaktif bir aşıya ait grafik

4.3. Pre-Validasyon Verileri

Çalışılan 20 örnek üzerinde (15 adedi *C. chauvoei* komponenti içeren, 5 tanesi içermeyen) ELISA metoduyla alınan doğru ve yanlış sonuçlar Tablo 6’de gösterilmiştir.

Tablo 6: ELISA testi doğru ve yanlış cevap dağılımı

ELISA Test Sonuçları			
Gerçek Durum	Pozitif	Negatif	Toplam
Pozitif	DP (14)	YN (1)	DP+YN (15)
Negatif	YP (0)	DN (5)	YP+DN (5)
Toplam	DP+YP (14)	DN+YN (6)	

DP: Doğru pozitif, YN: Yanlış negatif, YP: Yanlış pozitif, DN: Doğru negatif

4.3.1 Sensitivite (Duyarlılık)

C. chauvoei içeren ve kobay epruvasyon testi ile protektif yanıt gösteren 15 adet aşından 1’i ELISA prosedürü ile yanlış negatif sonuç vermiştir. ELISA prosedürünün sensitivitesi (doğru pozitif analiz sayısının, pozitif sonuçların toplamına oranı) %93,33 olarak belirlenmiştir. Negatif sapma (yanlış negatif cevap oranı) %6,67’ye karşılık gelmektedir.

4.3.2 Spesifite (Özgüllük)

C. chauvoei komponenti içermeyen ve doğal olarak, epruvasyon testinde protektif yanıt vermeyen aşılardan tümünde ELISA testi ile yanlış pozitif reaksiyon (pozitif sapma) gözlenmemiştir, bu nedenle doğru negatif analiz sayısının negatif sonuçların toplamına oranını ifade eden spesifite %100 olarak belirlenmiştir.

4.3.3. Relatif Doğruluk (Efektiflik)

ELISA ile çalışılan örnekler üzerinde alternatif metotla elde edilen pozitif ve negatif doğru sonuç sayısının toplam örnek sayısına oranını ifade eden relatif doğruluk oranı araştırmada %95 olarak bulunmuştur.

4.3.4. Tekrarlanabilirlik

Veri setinden seçilmiş 6 farklı ürünün farklı zamanlarda çift örnekler halinde çalışılması sonucunda; aynı günde, aynı pleyt üzerinde çalışılan çift örneklerin kendi içindeki OD değerleri arasındaki varyasyon katsayısı (relatif standart sapma yüzdesi) çalışılan tüm zamanlarda genel olarak %10'un altında bulunmuştur. Sadece 1 çalışmada (36 çalışma içinden) % 11,375 varyasyon alınmıştır. Çalışılan örneklere göre alınan en yüksek pleyt içi varyasyon düzeyleri (% CV) Tablo 7'te özetlenmiştir (Crowthwer, 2009; Arslan ve ark, 2015).

Tablo-7: ELISA prosedüründe pleyt içi OD varyasyon katsayısı (% CV)

% CV	Val-1	Val-2	Val-3	Val-4	Val-5	Val-6
1.gün	%4,562	%5,557	%3,238	%3,513	%5,131	%1,180
2.gün	%11,375	%3,873	%3,015	%2,463	%6,818	%4,441
3.gün	%8,686	%0,922	%4,313	%4,625	%1,756	%8,686
4.gün	%4,625	%5,504	%0,591	%6,973	%1,157	%4,313
5.gün	%6,062	%7,912	%2,338	%1,696	%1,252	%1,495
6.gün	%5,891	%3,873	%4,313	%1,181	%1,696	%6,267

4.3.5 Tekrar Üretilirlik

Bu çalışmadaki tekrar üretilebilirliğin ortaya konması amacıyla *C. chauvoei* içeren 6 örnek, 6 farklı zamanda (günde) referans ürünle birlikte test edilmiş ve relatif potens değerleri belirlenmiştir. Aynı örneğin farklı günlerdeki hesaplanan relatif potens sonuçları dikkate alınarak, sonuçlar arasındaki varyasyon katsayısı belirlenmiştir (Tablo 8). Bir örnek hariç (ki bu örnekte varyasyon katsayısı %21 dolayında seyretmiştir) genelde %15'in altında bir varyasyon elde edilmiştir (Crowthwer, 2009; Arslan ve ark, 2015).

Tablo-8: *C. chauvoei* ELISA metodunun tekrarlı ölçümlerindeki varyasyon katsayısı (% CV)

	Val-1	Val-2	Val-3	Val-4	Val-5	Val-6
1.gün	5,660	1,689	4,237	2,232	1,798	4,642
2.gün	5,640	1,453	3,627	3,183	1,748	5,078
3.gün	5,961	2,202	4,147	2,858	2,213	4,187
4.gün	5,612	1,374	4,386	3,298	1,752	4,741
5.gün	4,936	1,284	3,070	2,900	1,792	3,814
6.gün	5,401	1,405	3,964	3,462	2,350	4,533
Ortalama	5,535	1,429	4,0555	3,0415	1,795	4,5875
% CV	%11,8	% 21,6	% 12,4	% 14,6	% 13,7	% 9,8

5. TARTIŞMA

Yanıkara hastalığı başta sığır ve koyun olmak üzere çeşitli hayvan türlerinde ekonomik kayıplara neden olan son derece önemli bir hastalıktır. Hastalığı etkeni olan *C. chauvoei* gram pozitif hareketli spor oluşturabilen anaerobik bir bakteridir. Yanıkara tüm dünyada yaygın bir hastalıktır. Zoonotik olmamasına rağmen sporadik insan enfeksiyonlarının görüldüğü bildirilmiştir (Nagano ve ark, 2008; Weatherhead ve Tweardy, 2012). Tipik olarak enfeksiyon, çizgili ve kalp kaslarında miyelonekroza neden olarak perakut ölüm ile karakterizedir. Sığırlarda hastalık travmatik olmayan endojen bir enfeksiyon olarak ortaya çıkmaktadır. (Hatheway, 1990). *C. chauvoei* sığır ve koyunlar yanında geyik, domuz, at, deve kuşu, kedi ve köpek gibi türlerden hastalık etkeni olarak izole edilmiştir. Tavşan, fare ve güvercin ise bu hastalığa karşı dirençli türlerdendir (Useh ve ark, 2006b).

Hastalığın hızlı seyir göstermesi ve yüksek oranda ölüme yol açması nedeniyle hastalıkla mücadelede pratikte, tedavi hekimliğinden ziyade koruyucu hekimlik önem kazanmaktadır. Koruyucu hekimlik uygulamaları arasında ise; hijyen kurallarının uygulanması, bakım ve besleme koşullarının iyileştirilmesi, asepsi ve antisepsi uygulamalarından öte, hastalığın patogenezesinde kontamine meraların rol oynaması nedeniyle aşılama ön plana çıkmaktadır. Günümüzde Yanıkara hastalığından korunmada inaktif karakterde tüm mikroorganizma gövdesini ve/veya flagellar antijenleri içeren bakterin aşılar kullanılmaktadır. Aşılar genellikle ilk uygulamada iki doz halinde uygulanmakta, sonra her yıl tekrarlanan tek bir booster doz ile bağışıklığın devamı sağlanmaktadır. Hastalığın yoğun görüldüğü bölgelerde aşılamanın 6 ayda bir yapılması da önerilmektedir. Aşı uygulaması Yanıkara hastalığından korunmada tüm ruminant türlerinde iyi sonuçlar vermektedir. Bu nedenle ülkemizde de farklı klostridial enfeksiyonlara yönelik monovalan ya da değişken kombinasyonlar halinde polivalan nitelikte *C. chauvoei* içeren aşılar yaygın olarak kullanılmaktadır (Songer ve Post, 2012; Markey ve ark, 2013).Günümüzde *C. chauvoei* aşılarının potansininin belirlenmesi; immunize edilen hayvanlarda patojen kültürle epruvasyon uygulanması prensibine bağlı in vivo bir metota dayanmaktadır. (EDQM, 2017b, USDA APHIS, 2017a). Bu amaçla kobayların kullanılabilceği Crichton ve arkadaşları (1986) tarafından gösterilmiştir. Bu araştırmacılar tarafından; *C. chauvoei* komponenti içeren 5 komponentli 12 ticari klostridial aşı, eş zamanlı olarak koyun ve kobaylarda test edilmiş, kontrollü olarak yapılan epruvasyon testlerinde, iki türün immunojenik yanıtının oldukça anlamlı bir korelasyon gösterdiği ($r= 0,720$) tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda kobay

laboratuvar hayvanı modelinin, Yanıkara antijeni içeren aşuların potens denemeleri için uygun olacağı sonucuna varılmıştır. Bu test immunizasyon ve epruvasyon prosedürleri sırasında uzun zaman gereksinimi duyulan, çok sayıda deney hayvanı kullanımına bağlı bir test (yöntem) olup, test sonuçlarının değerlendirilmesi deney hayvanlarındaki letalite ya da spesifik semptomların gözlenmesi prensibine dayanmaktadır. Standart bir metot olmakla birlikte, bu karakterdeki tüm test metotlarında olduğu gibi, test süresinin uzun olması, çok sayıda deney hayvanı kullanımına ihtiyaç duyulması, hayvanların bireysel kondüsyonlarının test sonuçlarını etkileyebilmesi ve hayvan refahı yaklaşımları açısından kabul görmeyen prosedürler arasında bulunmaları nedeniyle uygulamada alternatif yaklaşımlar önem kazanmaktadır.

Hayvan refahı konusunda giderek önem kazanan bu yaklaşımlar; alternatif metotların uygulamaya aktararak yaygın deney hayvanı kullanımı olmaksızın, aşuların potensinin belirlenmesinde, alternatif in vitro prosedürlerin araştırıldığı bir anlayışın ortaya çıkmasını ve gelişimini tetiklemiştir. Bu yaklaşım 3R konsepti (refinement, reduction, replacement) olarak bilinir, hayvansal prosedürlerin kaldırılması, hayvan sayılarının azaltılması ve hayvan modellerinin in vitro metotlarla yer değiştirmesini kapsamaktadır (Erbaş ve Kaya, 2011; Hendriksen, 2009; Hill, 2011; Kulpa-Eddy ve ark, 2011; Stokes ve ark, 2011). Bu konseptin uygulanması yönündeki kararlılık, yetkili otoriteler ve endüstriyel uygulayıcılar düzeyinde de yaygın destek görmüştür. Alternatif metotların geliştirilmesi ve validasyonlarının yapılması konusunda başta EDQM (Avrupa İlaç Kalite ve Sağlık Hizmetleri Direktörlüğü) olmak üzere çeşitli uluslararası dünya sağlık kuruluşlarının desteklediği çalıştay, sempozyum ve işbirliği çalışmaları yürütülmüş, yasal çerçeveyi düzenleyen değişiklikler yapılmıştır (EDQM, 2008; Romberg ve ark, 2011). Hayvan deneylerine alternatif testlerin kullanılması amacıyla Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) işbirliği ile AB içinde Avrupa Alternatif Metotların Validasyonu Merkezi (ECVAM) kurulması sağlanmıştır. ECVAM alternatif metotlar konusunda çalışmalar yaparak bilim adamları, Ulusal Kontrol Laboratuvarları, üretici firmalar arasında koordinasyonu sağlamıştır (EDQM, 2008).

Alternatif metodolojilerin geliştirilmesi konusunda özellikle veteriner sahada Kuduz, Pastörelloz, Leptospiroz Şap, klostridial ve Newcastle aşuları öncelikli konular içinde değerlendirilmiştir (Wood, 1991; Stokes ve ark, 2011; Salama ve ark, 2014; Sigoillot-Claude ve ark, 2015; Chabaud-Riou ve ark, 2017). Bu metotlar içinde; immunize edilmiş hayvanların serum örneklerinde ELISA prosedürleri, hücre kültüründe yapılan serolojik tabanlı çalışmalar ile aşıdaki hücresel ya da flagellar antijen miktarının ölçülmesine yönelik immunokimyasal metotlar kullanılmıştır (Stokes ve ark, 2011). Özellikle antijen içeriğinin tayinine ve

belirlenen antijen miktarının referans bir ürünle kıyaslanarak relatif potensin tespitine yönelik geliştirilen metotlar deney hayvanı kullanımı yanında, immunizasyon sürecine olan gereksinimi de ortadan kaldırmakta olması nedeniyle oldukça önemli avantajları beraberinde getirmektedir. Bu bakımdan yürütülen bu çalışma, hem öncelikli alanlar içinde yer alan klostridial aşı suşlarından *C. chauvoei*'yi kapsamaları, hem de immunizasyon ve deneme hayvanı gereksinimini ortadan kaldıracak alternatif bir prosedürün uygulanabilirliğinin araştırılması açısından değer taşımaktadır.

Clostridia türleri, *C. perfringens* hariç somatik antijen yanında, flagellar antijen içerir (Arda ve ark, 1999). *C. chauvoei*'nin flagellar antijenlerinin protektif yanıtta önemli olduğu ve immun yanıt mekanizmalarını harekete geçirdiği bilinmektedir (Tamura ve ark, 1984; Tanaka ve ark, 1987). Korumada rol oynayan epitoplara tür spesifik olup, flagellar filamentlerin yüzeyinde sergilenmektedir (Tamura ve ark, 1992). Farelerde nonflagellar mutant *C. chauvoei* suşlarının flagellar parent suşlardan 100 kat daha az koruyucu immunojenite gösterdiği görülmüştür (Tamura ve Tanaka, 1984). Bu nedenle kısmen ya da tamamen purifiye edilmiş flagellar antijenlerin sığır ve koyunlarda Yanıkaraya karşı aşı hazırlamada kullanıldığı bilinmektedir. *C. chauvoei* flagellar epitoplarına karşı hazırlanmış monoklonal antikolar, flagellar antijenlerin ELISA ile ortaya konulmasında kullanılmaktadır (Tanaka ve ark, 1987). Bu bakımdan *C. chauvoei*'ye karşı koruyucu yanıtın ölçülmesinde, söz konusu yanıtın ortaya çıkmasında rol oynayan flagellar antijen miktarının belirlenmesi önemli olduğundan, araştırmamızda ELISA pleytlerinin kaplanması *C. chauvoei* flagellar proteinine spesifik monoklonal antikolar (IgG) kullanılmıştır.

Relatif potens, komperatif çalışmalarda önemli bir kavramdır. Özellikle Toksikolojide doz yanıt çalışmalarında ve immunolojik ürünlerin bilinen bir ürüne göre etkinliğinin değerlendirilmesinde relatif potens çok kullanılır. Buradaki temel yaklaşım bir ürünün doz ya da potensinin, diğer ürünün eşik kabul edilen doz veya potensi esas alınarak eşdeğer bir dönüşüm aracılığı ile hesaplanmasıdır. Bu anlamda relatif potens, doza bağlı yanıtı ortaya koyan tipik bir matematiksel parametredir. Her bir test örneğinin referansa benzer şekilde dilue edilmesiyle, dilüsyon noktalarında alınan yanıtın referansa benzer bir eğim ile sabit bir oranda değişimi klasik relatif potens kavramını oluşturur. Bu hesaplama; eğim oranı analizleri, paralel doğru analizleri veya benzer sigmoid eğri analizleri ile ortaya konur (Siev, 1997; Dinse ve Umbach, 2011). Bu araştırmada relatif potensin hesaplanmasında paralel doğru analizi, dört parametrelili lojistik eğri modeli kullanılmıştır. Dört parametrelili lojistik regresyon kompleks biyolojik sistemler için daha uygun bir model olup, ELISA veri analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Karli ve Rippke, 2015). Relatif potens serbest

bırakma limiti $RP \geq 1$ olarak alınmıştır. Bu düzey; %95 güven düzeyinde 0,95-1,05 açıklığında bir aralığı tanımlamaktadır.

Avrupa Farmakope (EDQM, 2008; EDQM, 2017a) biyolojik ürünlerin potens testlerinde uygun bir immunositokimyasal ya da hücre kültürü metodunun kullanılabilceğini belirtmektedir. Antijenlerin antikorlarla seçici (selektif), geriye dönüşümlü (reverzibl) ve kovalent olmayan (non-kovalent) bir şekilde bağlanmasını esas alan immunositokimyasal metotlar antijen ya da antikorları saptamak ya da miktarını ölçmek için kullanılmakta, bu amaçla antijen-antikor kompleksi oluşturularak, oluşan kompleksin miktarı çeşitli prosedürler ile belirlenebilmektedir. Bu tür metotların; laboratuvar koşullarında uygulanabilmesi, kolay standardize edilebilmesi, hayvan kullanımını azaltması ya da tamamen ortadan kaldırması, in vivo prosedürlerdeki test hayvanlarının biyolojik durumlarından kaynaklanan belirsizliklerin bertaraf edilmesi, uygulama ve iş gücü kolaylığı ile test sürelerinin kısaltılması gibi çeşitli avantajları olduğu bilinmektedir. Bu avantajlar ile hayvan refahı konusundaki giderek artan hassasiyet; aşılarda potensinin belirlenmesinde alternatif metotların uygulamaya aktarılması konusundaki gelişimi tetiklemiştir. Son yıllarda artan endüstriyel üretim, ürün çeşitliliği, kalite anlayışı ve kontrol süreçlerinin kısaltılmasına yönelik politikalar da hayvansal modeller üzerinde yapılan in-vivo testlere alternatif serolojik tabanlı testler ve hücre kültürlerinin kullanımını esas alan in-vitro metot geliştirme çalışmalarını hızlandırmıştır. (Hendriksen, 2009; Hill, 2011; Erbaş ve Kaya, 2011). Ancak bu metotların uygulamaya aktarılmadan önce geçerliliğinin kanıtlanmış olması gerekmektedir. Validasyon nitelikleri olarak farmakopede; antijen ya da antikorun standart ve test örnekleri arasında önemli bir farklılık yaratmaması, matriksten etkilenmemesi, kabul kriterinin altında tespit limitine sahip olması, sonuçlardaki varyansa işaret eden analiz kesinliğinin beklenen gereklilikleri karşılaması ve sistematik hataya neden olmaksızın analizlerin uygulanabilmesi tanımlanmaktadır. Bu amaçla analizin en az 3 defa tekrarlanması ve 3 farklı dilüsyonda çalışılması önerilmekte, analizlerin rasgele yapılması, test örneklerinin standart örneklerde olduğu gibi işlem görmesi ve sonuçların uygun istatistiksel yöntemler ile değerlendirilmesi beklenmektedir (EDQM, 2017a). Benzer şekilde; USDA Veteriner Biyolojik Merkezinin (CVB) *C. chauvoei* içeren ürünlerin in vitro seri serbest bırakma potens testleri ile ilgili kılavuzunda da ELISA testlerinin minimum 2 operatör tarafından, 3 seride 3 tekrarlı çalışma (toplam 18 test) ile valide edilmesi, spesifite, tekrarlanabilirlik, korelasyon verileri ile önerilen serbest bırakma limitindeki antijen içeriğine karşı doz-yanıt ilişkisinin gösterimi önerilmektedir (USDA APHIS, 2017b). Bu araştırma da, uygulanan ELISA metodunun ön geçerliliğinin (prevalidasyon) belirlenmesi amacıyla; yalancı pozitif reaksiyonlar için ayrıca test edilen negatif örnekler (ki bunlar; aynı ya da farklı

grup mikroorganizmaları barındıran biyolojik ürünlerden hazırlanmıştır) hariç, farklı konsantrasyonda 6 farklı örnek, eşik düzeyde antijen içeren referans ürün ile birlikte, 6 farklı zamanda, her pleytte çift çalışma şeklinde tekrarlanarak (toplam 72 test) yürütülmüştür. Analizler rastgele bir sırada yapılmış, her pleytte örneklerle birlikte referans kabul edilen ürün aynı zamanda ve aynı şekilde işlem görmüştür. ELISA prosedürünün spesifite, sensitivite, relatif doğruluk, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik verileri yanında, minimum antijen içeriğine sahip referansa göre alınan doz yanıt ilişkisinin değerlendirilmesini de kapsayacak şekilde epruvasyon testine göre korelasyonu (başarılı ve başarısız serilerin karşılaştırılması) gösterilmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu yaklaşım uluslararası standartlardaki (DeHaven, 2003; Ludemann ve Hyde, 2015; EDQM, 2017a; USDA APHIS, 2017b) gereksinimlerle örtüşmektedir.

Avrupa Alternatif Metotların Validasyonu Merkezi (ECVAM) yeni metotların değerlendirilmesi ve uygulamaya aktarılmasında; test geliştirme, prevalidasyon, validasyon, bağımsız değerlendirme ve düzenleyici otorite tarafından onay verilmesi şeklinde 5 evre tanımlamış, bunlardan prevalidasyon aşamasının yeni bir metodun karakterizasyonunda önemli bir bileşen olduğu, çalışılan laboratuvarlarda metod optimizasyonunun sağlanması ve performansının ortaya koyulması ile metodun sağlamlığı, tekrarlanabilirliği ve spesifikliğin gözlenmesi açısından değerli olduğu belirtilmiştir (Curren ve ark, 1995). Bu açıdan dikkate alındığında, yürütülen bu araştırma, yeni metotlarla ilgili ECVAM tarafından ifade edildiği gibi, *C. chauvoei* aşılarının flagellar antijen miktarının belirlenmesi ve referans bir aşıya göre relatif potensinin hesaplanmasına dayanan alternatif ELISA prosedürünün prevalidasyonuna karşılık gelmekte olup, laboratuvar şartlarında metodun uygulanabilirliği, standart prosedüre eşdeğerliliği, aynı örneklerde benzer sonuçların alınabilme yeteneği ve optimizasyonundaki hususların değerlendirilmesi açısından önemlidir.

Yürütülen bu araştırma metod optimizasyonu yönünden iki hususun önemli olabileceğine işaret etmektedir. Birincisi referans aşının oluşturulması ve karakterizasyonundaki güçlüklerdir. Referans aş, epruvasyon testi ile geçer sonuç veren minimum antijen içeriğine sahip ürünü ifade ettiğinden (DeHaven, 2003), test edilen örneklerdeki flagellar antijen miktarının kabul edilebilir sınırlarda olup olmadığı doğrudan belirlenen referans ürüne bağlıdır. Ancak farklı ticari firmalara ait, farklı kombinasyon ve üretim teknolojisi ile üretilmiş, ayrıca farklı karakterde ve miktarda değişik adjuvantlama prosedürlerinden geçmiş ürünlerde, bu olası faktörlere bağlı olarak ELISA prosedüründe birbirine göre üniformite göstermeyen farklı sonuçlar verebildiği gözlenmiştir. Elde ettiğimiz bu bulgu; USDA Veteriner Biyolojik Merkezinin (CVB) ilgili kılavuzunda kritik kontrol

noktası olarak verilen referans ve test serilerinin aynı adjuvant ile adjuvantlanmış ve hatta ideal olarak da, aynı üretim hattında üretilmiş ürünler olması gerekliliğini doğrulamaktadır (Ludemann ve Hyde, 2015). Bu nedenle standart tek bir referans ürün oluşturulamadığı durumda, aynı ticari isimli ürünün epruvasyon testi ile minimal antijen içeriği ortaya konmuş bir referans ile test edilmesi önem göstermektedir. Bir diğer husus antijenin saflaştırılması ve adjuvanttan ayrılması için kullanılan elüsyon prosedürü ve ticari ürünlerin buna verdiği yanıtlardaki değişkenliktir. Bazı bakterinler antijen elüsyon işlemine ihtiyaç duymaz iken, bazı diğer bakterinler farklı elüsyon tekniklerinin (sodyum sitrat, fosfat buffer, sonikasyon gibi) farklı süre ve dozlarda uygulanması ile spesifik bir şekilde flagellar proteinin yakalanması zenginleşebilmektedir. Bu sonuç da; örneklerin hazırlanmasında temsili serilerin farklı antijen elüsyon uygulamaları ve uygulama yapılmaksızın test edilmesini öneren Veteriner Biyolojik Merkezinin (CVB) test protokolü ile örtüşmekte, hatta bu protokolde alternatif antijen elüsyon prosedürlerinin geliştirebileceği de ifade edilmektedir (Ludemann ve Hyde, 2015). Bu bakımdan ilgili literatürü destekler şekilde, farklı biyolojik ürünlerde, farklı yöntemler ile sonuç alınabildiğinin gözlemlenmesi nedeniyle, veri setine dahil edilen her ürün için antijenin yakalanmasını arttıran prosedürler test edilmiş ve ürün bazında en uygun olduğuna karar verilen prosedür ile işleme devam edilmiştir. Bu farklılığın adjuvantın karakteri, miktarı, flagellar antijenin saflaştırılmış ya da bakteri gövdeleriyle birlikte bulunması, aşı hazırlanmasında kullanılan mikroorganizmanın pasaj geçmişi, diğer yardımcı moleküllerin tipi ve miktarı, pH değişkenlikleri ve üretim teknolojisindeki farklılıklar gibi birçok olası nedenden ileri gelebileceği değerlendirilmektedir. Rinealla ve ark (1998) tarafından yapılan bir araştırmada da alüminyum içeren adjuvantlardan model antijenlerin elüsyonunda pH'nın etkisi araştırılmış ve pH'nın proteinin ionizasyonunu, adjuvantın çözünürlüğü ile adjuvant ve protein arasındaki elektrostatik etkileşimi etkilediği bildirilmiştir. Çok sayıda inaktif veteriner aşıda, özellikle de bakteriyel olanlarda, antijen miktarının başarılı bir şekilde ölçümündeki kilit zorluğun koruyucu antijenin kimliğinin tanımlanması yanında aşı formülasyonlarında kompleks adjuvanların kullanılması olduğunun ifade edilmesi (Hendriksen, 2009; Kulpa-Eddy ve ark, 2011) araştırmamızda metodun standardizasyonunun sağlanması işlemlerinde ürün bazında karşılaşılan güçlüklerle vurgu yapması bakımından değerlidir.

Farklı klostridial komponentler üzerinde yapılan değişik araştırmalar ve laboratuvarlar arası karşılaştırma testlerinde hayvan deneyleri yerine in-vitro metotların uygulanabilir olduğunu destekleyen veriler sunulmuş, alternatif metotların standart kabul edilen yöntemlere paralel sonuçlar verdiği ve elde edilen sonuçların spesifik, sensitif ve tekrarlanabilir olduğu

gösterilmiştir. Ayrıca bu metotların daha hızlı uygulanabilir olması, iş gücünü azaltması, ekonomik olması, çevresel faktörlerin kontrol altında tutulabilmesi, hayvanların biyolojik kondisyonundan etkilenmemesi ve hayvan refahı uygulamalarına katkı sağlaması gibi avantajları da bulunmaktadır. El-Helw ve arkadaşları (2012), Yanıkara ve Gazlı Gangren aşısının immünojenitesinin değerlendirilmesi için bir in-house ELISA metodunu diğer geleneksel metotlar olan plak aglütinasyon ve hemolizin ile kıyaslamasını yapmışlar, bu çalışma sonucunda *C. chauvoei* ve *C. septicum* için potens testinin ELISA ile yapılabileceğini, bu prosedürün hassasiyet, duyarlılık, hız ve hayvan refahı göz önüne alınarak geleneksel değerlendirme yöntemlerinin yerini alabileceğini bildirmişlerdir. Paul-Ehrlich Enstitüsünde yapılan bir çalışmada *C. perfringens* epsilon toksine özel mAb kullanılarak indirekt kompetatif ELISA metodu ile farklı kompozisyonda aşılar kullanılarak, tavşan serumlarında oluşan antikörlerin belirlenmesi konusunda yedi farklı laboratuvar arasında karşılaştırma testi yapılmış, ELISA metodunun daha sensitif, spesifik ve tekrarlanabilir olduğunu gösterilmiş ve araştırmacı bu metodun TNT yerine tercih edilebileceği belirtmiştir (Roskopf, 2003). Türkiye’de Arslan ve arkadaşları (2016), veteriner klostridial aşuların potens testlerinde, kullanılan ve in-vivo metot olan TNT yerine, in vitro ELISA metotlarının alternatif yöntemler olarak başarılı bir şekilde kullanılabilceğini göstermişlerdir. Ayrıca araştırmacılar ELISA metotlarının spesifite ve sensitivesinin yüksek olduğunu ve tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliğinin kabul edilebilir sınırlar içinde olduğunu ifade etmişlerdir. Bu konuda Wood (1991) tarafından yürütülen, *C. perfringens* tip D epsilon, *C. novyi* tip B, *C. septicum* ve *C. tetani* üzerine bir çalışma da; antitoksin düzeylerinin belirlenmesi için mültivalan koyun aşularında TNT’ne alternatif olarak ELISA prosedürlerinin kullanımı araştırılmış, çalışmada her 4 komponent için de ELISA ve TNT testleri arasında iyi bir korelasyon alınmış, aşı serilerinde ELISA ile TNT’dekine benzer başarılı ve başarısız sonuçlar elde edilmiştir. Avustralya’da yapılan bir çalışmada *C. chauvoei* aşılarının oluşturduğu immun yanıtı ölçmek için epruvasyon testine alternatif ELISA metodu geliştirilmiş, tavşanlardan elde edilen serumlardan yapılan ELISA metodunun önemli avantajları bulunduğu bildirilmiştir (Crichton ve ark, 1990). Klostridial aşular dışında Kuduz, Newcastle, Leptospiroz ve Domuz erisipeli gibi farklı viral ve bakteriyel aşular üzerinde de benzer başarılı sonuçların alındığı araştırmalar bulunmaktadır. Örneğin USDA tarafından inaktif domuz erisipel aşısında in vitro ELISA potens testi yayınlanmış, EDQM tarafından inaktif Newcastle aşuları için in vitro bir test geliştirilmiş, valide edilmiş ve onaylanmıştır (Kulpa-Eddy ve ark, 2011). Fransa’da yapılan bir çalışmada; inaktif Kuduz aşılarının potensinin belirlenmesinde, klasik metotlara alternatif olarak Kuduz virüsünde bulunan

glikoprotein G'yi hedef alan bir ELISA metodu kullanılmış ve bu testin klasik HIM testine göre 3R prensiplerine daha uygun olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca testin daha spesifik ve ucuz olduğu bildirilmiş, glikoprotein G'yi hedef alması nedeniyle farklı Kuduz aşılarının potens testinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Sigoillot-Claude, 2015). Benzer şekilde Chabaud-Riou ve ark (2017)'ları Kuduz aşılarının potens testinde kullanılan NIH testine alternatif bir ELISA metodu geliştirmişler ve bu metodun yüksek spesifikite, doğruluk ve kesinlik ile G-protein miktarını ölçebildiğini göstermişlerdir. Benzer bir yaklaşımla Fransa'da, equine Kuduz antiserumların potens testinde fare nötralisasyon testine alternatif bir kompetatif ELISA metodu geliştirilmiş, optimizasyon sonrasında hayvan türlerinde Kuduz immunoglobulinlerinin miktarının belirlenmesinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Korimbocusa ve ark, 2016). *Pasteurella multocida* aşılarında Salama ve ark (2014)'ları, epruvasyon testi ve ELISA prosedürünü karşılaştırmışlar, iki test arasında yüksek korelasyon bulunduğunu bildirerek epruvasyon testine alternatif olarak ELISA metodunun kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Aşıların potensinin belirlenmesine yönelik olarak yapılan bu in vitro araştırmalar, sadece ELISA prosedürleri ile sınırlanmamış, farklı antikor bağlama yöntemleri (ToBI, RFFIT veya FAVN testi gibi), hücre kültürü metotları ve radyal immunodifüzyon testleri de kullanılmıştır (Kulpa-Eddy, 2011; Redhead ve ark, 2011; Romberg ve ark, 2011). *C. chauvoei* konusunda spesifik örnekler pek bulunmamakla birlikte, inaktif bakteriyel aşılardaki koruyucu antijenin ölçülmesi ve uygun kalifiye edilmiş referans bir antijenle mukayese edilmesini esas alan spesifik ELISA ölçüm metotları geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Bu kapsamda *C. chauvoei* aşılarında flagellar protein miktarının ölçümü konusunda Japonya'da yapılan bir araştırmada, monoklonal ve poliklonal anti-flagellar antikorlar kullanılarak bir ELISA metodunun geliştirilmesi ve fare koruma testi ile karşılaştırılması neticesinde, ELISA metodunun aşı üretimi sırasında flagellar protein miktarını ölçmek için kullanılabileceğinin bildirilmesi önemli bir sonuçtur (Kijima-Tanaka ve ark, 1997). Bunun yanında; 65 kDa proteini için *Erysipelothrix rhusiopathiae*, K99, K88, 987P ve P41 pilus antijenlerine karşı *Escherichia coli* ve *Leptospira interrogans* serotiplerine (*L. pomona*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa* ve *L. icterohaemorrhagiae* gibi) karşı çeşitli relatif potens belirleme çalışmaları da yer almaktadır. İnaktif NDV aşılarında invitro ELISA antijen ölçüm prosedürünün geliştirilmesi ve EDQM tarafından doğrulanması önemli bir gelişmedir (Kulpa-Eddy, 2011). Ayrıca USDA Veteriner Biyolojik Merkezi (CVB) tarafından *C. chauvoei* aşılarında flagellar antijen içeriğinin belirlenmesini esas alan bir ELISA test monografını da yayınlanmıştır (Ludemann ve Hyde, 2015). İn vivo bir analizden in-vitro bir analize başarılı

bir dönüşüm; antijen içeriği ile antikor yanıtı arasında güçlü bir korelasyon olduğu gerçeğine yardımcı olmaktadır. Bu araştırmadaki veriler de, tüm benzer çalışmalarını destekler nitelikte, inaktif *C. chauvoei* aşısındaki antijen içeriği ile uygulandığı türlerde ortaya çıkacak immun yanıt arasında korelasyon bulunduğunu ve alternatif prosedürün epruvasyon testlerine eşdeğer kabul edilebilecek sonuçlar verdiğini göstermektedir. Ancak referans oluşturma ve metod optimizasyonları konusunda güçlükler göz ardı edilmemelidir. Belirgin avantajlarına ve AF monograflarında teşvik edici yayınlara rağmen (DeHaven, 2003), bu konuda doğrulanmış az sayıda analiz bulunması, referans bulma ve standardizasyondaki problemler, çalışmaların uzun yıllar alması (örneğin inaktif NDV aşılarında 10 yıl kadar sürmesi), uluslararası işbirliği çalışmalarına ihtiyaç bulunması ve uygulamada isteğe bağlı tercih edilmesi gibi gerekçelerle aşı üreticileri ve kontrol otoriteleri tarafından serbest bırakma prosedürleri olarak yaygınlığı tartışmalıdır.

ELISA uygulayan kişiler için, örnek tekrarları arasında düşük bir varyasyon katsayısına (%CV) sahip olmak, bir analizin iyi çalıştığını ve sonuç olarak elde edilen verilerin kesin ve tekrarlanabilir olduğunu göstermek için çok önemlidir. Analiz sonuçlarının güvenilirliği varyasyon katsayısı gibi standartize edilmiş ölçümlerle değerlendirilir. ELISA verilerinin yorumlanmasında; ele alınan popülasyondaki değişkenliğin düzeyini ifade eden varyasyon katsayısı oranının yüksek olması çalışmadaki tutarsızlıkları vurgulaması açısından önemlidir. İmmuno-analiz sonuçlarının kesinliğinin sergilenmesinde analiz içi (pleyt içi) ve analizler arası (pleytlar arası) varyasyon olmak üzere iki tip varyasyon katsayısı kullanılır. Analiz içi varyasyon bir analizdeki veri noktaları arasındaki değişkenliğin ölçümü olup, analizin tekrarlanabilirliğini ifade eder. Analizler arası varyans ise aynı örneğin farklı zamanlarda ve farklı pleytlerdeki alınan sonuçları arasında ortaya çıkan varyasyonu gösterir ki bu varyans metodun tekrar üretilebilirliğini ifade eder. Genel bir kılavuz olarak, analiz içi varyasyonun %10'un, analizler arası varyasyonun %15'in altında olması beklenmektedir (Crowther, 2009; Arslan ve ark, 2015). Bu araştırmada da analiz içi varyasyonun genel olarak %10'un, analizler arası varyasyon ise %15'in altında kalması, ELISA metodunun kesinliğinin kabul edilebilir sınırlar içinde seyrettiğini göstermektedir. Çok üzerinde olmamakla birlikte, pleyt içi ve pleytlar arası birer örnekte limit spesifikasyonların biraz dışında (sırasıyla %11,38 ve %21,60) sonuçlar alınması pipetleme hatası, kuyucuklar arasında reaktiflerin sıçraması, kuyucukların kuruması, pleyt, örnek ya da reaktiflerin kros-kontaminasyonu ve biyolojik materyallerin dondurma-çözdürme döngülerinden kaynaklanan değişiklikler gibi farklı faktörlere bağlı ortaya çıkan sonuçlar olması muhtemeldir.

ELISA prosedürlerinde yalancı pozitif veya yalancı negatif sonuçlar alınmaması, testin spesifite ve sensitivitesi açısından önemli olup, alınan sonuçların doğruluğunu göstermektedir. Farklı komponentler üzerinde, antijene spesifik monoklonal antikorlar kullanılarak yapılan alternatif ELISA prosedürlerinde alınan sonuçlarda (Verma ve ark, 2009; Romberg ve ark, 2011; Arslan ve ark, 2015) olduğu gibi, bu araştırmada da flagella spesifik monoklonal antikorları kullanılarak *C. chauvoei* antijen miktarını ölçmek için kullanılan indirekt double sandviç ELISA prosedürünün oldukça spesifik ve sensitif sonuçlar verdiği görülmüştür. Çalışılan bir pozitif örnekte negatif sonuç alınmasının, uygulanan antijen ayrıştırma prosedürlerinin etkisizliğinden ileri gelebileceği, bu bakımdan metodun iyileştirilmesi için ürüne spesifik antijen ayrıştırma metodolojilerine ihtiyaç olabileceği değerlendirilmektedir. Benzer bir bulgu, Arslan ve ark (2015) tarafından *C. perfringens* epsilon antitoksin çalışılan serum örneklerinde görülmüş, araştırmacılar bu verinin antikorlardaki affinite maturasyonunun herhangi bir sebeple (biyolojik ürünün yapısındaki farklı bir katkı maddesi veya o dönemde immunize edilen hayvanların spesifik biyolojik durumları gibi) kısmen bloke olması, immunize edilen hayvanlarda antijenik determinantlara karşı nispeten düşük affiniteli antikorların oluşumu ve bu sebeple bu zayıf maturasyon gösteren antikorların yeterince antijene bağlanamaması ya da zayıf olan bu bağlantıların ELISA prosedüründeki kuvvetli yıkama prosedürleri ile bozulması neticesi gelişebileceğini ileri sürmüşlerdir. Ancak bu çalışmada, biyolojik ürününden doğrudan antijen miktarı belirlendiğinden, yani aşı ile hayvanlar immunize edilip antikor oluşumu sağlanmadığından böyle bir yaklaşım söz konusu değildir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmamız ile *C. chauvoei* içeren bakterin aşılarda potens testinde konvansiyonel patojen kültürle epruvasyon uygulanması yerine, aşının içerdiği antijen miktarının (flagellar yüzey proteinin) ölçülmesine dayanan bir ELISA prosedürü uygulanarak iki yöntemin karşılaştırmasının yapılması ve *C. chauvoei* aşılarda potensinin belirlenmesinde in vitro ELISA prosedürünün uygulanabilirliğinin tespit edilmesi sağlanmıştır.

Araştırmamız, *C. chauvoei* içeren inaktif veteriner biyolojik ürünlerde flagellar antijen miktarının ölçümüne dayanan bir alternatif prosedürün performansının (doğruluk ve kesinliğinin) değerlendirilmesi açısından önem arz etmektedir.

Araştırmamızda epruvasyon testi yerine in-house ELISA metodunun kullanılması ile denemelerde kullanılacak hayvan sayısının azaltılması, hayvan refahının iyileştirilmesi, daha kesin sonuçlar elde edilmesi, validasyona elverişli olması, aynı anda daha çok örneğin test edilebilmesi, test süresinin kısaltılması ve maliyetinin düşürülmesi gibi çeşitli avantajlar elde edilmektedir. Çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar *C. chauvoei* komponentini içeren aşılarda potens testlerinde in-vivo bir metot olan ve aynı zamanda standart olarak kullanılan kobay epruvasyon testine alternatif olarak in-vitro alternatif ELISA prosedürünün başarılı bir şekilde kullanılabileceğini ancak referans oluşturma ve antijen ayrıştırma proseslerinin önemli olduğunu göstermiştir.

7. KAYNAKLAR

- Abreu CC, Edwards EE, Edwards JF, Gibbons PM, Araújo JL, Rech RR, Uzal FA.** Blackleg İn Cattle: A Case Report Of Fetal İnfection And A Literature Review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2017, 29 (5), 612-621.
- Acar A, Yipel AF.** Kuzularda Klostridial Enfeksiyonlar. *Türkiye Klinikleri Journal Veterinary Science Internal Medicine-Special Topics* 2015, 1(3), 52-58.
- Alaçam E, Şahal M.** Sığıır Hastalıkları (2. Baskı), Medisan, Ankara, 2002, 189-190.
- Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, Izgur M, Diker S.** Özel Mikrobiyoloji (4. Baskı), Medisan, Ankara, 1997, 213-248.
- Arslan A, Dilik Z, Özyer M, Oktay N, Yılmaz Ş.** Klostridial Aşıların Potensinin Belirlenmesinde Toksin Nötralizasyon Testlerine Alternatif Olarak Elisa'nın Kullanımı TAGEM/ HSGYAD, 13/ A07 /P02 / 32, Araştırma - Geliştirme Destekleri Proje Sonuç Raporu 2016, 1-36
- Baş AT, Alp R.** Clostridial Aşıların Kombine Hazırlanması. *Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi* 2005, 20 (2), 1-20.
- Bonistalli KN.** Monoclonal Antibody Production: A Comparison of in Vitro and in Vivo Methods and Their Use in Clostridial Vaccine Manufacture, M.Sc, Veterinary Medicine at Massey University, Manawatu, New Zealand 2013, 198-210
- Cavalier SJ, Snyder IS.** Effect of Escherichia coli Alpha-Hemolysin on Human Peripheral Leukocyte Viability In Vitro. *Infection And Immunity* 1982, 36(2), 455-461.
- Chabaud-Riou M, Moreno N, Guinchard F, Nicolai MC, Niogret-Siohan E, Seve N, Manin C, Guinet-Morlot F, Riou P.** G-Protein Based Elisa As A Potency Test For Rabies Vaccines. *Biologicals* 2017, 46, 124-129.
- Coral D.** Studies On Novel Immunogenic Proteins Of *Clostridium chauvoei*, In Partial Fulfillment Of The Requirements For The Degree Of Master Of Science In Biotechnology METU, 2009, 99.
- Cooper BJ, Valentine BA.** Muscle and tendon. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals, St. Louis, MO: Elsevier, 2016, s 230-233
- Crichton R, Harriss DA, McKay DJ.** Standards For Clostridium Chauvoei Vaccine The Relationship Between The Response Of Guinea Pigs And Sheep Following Vaccination And Challenge With Virulent *C. chauvoei*. *Australian Veterinary Journal* 1986, 63(3), 68-70.

- Crichton R, Solomon JA, Barton M.** The Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Measuring the Potency of Vaccines Containing *Clostridium chauvoei* Antigens. *Biologicals* 1990, 18, 49-54
- Crowthwer JR.** The ELISA Guidebook, Second Edition, Humana Press, New York, 2009, 566
- Curren RD, Southee JA, Spielmann H, Liebsch M, Fentem JH, Balls M.** The Role of Prevalidation in the Development, Validation and Acceptance of Alternative Methods. *Alternatives to Laboratory Animals* 1995, 23, 211-217.
- Dangi SK, Yadav PK, Tiwari A, Nagaleekar VK.** Cloning And Sequence Analysis Of Hyaluronoglucosaminidase (Nagh) Gene Of *Clostridium Chauvoei*. *Veterinary World* 2017, 10(9), 1104-1107.
- DeHaven WR.** In Vitro Serial Release Potency Test for Completed Product Containing *Clostridium chauvoei*. *Veterinary Services Memorandum* 2003, NO. 800.104, 1-4.
- Dinse GE, Umbach DM.** Quantifying Relative Potency in Dose-Response Studies. from book Risk assessment and evaluation of predictions. Proceedings of the conference, Silver Spring, MD, 315-331, 12–14 October 2011, USA.
- Duygu DY, Udoh AU.** Validation of Microbiological Testing Methods. *Trakya University Journal of Natural Sciences* 2017, 18(1), 65-69.
- EDQM** (The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare). Alternatives to Animal Testing: New Approaches in the Development and Control of Biologicals, Proceedings of the International Symposium, Croatia, Dubrovnik. 2008, s 211
- EDQM** (The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare). Immunochemical methods (2.7.1), The European Pharmacopoeia (9th edt), Strasbourg, France, 2017a, 239-240.
- EDQM** (The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare). *Clostridium chauvoei* Vaccine for Veterinary Use (Monograph 361), The European Pharmacopoeia, 9th Edition, Strasbourg, France, 2017b, 1036.
- El-Helw HA, Elham FE, Taha MM, Abdella YA, El-Sehemy MM.** Comparison Of Elisa With Traditional Methods Used For Evaluation Of Blackleg And Gas Gangrene Vaccine. *Nature and Science* 2012, 10 (11), 137-144.
- Erbaş G, Kaya O.** Veteriner Aşı ve Biyolojik Maddelerin Kontrollerinde Alternatif Metotlar. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2011, 25(3), 141-146.
- Ghazaei C.** Bacterial Enzymes – Hyaluronidase. *BioSciences* 2014, 9(8), 290-293.

- Halder M.** Three Rs Potential in the Development and Quality Control of Immunobiologicals, *Altex* 2001, 18(1), 13-46.
- Hatheway C.** Toxigenic Clostridia. *Clinical Microbiology Reviews* 1990, 3(1), 66-68.
- Hendriksen CFM.** Replacement, Reduction and Refinement Alternatives to Animal Use in Vaccine Potency Measurement, *Expert Review of Vaccines* 2009, 8(3), 1-10.
- Hendriksen CFM, Spieser JM, Akkermans A, Balls M, Bruckner L, Cussler K, Daas A, Descamps J, Dobbelaer R, Fentem J, Halder M, Kamp MVD, Lucken R, Milstien J, Sesardic D, Straughan D, Valadares A.** Validation of Alternative Methods for the Potency Testing of Vaccines. *Alternatives to Laboratory Animal* 1998, 26(6), 747-761.
- Hill RE.** Alternative Methods to Reduce, Refine, and Replace the Use of Animals in the Development and Testing of Veterinary Biologics in the United States; a Strategic Priority. *Procedia in Vaccinology*, 2011, 5, 141-145.
- Hirsh DC.** Maclachlan NJ and Walker RL: Veterinary Microbiology, Wiley-Blackwell, 2004, 206.
- Karli SA, Rippke BE.** Using Software to Estimate Relative Potency United States Department of Agriculture Center for Veterinary Biologics Standard Operating Policy/Procedure CVBSOP0102.03, 2015, 1-8.
- Kijima-Tanaka M, Ogikubo Y, Kojima A, Tamura Y.** Development Of A Two-Site Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Quantification Of The Flagellar Antigen In Blackleg Vaccines *Journal of Microbiological Methods* 1997, 31, 83–88.
- Kojima A, Amimoto K, Ohgitani T, Tamura Y.** Characterization Of Flagellin From *Clostridium chauvoei*. *Veterinary Microbiology* 1999, 67(3), 231-237.
- Korimbocusa J, Dehayb N, Tordoc N, Canoa F, Morgeaux S.** Development And Validation Of A Quantitative Competitive Elisa for Potency Testing Of Equine Anti Rabies Sera With Other Potential Use. *Vaccine* 2016, 34(28), 3310–3316.
- Kulpa-Eddy J, Srinivas G, Halder M, Hill R, Brown K, Roth J, Draayer H, Galvin J, Claassen I, Gilford G, Woodland R, Doelling V, Jones B, Stokes WS.** Non-Animal Replacement Methods for Veterinary Vaccine Potency Testing: State of the Science and Future Directions. *Procedia in Vaccinology* 2011, 5, 16-32.
- Lange M, Neubauer H, Seyboldt C.** Development and Validation Of A Multiplex Real-Time Pcr For Detection Of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. *Molecular and Cellular Probes* 2010, 24(4), 204–210.

- Ludemann LR, Hyde RLW.** Potency Testing of *Clostridium chauvoei* Bacterins using an ELISA Procedure United States Department of Agriculture Center for Veterinary Biologics Testing Protocol (BBPRO0220.03) 2015, 1-10.
- Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D.** *Clostridium* Species, Clinic Veterinary Microbiology, Second Ed, Elsevier, China, 2013, 215-237
- Mattar MA, Cortinas TI, Guzman AMS.** Immunogenic Protein Variations Of *Clostridium Chauvoei* Cellular Antigens Associated With The Culture Growth FEMS *Immunology and Medical Microbiology* 2002, 33(1), 9-14.
- McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM.** Veterinary Microbiology (3th edt) Wiley-Blackwell 2013, 245-262.
- Nagano N, Isomine S, Kato H, Sasaki Y, Takahashi M, Sakaida K.** Human Fulminant Gas Gangrene Caused by *Clostridium chauvoei*. *Journal of Clinical Microbiology* 2008, 46(4),1545–1547.
- Parte AC, Whitman WB, Vos PD, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K, Whitman WB.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three The *firmicutes* 2009, 738-768.
- Prescott JF.** *Clostridium*, Veterinary Microbiology, 3.Edition, Ed: McVey D.S, Kennedy M, Chengappa M.M), Blackwell Publishing, USA, 2013, 648
- Public Health England.** UK Standards for Microbiology Investigations: Identification of *Clostridium* Species, Issued by the Standards Unit, Microbiology Services- PHE, Bacteriology – Identification 2015, 8(4), 1-27
- Quinn PJ.** Clinical Veterinary Microbiology: Elsevier Health Sciences, Chap.17, 1994, 191-202.
- Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Henscheliff KW.** Veterinary Medicine, A text book of diseases of cattle, sheep, goats, pig and horses, (10 th Ed) London: Bailliere Tindall. 2007, 828- 830.
- Ramachandran S.** Haemolytic Activities of *C. chauvoei*. *Indian Veterinary Journal* 1969, 46(9), 754-68.
- Ramakrishnan MA.** Determination of 50% Endpoint Titer Using A Simple Formula. *World Journal of Virology* 2016, 5(2), 85-86.
- Redhead K, Wood K, Jackson K.** Testing of Veterinary Clostridial Vaccines: From Mouse to Microtitre Plate, Potency Testing of Veterinary Vaccines for Animals: The Way From in Vivo to in Vitro, Jungback C. (Ed.), vol 134, Basel, Karger, 2011, 45-50.

- Rinella Jr JV, White JL, Hem SL.** Effect of pH on the Elution of Model Antigens from Aluminum-Containing Adjuvants. *Journal of Colloid and Interface Science* 1998, 205(1), 161–165.
- Romberg j, Lang S, Balks E, Kamphuis E, Duchowa K, Loos D, Rau H, Motitschke A, Jungbäck C.** Potency Testing of Veterinary Vaccines: The way from in vivo to in vitro, *Biologicals* 2012, 40(1), 100-106.
- Roskopf U, Volkers P, Werner E.** Control of *Clostridium perfringens* Vaccines using an Indirect Competitive ELISA for the Epsilon Toxin Component, Examination of the Assay by a Collaborative Study, *Pharmeuropa Bio* 2004, 2003(2), 91-96.
- Salama SS, El-Maghraby AS, Mohamed GM, El-Sadek GM, Sobhy G, El-Naby AA.** Assessment of Relative Potency of Inactivated *Pasteurella multocida* Vaccine in Poultry. *Zagazig Veterinary Journal* 2014, 42(3), 176-180.
- Siev D.** Interpretation And Estimation Of Relative Potency In Vaccines. *Journal of Immunological Methods* 1997, 208(2), 131–139.
- Sigoillot-Claude C, Battaglio M, Fiorucci M, Gillet D, Vimort A, Giraud Y, Laurent S, Vaganay A, Meriala HP.** Versatile In Vitro Elisa Test for Quantification and Quality Testing of Infectious, Inactivated And Formulated Rabies Virus Used In Veterinary Monovalent or Combination Vaccine. *Vaccine* 2015, 33(32), 3843–3849.
- Stokes WS, Brown K, Kulpa-Eddy J, Srinivas G, Halder M, Draayer H, Galvin J, Classen I, Gifford G, Woodland R, Doelling V, Jones B.** Improving Animal Welfare and Reducing Animal Use for Veterinary Vaccine Potency Testing: State of The Science and Future Directions. *Procedia in Vaccinology* 2011, 5, 84-105.
- Songer GJ, Post WK.** Veteriner Hekimlik Mikrobiyolojisi Nobel Tıp Kitapevleri, 2012, 280-281.
- Tanaka M, Hirayama N, Tamura Y.** Production, Characterization, and Protective Effect of Monoclonal Antibodies to *Clostridium chauvoei* Flagella. *Infection And Immunity* 1987, 1779-1783
- Tamura Y, Minamoto N, Tanaka S.** Demonstration of Protective Antigen Carried by Flagella of *Clostridium chauvoei*. *Microbiology and Immunology* 1984, 28 (12), 1325-1332
- Tamura Y, Tanaka S.** Effect of Antiflagellar Serum in the Protection of Mice Against *Clostridium chauvoei*. *Infection and Immunity* 1984, 43(2), 612-616.
- Tamura Y, Kijima M, Ohishi K, Takahashi T, Suzuki S, Nakamura M.** Antigenic Analysis of *Clostridium Chauvoei* Flagella With Protective and Non-Protective Monoclonal Antibodies. *Journal of General Microbiology* 1992, 138(3), 537-542.

Türkbal A. Prof Dr. Uygulamalı İstatistik Umuttepe Yayınları 1.Baskı 173-194

USDA APHIS (The United States Department of Agriculture). *Clostridium chauvoei* Bacterin (113.106), Code Of Federal Regulations (Annual Edition) U.S. Government Publishing Office Title 9 Animal and animals products (1-1-12 Ed), 2017a, 738-739.

USDA APHIS (The United States Department of Agriculture). Supplemental Assay Method For Potency Testing Products Containing *Clostridium chauvoei* Antijen, United States Department Of Agriculture Center For Veterinary Biologics Testing Protocol, 2017b, 1-9.

Useh NM, Ajanusi JO, Esievo KAN, Nok AJ. Characterization of A Sialidase (neuraminidase) İsolated from *Clostridium chauvoei* (Jakari strain). *Cell Biochemistry and Function* 2006a, 24(4), 347–352.

Useh NM, Nok AJ, Esiev KAN. Blackleg in ruminants. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 2006b, 1(40), 1-9.

Useh NM, Nok AJ, Ibrahim N, Esievo KAN. Anaemia in *Clostridium chauvoei* İnfektion İs Masked by Haemoconcentration. *Veterinarski Arhiv* 2012, 82(5), 433-447.

Usharani J. Proteomic Study And Evaluation of Diagnostic Potential of A Surface Protein of *Clostridium chauvoei* Roll No. 2014, 1345

Usharani J, Nagaleekar VK, Thomas P, Gupta SK, Bhure SK, Dandapat P, Agarwal RK, Singh VP. Development of A Recombinant Flagellin Based Elisa for The Detection of *Clostridium chauvoei*. *Anaerobe* 2015, 33, 48-54

Uzal FA, Hugenholtz P, Blackall LL, Petray S, Moss S, Assis RA, Miyakawa FM, Carloni G. PCR Detection of *Clostridium chauvoei* İn Pure Cultures and İn Formalin-fixed, paraffin-Embedded Tissues. *Veterinary Microbiology* 2003, 91(2-3), 239-248.

Uzal FA, Songer JG, Prescott JF, Popoff MR. Clostridial Diseases of Animals This edition first published John Wiley Blackwell U.K. 2016, 23-45.

Verma V, Sehgal R, Tahlan AK, Sood DK, Dogar V. Feasibility of use of Single Dose Immunization Regime İn Antibody Induction Method for Testing Potency of Tetanus Component in DTP Group of Vaccines and Comparision of Validated ELISA with TNT for Antibody Titration. *American Journal of Biomedical Sciences* 2009, 1(2), 143-156.

Weatherhead JE, Twardy DJ. Lethal Human Neutropenic Enterocolitis Caused By *Clostridium Chauvoei* İn The United States: Tip Of The İceberg. *Journal of Infection* 2012, 64(2), 225–227.

Wood KR. An Alternative to the Toxin Neutralization Assay in Mice for The Potency Testing of The *Clostridium tetani*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* Type B and *Clostridium perfringens* Type D Epsilon Components of Multivalent Sheep Vaccines. *Biologicals* 1991, 19(4), 281-286.



ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : DENİZ, Deha Ali
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Balıkesir 18/09/1984
Telefon : 0505 5240206
E-mail : dehaali@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Adnan Menderes Üniversitesi Mikrobiyoloji A.B.D.
Y. Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Mikrobiyoloji A.B.D.	29/11/2011
Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	01/06/2009

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2009-2010	Therapy Veteriner Kliniği	Veteriner Hekim
2011-2014	GAP Tarımsal Araştırma Enstitüsü/ Şanlıurfa	Veteriner Hekim
2014-...	Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü /İzmir	Veteriner Hekim

AKADEMİK YAYINLAR

BİLDİRİLER

Deha Ali DENİZ, Şükrü KIRKAN Keçilerde Staphylococcus aureus un bakteriyolojik ve moleküler olarak araştırılması. X. Ulusal Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı) (Poster) 24-27 Eylül 2012

Deha Ali DENİZ, Sevil ARSLAN, Tuncay VURAL, Gökhan FİLİK, Şanlıurfa GAP Tarımsal Araştırma Enstitüsü Tektek İstasyonunda Bulunan Koyunlarda Maedi-Visna Enfeksiyonu X. Ulusal Veteriner Hekimleri İç Hastalıkları Kongresi 27-30 Haziran 2013 (Uluslararası katılımlı) (Poster)