



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



***IN-VIVO* YÖNTEMLERE ALTERNATİF OLARAK  
*IN-VITRO* YÖNTEMLE İNAKTİF NEWCASTLE  
HASTALIĞI AŞILARINDA ETKİNLİK TAYİNİ**

**Doktora Tezi**

Mustafa KARS

Farmasötik Mikrobiyoloji A.B.D.

İzmir  
2019

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

***IN-VIVO* YÖNTEMLERE ALTERNATİF OLARAK  
*IN-VITRO* YÖNTEMLE İNAKTİF NEWCASTLE  
HASTALIĞI AŞILARINDA ETKİNLİK TAYİNİ**

Mustafa KARS

Danışman  
Prof. Dr.Mine HOŞGÖR LİMONCU






Farmasötik Mikrobiyoloji A.B.D.  
Yüksek Lisans Derecesi ile Doktora

İzmir  
2019

**Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri**

(Adı Soyadı)

(İmza)

<b>Başkan:</b> Prof. Dr. Mine HOŞGÖR LİMONCU (Danışman)	
Üye: Prof. Dr. Şafak ERMERTCAN	
Üye: Prof. Dr. Süleyha HİLMİOĞLU POLAT	
Üye: Prof. Dr. Mehmet Emin LİMONCU	
Üye: Prof. Dr. Süheyla SÜRÜCÜOĞLU	

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: .....12.06.2019

## Önsöz

Kanatlı hayvanlarda çok bulaşıcı ve öldürücü viral bir enfeksiyon olan Newcastle hastalığına karşı korunmada aşılama çok önemlidir. Bu amaçla kümes hayvanlarında canlı ve inaktif aşılar kullanılmaktadır. Üretilen tüm aşı serilerinde, üretici firmalar ve yetkili otoritelerce, aşının istenilen bağışıklığı sağladığını ortaya koyan etkinlik/potens testleri yürütülmektedir. Geleneksel olarak inaktif aşılarla gerçekleştirilen etkinlik testleri *in-vivo* olarak deney/hedef hayvanlarında gerçekleştirilen immunizasyon-seroloji ve immunizasyon-çalenç testleri şeklindedir. Bu testlerin çok fazla sayıda hayvan kullanılarak çok uzun sürelerde gerçekleştirilmesi, sıkı biyogüvenlik önlemleri gerektirmesi, uzun test sürelerine bağlı olarak beslenme ve bakım giderlerinin artması ve testlerde kullanılan virulan karakterdeki eprüvasyon suşlarının hem laboratuvar personeli hem de çevre için risk oluşturması gibi çeşitli dezavantajları bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'nde biyolojik ürünlerin kalite kontrol testlerini yürüten Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Bölümü'nde kontrolü gerçekleştirilen inaktif Newcastle hastalığı aşılarının etkinliğinin belirlenmesinde, hayvan kullanımını azaltan ya da ortadan kaldırmaya yönelik *in-vitro* bir test olan ELISA metodunun uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Bu tez projesi (16-ECZ-008) Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Ege-BAP) Fonu tarafından desteklenmiştir.

İzmir, 14.05.2019

Mustafa KARS

## Özet

### ***In-Vivo* Yöntemlere Alternatif Olarak *In-Vitro* Yöntemle İnaktif Newcastle Hastalığı Aşılarında Etkinlik Tayini**

Bu tez çalışmasında, inaktif Newcastle hastalığı aşılarının etkinliğinin belirlenmesinde, hayvan kullanımını azaltan ya da ortadan kaldıran *in-vitro* ELISA metodunun uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Bu amaçla, Newcastle hastalığına karşı kanatlı hayvanlarda kullanılan tek ya da çok komponentli 9 inaktif Newcastle hastalığı aşısı ile yalancı reaksiyonları değerlendirmek için Newcastle hastalığı virusu içermeyen 2 aşı kullanıldı. Aşıların etkinlik düzeyleri *in-vivo* ve *in-vitro* yöntemlerle değerlendirildi.

*In-vivo* olarak “Specific Pathogen Free” (SPF) civcivlerin aşılınması sonrası oluşan antikor yanıtın serolojik olarak değerlendirildiği hemaglutinasyon inhibisyon testi ve SPF civcivlerde koruma düzeylerinin belirlendiği çalenç/epruvasyon çalışmaları gerçekleştirildi. *In-vitro* olarak ise İnaktif Newcastle hastalığı aşıları için geliştirilmiş olan ve aşıda bulunan hemaglütinin ve nöraminidaz antijenlerini saptamaya yönelik sandviç ELISA testi kullanıldı. ELISA testinden elde edilen optik dansite sonuçları kullanılarak Combistats İstatistiksel Analiz Yazılım Programı ile paralel doğru analiz metoduyla aşıların relatif potens değerleri hesaplandı.

Hemaglutinasyon inhibisyon test sonuçları  $2^{3,3}$  ile  $2^{6,1}$  aralığında, immunizasyon-çalenç sonuçları 56 ile 136 PD<sub>50</sub> aralığında ve ELISA testi ile relatif potens değerleri 6,02 ile 98,23 antijen ünitesi aralığında bulundu. ELISA testi ile immunizasyon-çalenç testi arasında ( $r^2=0,93$ ) ve hemaglutinasyon inhibisyon testi ile immunizasyon-çalenç testi arasında ( $r^2=0,95$ ) anlamlı korelasyon saptandı. ELISA testinin duyarlılığı %89, özgüllüğü ise %100 olarak hesaplandı ve tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik değerleri açısından kabul edilebilir sınırlar içinde seyrettiği görüldü.

Bu sonuçlara göre, laboratuvar şartlarında ELISA metodunun uygulanabilirliği, standart prosedüre olan uyumu ve aynı örnekler üzerinde benzer sonuçlar verebilme yeteneği gösterilmiş oldu.

**Anahtar Kelimeler;** Newcastle hastalığı aşısı; *in-vivo* ; *in-vitro*; SPF; relatif potens

## Abstract

### **Determination of Efficacy in Inactive Newcastle Disease Vaccines with an *In-vitro* method as an Alternative to *In-vivo* Methods.**

In this thesis study, the applicability of an *in-vitro* ELISA method which reduces or eliminates the need for animal trials in establishing the efficacy of inactive Newcastle Disease Vaccines was investigated.

For this purpose, a single or multi-component 9 inactivated Newcastle disease vaccines used in poultry and two vaccines without Newcastle disease virus were used to assess pseudo-reactions. The efficacy levels of vaccines were evaluated by *in-vivo* and *in-vitro* methods.

As *in-vivo* tests, vaccines were applied to the “Specific Pathogen Free” (SPF) chicks and antibody response was determined serologically (hemagglutination inhibition test), and protection levels were determined with challenge trials. As *in-vitro*, Antigen amount in vaccines were calculated with a sandwich ELISA test based on the determination of hemagglutinin and neuraminidase levels developed for inactive Newcastle vaccines. Relative potency values of vaccines were calculated by using the parallel line analysis method with Combistats Statistical Analysis Software Program by using optical density results obtained from ELISA test.

Hemagglutination inhibition test results were found to be in between  $2^{3,3}$  and  $2^{6,1}$ ; immunization/challenge results ranged between 56 and 136  $PD_{50}$  and ELISA test results were between 6,02 and 98,23 antigen units. Meaningful correlation was found between the ELISA test and immunization/challenge test ( $r^2=0,93$ ) as well as hemagglutination inhibition and immunization/challenge test ( $r^2=0,95$ ). Sensitivity and specificity were found to be %89, %100 respectively and in terms of reproducibility and repeatability they were within acceptable range.

According to these results, the ELISA procedure's applicability, compatibility with standard procedure as well as its ability to provide similar results on the same samples were demonstrated.

**Key words:** Newcastle Disease Vaccine, *in-vivo*; *in-vitro*; SPF; Relative potency

## İçindekiler

Önsöz .....	III
Özet.....	III
Abstract.....	IV
İçindekiler .....	V
Tablolar Dizini.....	VIII
Resimler Dizini .....	IX
Grafikler Dizini .....	X
Kısaltma Listesi .....	XI
1. Giriş .....	1
2. Genel Bilgiler .....	6
2.1. Etiyoloji.....	6
2.2. Epidemiyoloji.....	6
2.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler .....	7
2.4. Tanı.....	8
2.5. Tedavi ve Koruma.....	9
3. Gereç ve Yöntem .....	11
3.1. Gereç.....	11
3.1.1. Deney Hayvanları.....	11
3.1.2. Kimyasallar.....	11
3.1.2.1. Fosfat Buffer Solüsyonu(PBS) .....	11
3.1.2.2. Kaplama Solüsyonu .....	12
3.1.2.3. ELISA Buffer.....	12
3.1.2.4. Yıkama Solüsyonu.....	12
3.1.2.5. Stop Solüsyonu .....	13
3.1.2.6. Diğer Kimyasallar .....	13

<b>3.1.3. Antijen ve Antikorlar</b> .....	13
<b>3.1.3.1. NDV Spesifik Monoklonal Antikor(MoAb)</b> .....	13
<b>3.1.3.2. NDV Spesifik Konjuge Antikor</b> .....	13
<b>3.1.3.3. NDV Referans Antijen</b> .....	13
<b>3.1.3.4. NDV Kontrol Antijen</b> .....	14
<b>3.1.3.5. Sertifikalı Standart Referans Antijen</b> .....	14
<b>3.1.3.6. Sertifikalı Standart referans Antiserum</b> .....	14
<b>3.1.4. NDV Eprüvasyon</b> .....	14
<b>3.1.5. Kullanılan Cihaz ve Gereçler</b> .....	14
<b>3.2. Yöntem</b> .....	15
<b>3.2.1. İş Akışı ve Koordinasyon</b> .....	15
<b>3.2.2. Aşıların Hazırlanması ve Temini</b> .....	16
<b>3.2.3. İmmünizasyon Seroloji Testi</b> .....	17
<b>3.2.4. Hemaglutinasyon(HA) Testi</b> .....	17
<b>3.2.5. Hemaglutinasyon İnhibisyon (HA) Testi</b> .....	19
<b>3.2.6. İmmünizasyon-Çalenç Testi</b> .....	19
<b>3.2.7. Aşıların Ekstraksiyon İşlemi</b> .....	20
<b>3.2.8. ELISA Testi</b> .....	21
<b>3.2.9. Test Sonuçlarının Yorumlanması</b> .....	23
<b>4. Bulgular</b> .....	24
<b>4.1. Hemaglutinasyon İnhibisyon Testi Bulguları</b> .....	24
<b>4.2. İmmünizasyon-çalenç Testi Bulguları</b> .....	25
<b>4.3. ELISA Bulguları</b> .....	26
<b>4.4. ELISA Testi Validasyon Bulguları</b> .....	29
<b>4.4.1. Duyarlılık</b> .....	29
<b>4.4.2. Özgüllük</b> .....	29



<b>4.4.3. Efektiflik .....</b>	<b>30</b>
<b>4.4.4. Tekrarlanabilirlik .....</b>	<b>30</b>
<b>4.4.5. Tekrar Üretilirlik .....</b>	<b>31</b>
<b>5. Tartışma .....</b>	<b>32</b>
<b>Sonuç ve Öneriler .....</b>	<b>41</b>
<b>Kaynaklar .....</b>	<b>42</b>
<b>Ekler .....</b>	<b>51</b>
<b>Teşekkür .....</b>	<b>52</b>
<b>Özgeçmiş .....</b>	<b>53</b>

## Tablolar Dizini

<b>Tablo 1.</b> Kullanılan aşılar ve içerikleri .....	16
<b>Tablo 2.</b> Aşı örneklerinin dilüsyon oranları .....	23
<b>Tablo 3.</b> Aşılarla ait <i>in-vivo</i> ve ELISA etkinlik test sonuçları .....	27
<b>Tablo 4.</b> Gerçek ve yanlış cevaplar dağılımı .....	29
<b>Tablo 5.</b> ELISA testine alınan aşıların OD değerleri arasındaki en yüksek varyasyon katsayıları (% CV).....	30
<b>Tablo 6.</b> ELISA testine alınan aşıların relatif potens değerleri arasındaki varyasyon katsayıları (% CV) .....	31

## Resimler Dizini

<b>Resim 1.</b> Ependorf tüplerindeki kan örnekleri ve serumları .....	17
<b>Resim 2.</b> 4 HAU'ya ayarlanmış olan antijen .....	18
<b>Resim 3.</b> Ekstraksiyon işlemi sonrası ayrılmış olan su ve yağ fazı .....	21
<b>Resim 4.</b> ND aşısına ait serum örneklerinde HI test sonuçları .....	25
<b>Resim 5.</b> Referans ve aşı örneklerini gösteren ELISA testi .....	28



## Grafikler Dizini

<b>Grafik 1.</b> Referans ve kontrol antijenle birlikte test edilen yeterli ve yetersiz AU'ya sahip aşı örneklerine ait grafik.....	28
---	----



## Kısaltma Listesi

AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
APMV	: Avian Paramyxovirus
AI	: Avian Influenza
APHIS	: Animal and Plant Health Inspection Service
AU	: Antijen Ünitesi
BEI	: Binary Ethylenimine
BPL	: Betapropiolactone
BSA	: Bovine Serum Albumine
BSL	: Bio Security Level
CFR	: Code of Federal Regulations
CV	: Coefficient of Variation/ Varyasyon Katsayısı
CVB	: Center for Veterinary Biologics
ECVAM	: European Centre for the Validation of Alternative Methods
ELD <sub>50</sub>	: Embriyo Lethal Dose 50
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EDQM	: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare
HA	: Hemaglutinasyon
HAU	: Hemaglutinasyon Ünitesi
HI	: Hemaglutinasyon İnhibisyon

HN	: Hemaglutinin Nöraminidaz
HRPO	: Horse Radish Peroxidase
ICPI	: Intraserebral patojenite indeksi
IVPI	: Intravenöz patojenite indeksi
ICCVAM	: Inter-agency Coordinating Committee on Validation of Alternative Methods
IPM	: Isopropylmyristate
MDT	: Ortalama Ölüm Süresi
MoAb	: Monoklonal Antikor
M.Ö.	: Milattan Önce
M.S.	: Milattan Sonra
NICEATM	: National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods
ND	: Newcastle Disease/ Newcastle hastalığı
NDV	: Newcastle Disease Virus/ Newcastle hastalığı virusu
OD	: Optik Dansite
OIE	: World Organization for Animal Health
OMCL	: Official Medicines Control Laboratory
RT-PCR	: Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
q-PCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
q.s.	: Yeterli miktarda
PD <sub>50</sub>	: Protective Dose 50/ Koruyucu Doz 50

RP	: Relatif Potens
SPF	: Spesific Pathogen Free
SRS	: Sertifikalı Referans Standart
TMB	: Tetramethylbenzidine
USDA	: United States Department of Agriculture
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü



## 1. Giriş

Aşılama, tüm dünyada birçok enfeksiyon hastalıktan korunmada ve bu hastalıkların yayılımının önlenmesinde en etkili yöntemdir (Stokes ve ark., 2011a; Shahid ve ark., 2017). Aşılamanın tarihçesine bakıldığında M.Ö. 429 yıllarında Yunanistan'da çiçek hastalığından kurtulan kişilerin bir daha hastalığa yakalanmadığı, M.S. 900 yıllarında Çin'de çiçek hastalığına yakalanan kişilerin deri döküntülerinin sağlıklı kişilere uygulanması ile çiçek salgının engellendiği bilinmektedir (Kumar ve ark. 2018; Plotkin, 2014). Modern anlamda ilk aşı uygulaması çiçek aşısı ile Dr. Edward Jenner tarafından 1796 yılında ortaya konulmuştur (Plotkin, 2014). Günümüzde hastalıklardan korunmada en akılcı yaklaşımın aşılama olduğu bilinmekte olup, aşılamanın etkin kullanımıyla; kuduz, bruselloz ve salmonelloz gibi zoonotik karakterde birçok enfeksiyonun gelişimi önlenerek düşük maliyetli, sağlıklı ve güvenilir hayvansal gıda üretimi sağlanmış, böylece hem hayvan hem de insan sağlığı korunmuştur (Stokes ve ark., 2011a).

Aşılar, ilaçlardan farklı olarak canlı organizmalardan elde edilirler ve bu özelliklerinden dolayı her partinin benzersiz olduğu kabul edilir. Canlı organizmaların doğal değişkenliğine bağlı olarak ve çevreden kaynaklanan kirlenme potansiyelinden dolayı her partinin ürün tutarlılığını, güvenliğini ve etkinliğini sağlamak için kontrol edilmesi gerekmektedir (Hendriksen, 2009). Bu nedenle her bir aşı serisinin hem üretici firmalar hem de yetkili otoriteler tarafından, fizikokimyasal, sterilite, güvenlik ve etkinlik testleri gibi bir dizi kalite kontrol testinden geçirilmesi gerekmektedir.

Aşı üretim ve kontrolünde kullanılmak üzere, çeşitli farmakopeler, uluslararası organizasyonlar ve düzenleyici otoriteler tarafından çeşitli monograflar ve kılavuzlar tanımlanmıştır (Halder, 2001). Gerçekleştirilen kontrol testleri sterilite, etkinlik ve güvenlik testleri olarak sınıflandırılabilir. Yürütülen bu testlerin her biri önemlidir ancak profilaktik amaçla kullanılan bir biyolojik ürün için en önemli test hiç şüphesiz etkinlik/potens testleridir.

Potens testleri, ürün etkinliğiyle doğrudan veya dolaylı olarak ilişkili olduğu düşünülen bir veya daha fazla parametrenin ölçülmesini esas alan ve aşı kalitesini ortaya koymada kullanılan ana testtir (Hendriksen, 2009; Kumar ve ark., 2018).



Aşılar üretildikten sonra canlı ya da inaktif tüm aşı serilerinde potens testleri yapılması gerekmektedir. Gerçekleştirilen potens testleri epruvasyon testleri, toksin nötralizasyon testleri, hücre ilişkili testler ve titrasyon testleri içerisinde değerlendirilebilir. Genel olarak canlı aşıların etkinliği *in-vitro* titrasyon testleri ve koloni sayım testleri ile belirlenirken inaktif aşıların etkinliği immunizasyon-çalenç, toksin nötralizasyon, immunizasyon-seroloji testleri gibi *in-vivo* yöntemlerle yapılmaktadır (Kumar ve ark., 2018).

Hayvanlarda kullanılan aşıların, çiftlik hayvanları, evcil hayvanlar ve yaban hayatı dahil olmak üzere 400'den fazla hastalık için kullanıldığı tahmin edilmektedir. Küresel düzeyde insanlarda kullanılan aşılarından elde edilen gelir, hayvanlarda kullanılan aşıların 30 katından fazla olmasına rağmen, hayvan aşıları üretim miktarı açısından beşeri aşılarından çok daha fazladır, sadece sığırlarda kullanılan şap hastalığı aşıları ve kanatlı hayvan hastalıklarına karşı kullanılan aşıların milyarlarca dozu bulunduğu bilinmektedir (Knight-Jones ve ark., 2014). Bu kapsamda, her yıl 10 milyonun üzerinde laboratuvar hayvanının immunolojik ürünlerin üretim ve kontrolü için kullanıldığı ve bunun %80'lik kısmının güvenlik ve etkinlik testleri içerisinde olduğu değerlendirildiğinde, hayvan kullanımının ne kadar büyük rakamlara ulaştığı görülmektedir (Halder, 2001).

Laboratuvar ya da deney hayvanı kullanılarak gerçekleştirilen testlerin çeşitli sınırlılıkları bulunmaktadır. Bu sınırlılıklar; yürütülen testlerin deney/hedef hayvanların bireysel kondisyonlarına bağlı olması nedeniyle stabil olmayıp değişken sonuçlar verebilmesi, testlerde koruyuculuğun ortaya konulması için kullanılan patojen suşların çevre için tehdit oluşturmasıyla beraber hayvanlarda ızdırap ve sıkıntıya yol açması, testlerin gerçekleştirildiği ortamların yüksek biyogüvenlik düzeyi gerektirecek şekilde dizayn edilmesi ve buna bağlı yüksek yatırım maliyetleri gerektirmesi, aşıların ortalama 2 yıl gibi bir raf ömrü süresine sahip olması bununla birlikte test tekrarları nedeniyle çalışmaların aylarca süreceği olması sayılabilir. (Hendriksen, 2009; Kumar ve ark., 2018). Söz konusu sınırlılıklarla birlikte hayvan refahı konusundaki etik kaygılar, kalite anlayışındaki değişim ve iyi üretim uygulamaları ("Good Manufacturing Practices"-GMP)'nin bir sonucu olarak ilk olarak William Russell ve Rex Burch'ın 1959 yılında yazmış oldukları "İnsancıl Deneysel Tekniğin Prensipleri" kitabında belirtilen ve kısaca 3R prensibi olarak tanımlanan azaltma (reduction), iyileştirme (refinement), yerine koyma

(replacement) olarak ifade edilen uygulamaların önem kazanması ile *in-vivo* testlerde kullanılan hayvan sayılarının azaltılması, deneylerde kullanılan hayvanlara yönelik bakım ve beslenme şartlarının iyileştirilmesi ve *in-vivo* testlere alternatif *in-vitro* test metotlarının geliştirilmesi ve kullanımı teşvik edilmektedir (Kumar ve ark., 2018; OIE, 2018; European Pharmacopoeia, 2017a; European Pharmacopoeia, 2017c).

Hayvansal modellere alternatif *in-vitro* metotların doğrulanarak uygulamaya aktarılması için çeşitli kuruluşlar hizmet vermektedir. Avrupa'da İlaç Kalite ve Sağlık Hizmetleri Direktörlüğü (EDQM) bünyesinde, Avrupa Alternatif Metotların Validasyonu Merkezi (ECVAM) kurulmuştur (Hendriksen ve ark., 1998). Amerika'da Alternatif Metotların Validasyonu Üzerine Kurumlararası Koordinasyon Komitesi (ICCVAM) ve Alternatif Toksikolojik Yöntemlerin Değerlendirilmesinde Ulusal Toksikoloji Programı Girişim Merkezi (NICEATM) bulunmaktadır (Stokes ve ark., 2011b). Avrupa'da ECVAM alternatif metotların uygulamaya aktarılması için gerekli olan test geliştirme, prevalidasyon, validasyon, bağımsız değerlendirme ve metodun yasal onay süreçlerini yürütmekte görevlidir (Hendriksen ve ark., 1998). Resmi İlaç Kontrol Laboratuvarları (OMCL) ağı üzerinden organize edilen birçok *in-vitro* çalışma ile biyolojik ürün kontrolünde alternatif metotlarının geliştirilmesi, uygulamaya konması ve validasyonu konusunda Avrupa Birliği (AB) içinde çeşitli projeler yürütülmüştür.

Kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde yüksek morbidite ve mortalite oranı ile seyreden akut ve sistemik bir hastalık olan Newcastle hastalığına karşı mücadelede, en etkili yol aşılama değildir. Bu amaçla kullanılmakta olan canlı ve inaktif Newcastle hastalığı (ND) aşılıları bulunmaktadır. Kanatlılarda gerçekleştirilen etkinlik testlerinde belli hastalık ajanlarını vücutlarında taşımayan ve kanlarında da spesifik antikor bulunmayan sertifikalı ve özel koşullarda yetiştirilen ("Spesifik Pathogen Free"-SPF) hayvanlar kullanılmaktadır. Avrupa Farmakope'de; canlı ND aşılılarında etkinlik testleri embriyolu yumurtalarda gerçekleştirilen virus titrasyon testleriyle, İnaktif ND aşılılarında *in-vivo* bir metot olan immunizasyon-seroloji ve immunizasyon-çalenç testleriyle ortaya konulabilmektedir. İmmunizasyon-seroloji testinde; 10 adet 21-28 günlük SPF civciv, aşı dozunun 1/50'si ile immunize edilmekte, bunu takip eden 17-21 gün sonra, immunize edilmemiş olan 10 adet kontrol grubu dahil tüm hayvanların kanları alınarak serumları ayrılmakta ve serum örneklerinde hemaglutinasyon inhibisyon testi (HI) testi ile oluşan antikor yanıt değerlendirilmektedir. Aşılı grubun

HI test sonuçları ortalamasının  $2^4$  ve üzerinde olması ve kontrol grubunun  $2^2$  ve altında sonuçlar vermesi aşuların etkinliğini göstermektedir. Seroloji testinde yeterli sonuç alınamaması halindeyse immunizasyon-çalenç testlerinin gerçekleştirilmesi istenmektedir. Çalenç testleri için 21-28 günlük yaştaki 20 SPF civcivden oluşan gruplar oluşturulmakta ve her bir grup bir aşı dozunun farklı dilüsyon oranları (1/25, 1/50, 1/100) ile aşılanmaktadır. Aşılamadan 17-21 gün sonra 6 log<sub>10</sub> Embriyo Lethal Doz<sub>50</sub> (ELD<sub>50</sub>) sahip velojenik karakterde bir çalenç suşu ile aşılanmış ve aşılanmamış kontrol grubunda bulunan civcivler eprüve edilmektedir. Eprüvasyonu takip eden 21 gün boyunca hayvanlar günlük olarak gözlemlenerek kontrol grubundaki civcivlerin 6 gün içerisinde ölmesi beklenmektedir ve aşılu gruptaki hayvanlardan hastalık semptomu göstermeksizin hayatta kalan civciv sayıları üzerinden koruyucu doz ("protective dose"-PD<sub>50</sub>) hesaplanarak potens hakkında karar verilmektedir (European Pharmacopoeia, 2017b). ABD'de ruhsatlanmış inaktif ND aşularında potens belirlemede "Code of Federal Regulations" CFR gereklilikleri uygulanmaktadır. Potens testi için aşının önerilen doz miktarı ile 2-6 haftalık yaş aralığındaki en az 10 SPF civciv aşılanmakta, aşılamadan en az 14 gün sonra aşılu ve kontrol grubunda bulunan civcivler eprüve edilmekte, 14 gün boyunca gözlemlenerek hayatta kalma oranları değerlendirilmektedir. Aşuların testi geçme kriteri en az %90 üzerinde bir koruyuculuk sağlamasıdır (USDA APHIS, 2018a). Gerçekleştirilmekte olan immunizasyon-challenge testleri sırasında patojen mikroorganizmaların kullanılması, biyogüvenlik seviyesi yüksek alanlara ("Bio Security Level" BSL-3) ya da izolatör gibi ekipmanlara ihtiyaç duyulması, uzun test süreleri gerekmesi gibi bir takım sınırlılıklar ve zorluklarla karşılaşmaktadır. İnaktif Newcastle hastalığı aşuları üzerinde yürütülen etkinlik çalışmaları, aşı içerisindeki antijen miktarı ve Newcastle hastalığı virusunun sahip olduğu yüzey proteini hemaglutinin-nöraminidaz (HN)'a karşı gelişen immun yanıt arasında güçlü bir korelasyon olduğunu göstermiştir (Claassen ve ark., 2003; Claassen ve ark., 2004). 2000'li yıllarda veteriner sahada alternatif metotların geliştirilmesi için kuduz, *Clostridia* spp., *Leptospira* spp., balık ve kanatlı aşuları üzerinde yoğunlaşmış ve bir kanatlı aşısı olan inaktif Newcastle aşularının potens kontrolünde ELISA testi, prevalidasyon ve validasyon çalışmaları gerçekleştirilerek 2007 yılında Avrupa Farmakope'ye alternatif bir metot olarak girmiştir (Claassen, 2011). Bildirilen çift antikor sandviç ELISA testi ile hiçbir aşılama uygulamasına gidilmeksizin doğrudan

yağ-su emülsiyonu formundaki inaktif ND aşıları içerisinde bulunan HN antijeni kantitatif olarak ölçülüp, bulunan değer referans antijenle kıyaslanır ve böylece relatif potens hesaplanarak aşılarda sahip olduğu antijen ünitesi (AU) üzerinden etkinlik/potens belirlenir (Claassen, 2011). Relatif potens hesaplanmasında, bir ürünün sahip olduğu doz veya potens, referans kabul edilen benzer bir ürünün doz veya potens temel alınarak eşdeğer bir değişim ile karşılaştırılması esastır. Relatif potens farmakolojik analizlerde doz-yanıt cevaplarını ve immunolojik ürünlerin bilinen bir ürüne göre etkinliğini değerlendirmekte kullanılabilir (Wilbur, 1993). Relatif potens hesaplanmasında test örneğinin referansla benzer yapıda olması, farklı dilüsyon noktalarında oluşan yanıtın referansa benzer bir eğim ile sabit bir oranda değişim göstermesi önemli olup, bu amaçla eğim oranı analizleri, paralel doğru analizleri ve sigmoid eğri analizleri kullanılabilir (Siev, 1997; Dinse ve Umbach, 2011). İnaktif ND aşılarının *in-vitro* metotlarla değerlendirildiği çeşitli çalışmalarda geleneksel *in-vivo* metotlarla arasında kabul edilebilir düzeyde korelasyon olduğu bildirilmiştir. (Claassen ve ark., 2003; Claassen ve ark., 2004; Motitschke ve Jungbäck, 2011).

Bu çalışmada, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü bünyesinde hizmet veren, ülkemizde veteriner sahada kullanılan biyolojik ürünlerin kalite kontrol testlerini gerçekleştirmekten sorumlu olan Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Bölümü'nce kontrolleri sağlanan inaktif Newcastle hastalığı aşılarında *in-vivo* testlere alternatif *in-vitro* bir metot olan ELISA testi ile, aşı içerisindeki antijen miktarı belirlenerek etkinliğin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. Genel Bilgiler

Newcastle hastalığı evcil ve yabani birçok kanatlı türünde görülebilen oldukça bulaşıcı viral bir hastalıktır (Swayne ve King, 2003). Yüksek morbidite ve %100'e varan mortalite oranları ile dünyadaki en önemli kanatlı hastalıklarından biri olarak kabul edilmektedir (Cattoli ve ark., 2011). Newcastle hastalığına *Paramyxoviridae* ailesi *Avulavirus* genusu içerisindeki virulan Avian *Paramyxovirus* (APMV)-1 suşları neden olmaktadır (Miller ve Koch., 2013; Aly ve ark., 2018). Hastalık klinik açıdan belirtisiz vakalardan, sindirim, solunum ve sinir sisteminde belirtiler sergileyen ve hızla ölümcül safhaya ilerleyen vakalara kadar geniş bir aralıkta görülebilmektedir (Cattoli ve ark., 2011).

### 2.1. Etiyoloji

Avian *Paramyxoviruslar* antijenik yapısındaki farklılıklara göre 15 farklı serotipe (APMV1-15) ayrılmaktadır (Alexander ve Gough, 2003; Meng ve ark., 2016). Newcastle hastalığı etkeni APMV-1, *Paramyxoviridae* ailesi *Avulavirus* genusu içerisinde yer alır (Butt ve ark., 2018). APMV-1 zarflı bir virus olup viryonları 100-500 nm'lik boylarda yuvarlak, filamentöz, pleomorfik fomda görülebilmektedir (Miller ve Koch, 2013). NDV genomu 15.186-15.198 kilobaz ağırlıkta negatif polariteli, tek iplikçikli, segmentsiz bir RNA'dan oluşmaktadır (Czegledi ve ark., 2006; Liu ve ark., 2018).

### 2.2. Epidemiyoloji

Hastalık ilk olarak Endonezya'nın Java adasında ve ardından İngiltere'de bir liman kenti olan Newcastle upon Tyne kasabasında görülmüş ve ilk kez ortaya çıktığı bu yerle anılan bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Hastalığa en duyarlı tür tavuklar olmakla beraber hindi, güvercin, kanarya, tavus kuşu, sülün, bildircin, muhabbet kuşu, ördek, kaz, deve kuşu gibi evcil ve yabani 250'nin üzerinde farklı kanatlı hayvan türünde görülebilmektedir (Von Messling, 2017; Spickler, 2016). APMV-1 izolatları tek bir serotipe ait olmasına rağmen genotipik yapıdaki değişiklikleri ortaya

koyan filogenetik analizlerle sınıf I ve sınıf II olarak ayrılmış ve bu sınıflar içerisinde farklı genotipler tanımlanmış olup, hastalığa yaygın olarak sınıf II içerisinde bulunan velojenik karakterdeki genotip VII içerisinde sınıflandırılan viruslar neden olmaktadır. Bulaşma enfekte hayvanların birbirleri ile direkt teması ile alimenter yolla ve enfekte partiküllerin inhalasyonu yolu ile olmaktadır (Von Messling, 2017). Hastalığın hızlı yayılımında; hastalığın endemik olduğu ülkelerden yasal veya yasadışı enfekte canlı hayvan veya ürünlerinin ithalatı, enfekte egzotik kafes kuşları ile yabani kuşların hareketleri, çeşitli amaçlarla (yarış, gösteri veya etlik) yetiştirilen güvercinler ve kumruların pazarlar arası hareketleri sayılabilir (Miller ve Koch, 2013; Bello ve ark., 2018).

### **2.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler**

ND'nin klinik belirtileri; virusun virulansı, doku affinitesi, enfektif doz miktarı, kanatlı tür, yaş ve bağışıklık durumuna bağlı olarak büyük farklılıklar gösterir. Enfekte tavuklarda görülen klinik bulgulara göre beş klinik form tanımlanmıştır (Brown ve ark., 1999; Alexander ve Gough, 2003).

*Viserotropik velojenik:* Yüksek mortalite ve yoğun hemorajik enteritin görüldüğü formdur.

*Nörotropik velojenik:* Yüksek mortalite ile solunum ve sinir sistemlerindeki belirtilerin yaygın olduğu formdur.

*Mezojenik:* Düşük mortalite ile seyreden solunum sistemindeki hafif belirtiler ve nadiren sinirsel bulgularla karakterize formdur.

*Lentojenik:* Solunum sistemine ilişkin bozukluklarla karakterize bir formdur.

*Aseptomatik:* Avirulan bir form olup subklinik enterik enfeksiyona neden olabilmektedir.

Virusun inkubasyon periyodu 2-15 gün arasında değişmekle beraber ortalama 5-6 gün olup, velojenik izolatlarla enfekte olmuş tavuklarda 2 güne kadar düşebilmektedir, aşırı virulan virus türleriyle enfeksiyon halinde kısa süre içinde ölü bulunan çok sayıda kanatlı görülebilir (OIE, 2012). NDV insanlarda lokal bir keratokonjoktivite sebep olmakta, enfeksiyon maruziyet sonrası 24 saat içinde

gelişmektedir (Swayne ve King, 2003). İnsan enfeksiyonlarında karşılaşılan klinik belirtiler, gözlerde tek taraflı veya iki taraflı kızarıklık, lakrimasyon, göz kapaklarında ödem, konjoktivit ve subkonjoktival kanama şeklindedir. Enfeksiyona bağlı gözlerdeki etki şiddetli olsa da, genellikle geçicidir ve kornea etkilenmez (OIE, 2012). Risk grubundaki kişilerin, virusla enfekte sınırlara doğrudan maruz kalan laboratuvar personeli ya da kanatlı hayvanlarla yakın teması olan yetiştiriciler olduğu ve enfeksiyon oluşumu için virusun yüksek konsantrasyonlarına maruz kalınması gerektiği bildirilmiştir (Spickler, 2016).

#### **2.4. Tanı**

Newcastle hastalığı klinik olarak kanatlı kolerası, kanatlı çiçeği, psittakoz, aspergilloz, mikoplazmoz ve enfeksiyöz bronşit, enfeksiyöz larengotrakeit, kuş gribi gibi solunum yoluna ilişkin bulgularla karakterize birçok enfeksiyonla karışabilmektedir (Piacenti ve ark., 2006). Baş bölgesinde ödem, şişlik ile ibik ve sakalda siyanoz, seröz membranlarda peteşiyal kanama, solunum ve sindirim sistemine ilişkin lenfoid dokularda özellikle de sekal tonsiller ve peyer plaklarında ülser ve nekroz görülmesi Newcastle hastalığını düşündürse de ND için patognomonik kabul edilmemekte ve kesin tanı laboratuvar testleri ile konulabilmektedir (Miller ve Koch, 2013; OIE, 2012). ND süpheli materyalle çalışılacağı zaman en az BSL-2 düzeyinde çalışılması, eğer virulan NDV suşlarının üretimi veya eprüvasyon çalışmalarında kullanılması gerekiyorsa BSL-3 seviyesi gereklidir (OIE, 2012). NDV tanısında altın standart, virus izolasyonu ve identifikasyonu olarak kabul edilmektedir (Alexander, 2000). Bu amaçla enfeksiyon belirtisi taşıyan canlı kanatlılardan alınan trakeal, orofarengeal ya da kloakal sıvıplar ile ölü hayvanlardan alınan akciğer, böbrek, bağırsak (içeriğiyle birlikte), dalak, beyin, karaciğer ve kalp dokuları ayrı ayrı ya da birlikte antibiyotik (penisilin-2000 ünite/ml, streptomisin-2 mg/ml, gentamisin-50µg/ml, ve mikostatin-1000ünite/ml) içeren PBS ile karıştırılarak 9-11 günlük SPF yumurtaların allantoik boşluğuna ekilir ve 4-7 gün boyunca 37 °C'de %50-70 relatif nem içeren ortamlarda inkübe edilir. Süre sonunda ölüm görülen yumurtalara ait allantoik sıvılarda hemaglutinasyon (HA) testi yapılır. HA testi negatif çıkan örneklerde SPF yumurtalarda bir ileri pasaj daha yapılması önerilmektedir (OIE, 2012). Bazı NDV suşları embriyolu yumurtalarda

çoğalmamakta, civciv embriyo fibroblast, civciv embriyo karaciğer, civciv embriyo böbrek gibi primer hücre hatlarına; Afrika yeşil maymun böbrek epitelyal hücreleri, bebek hamster böbrek fibroblast hücre hatları gibi devamlı hücre hatlarına ihtiyaç duymaktadır (Lumeij ve Stam, 1985; McGinnes ve ark., 2006). NDV'nin sitopatik etkisi; sitoplazmik inklüzyon cisimcikleri, sinsityum ve dev hücre oluşumu ve takibinde hücre parçalanmasına bağlı olarak ortaya çıkan plaklardır (Von Messling, 2017; Miller ve Koch, 2013). İnokule edilmiş embriyolu yumurtalara ait allantoik sıvıda HA testi pozitifliği bakteriyel kontaminasyon, "Avian Influenza" (AI) ve diğer APMV enfeksiyonları varlığında da görülebileceğinden, pozitif sonuç veren örneklerde NDV spesifik antiserumu ile HI testi ya da moleküler tanı yöntemleriyle identifikasyona gidilebilir (Cattoli ve ark, 2011; OIE,2012). Konvansiyonel testlerle günlerce süren identifikasyon testleri moleküler yöntemler olan ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ("Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction" RT-PCR), kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ("Quantitative Polymerase Chain Reaction" q-PCR), teknikleri ile saatler içinde sonuç vermekte, bu teknikler identifikasyon ve patotiplendirme çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar (Bello ve ark., 2018). Bütün Newcastle hastalığı virusları APMV-1 olarak kabul edilse de Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü ("World Organisation for Animal Health"-OIE) tarafından sadece virulan APMV-1 ile gelişen enfeksiyonlar hastalık olarak kabul edilmekte ve virulan olduğu belirlenen saha izolatlarının OIE'ye bildirilmesi gerekmektedir. Newcastle hastalığına neden olan izolatlarda APMV-1 suşunun virulansını belirlemek için *in-vivo* ve moleküler test yöntemleri kullanılabilir (Dimitrov ve ark., 2017). Patotiplendirme çalışmalarında moleküler yöntemlerin yeterli olmadığı durumlarda, yeni bir izolatı karakterize etmek için, *in-vivo* testler olan; yumurtada ortalama ölüm süresi (MDT), intraserebral patojenite indeksi (ICPI), intravenöz patojenite indeksi (IVPI) testleri kullanılabilirle beraber OIE'nin geçerli kabul ettiği test ICPI testidir (OIE, 2012).

## 2.5. Tedavi ve Koruma

Newcastle hastalığının bilinen bir tedavisi bulunmamaktadır (Miller ve Koch, 2013). Hastalığın çok sayıda farklı evcil ve yabani kuş türünde görülebilmesi ve özellikle yabani kuşların asemptomatik olarak virusu taşıması, hastalığın yayılımını



kolaylaştırdığı için kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde hastalıkla mücadelede biyogüvenlik önlemleri, hijyen tedbirleri ile aşılama uygulamalarının birbirleriyle uyumlu bir şekilde yürütülmesi gerekmektedir (Bello ve ark., 2018). Özellikle hastalığın endemik olduğu bölgelerde gerçekleştirilen tavukçuluk faaliyetlerinde aşılama yapılmasının hastalıktan korunmada önemli bir yeri bulunmaktadır (Von Messling, 2017). Etkin bir aşılama için bölgedeki virulan NDV tipi, kullanılacak aşı türü (canlı ya da inaktif), aşının uygulanma yolu, aşılanacak hayvanların bağışıklık ve hastalık durumları, civcivlerin sahip olduğu maternal antikör seviyesi, önemli parametrelerdir (Gallili ve Ben-Nathan, 1998; Spickler, 2016). Newcastle hastalığına karşı kullanılmakta olan canlı, inaktif yağ emülsiyonlu ve vektör aşılar bulunmaktadır (Dimitrov ve ark., 2017; Senne ve ark., 2004). Canlı aşılar mezojenik, lentojenik ya da apatojenik enterik formdaki suşlar kullanılabilir. Lentojenik suşlar; Lasota, Clone 30, VG/GA, Hitchner B1, VH, F asemptomatik enterik suşlar; Ulster 2C, V4, I<sub>2</sub>, PHY.LMV.42 mezojenik suşlar; Mukteswar, Roakin, Komarow, Hertfordshire olarak gruplanmıştır (Allan ve ark., 1978; Carlı, 2018; Gallili ve Ben-Nathan, 1998; Bello ve ark., 2018). Canlı aşılarla aşılama sonrası, Lasota suşu ile solunum sisteminde yan etkiler gelişebilirken Hitchner B1 ve F suşlarında böyle bir etki görülmemektedir ve ilk aşılama B1 suşu içeren aşılarla başlatılıp ardından daha uzun süreyle ve güçlü bir immün yanıt elde etmek için Lasota suşu içeren canlı aşılar kullanılmaktadır. (Allan ve ark., 1978; Senne ve ark., 2004; Bello ve ark., 2018). Canlı aşıların solunum sistemi üzerindeki yan etkilerinin ortadan kaldırmak için rekombinant vektör aşılar geliştirilmiştir. (OIE, 2012; Miller ve Koch, 2013). Rekombinant aşıların, klasik canlı aşılarla karşılaşılan maternal antikör varlığında aşı etkinliğinin azalmasına yönelik olumsuzlukları ve aşılamaya bağlı viral yayılımı da azaltabileceği bildirilmektedir (Bello ve ark., 2018). İnaktif aşılar lentojenik karakterdeki ND virusların embriyolu yumurtalarda yoğun bir şekilde üretilmesi ardından amniyo allantojik sıvının (AAF) steril koşullarda toplanması ve kimyasal ajanlarla (Formol, Betapropiolakton (BPL) ve Binarietilamin (BEI)) inaktive edilerek emülsifiye edici mineral veya bitkisel yağlarla biraraya getirilmesi şeklinde gerçekleştirilmektedir (Allan ve ark., 1978; Tlaxca ve ark., 2015; Razmarai ve ark., 2012). İnaktif aşıların yeterli seviyede bir bağışık yanıt oluşturması için fazla miktarda antijen içerecek şekilde veya bağışık yanıtın gücünü

artırıcı bileşenler olan adjuvanlar eklenerek üretimi gereklidir (Allan ve ark., 1978; Bastola ve ark., 2017).

### **3. Gereç ve Yöntem**

#### **3.1. Gereç**

##### **3.1.1. Deney Hayvanları**

Çalışmada kullanılan Beyaz Leghorn ırkı SPF civcivler Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Deney Hayvanları Birimi'nde bulunan SPF kümeden temin edilmiştir. İmmünizasyon-seroloji testleri yürütülürken, her kafes içinde 10 adet civciv, 24-26°C sıcaklık, % 50-65 bağıl nem ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ışık periyodu altında tutulmuştur. İmmünizasyon-çalenç testlerinde ise civciv izolatörleri kullanılmıştır. Tüm çalışma boyunca civcivlere % 20-22 oranında protein ihtiva eden civciv büyütme yemi ve içme suyu verilerek ad libitum (hayvanlara serbest olarak, yiyebildiği kadar yemleme yapılması) besleme yapılmıştır. Araştırmanın gerçekleştirilmesinde, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 26.04.2017 tarihli 71705440-170-2605 sayılı karar numarası ile etik açıdan sakınca bulunmadığı bildirilmiştir.

##### **3.1.2. Kimyasallar**

###### **3.1.2.1. Fosfat Buffer Solüsyonu (PBS)**

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g (susuz)

Distile Su q.s. 1 L

Manyetik karıştırıcıda eritilerek pH 7,2-7,4'e ayarlanmış ve otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edilmiştir.

### 3.1.2.2. Kaplama Solüsyonu

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2,65 g/500 ml distile su

NaHCO<sub>3</sub> 2 g/1000 ml distile su

Çözdürülmüş olan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub> üzerine pH 9,6 olacak şekilde eklenmiştir. 4 °C'de 1 ay süreyle saklanmıştır.

### 3.1.2.3. ELISA Buffer

0,5 ml %10'luk Tween-80, 99,5 ml PBS içerisine katılmış ve üzerine 5,1 g NaCl ve 1 g Bovine serum albümin (BSA) eklenerek manyetik karıştırıcı ile eritilmiştir bu solüsyon 4°C'de 1 hafta süreyle saklanmıştır.

### 3.1.2.4. Yıkama Solüsyonu

NaCl 8 g

KCl 0,2 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,15 g (susuz)

Tween 80 0,5 ml

Distile Su q.s. 1 L

Manyetik karıştırıcıda eritilerek pH 7,2-7,4'e ayarlanmıştır.

### **3.1.2.5. Stop Solüsyonu(0,5 M)**

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	27,76 ml
Distile Su	q.s. 1 L

### **3.1.2.6. Diğer Kimyasallar**

3,3',5,5'-Tetrametil benzidin (TMB) solüsyonu kullanıma hazır formda substrat şeklinde ticari bir firmadan temin edilmiştir.

### **3.1.3. Antijen ve Antikorlar**

#### **3.1.3.1. NDV Spesifik Monoklonal Antikor (MoAb)**

Newcastle hastalığı virusu HN proteinine ait 335-355 aminoasitlik lineer epitop bölgesine spesifik MoAb.

#### **3.1.3.2. NDV Spesifik Konjuge Antikor (Tespit Antikoru)**

Newcastle hastalığı virusu HN proteinine ait 335-355 aminoasitlik lineer epitop bölgesine spesifik "Horse radish peroxidase" (HRPO) ile konjuge MoAb.

#### **3.1.3.3. NDV Referans Antijen**

Formolle inaktive edilmiş, şişesinde 6 AU sahip antijen bulunduran liyofilize formda NDV Ulster 2C suşu.

#### **3.1.3.4. NDV Kontrol Antijen**

B-propiolaktonla inaktive edilmiş ve içerisinde bulunan AU bilinmeyen liyofilize formda Lasota suşu.

#### **3.1.3.5. Sertifikalı Referans Standart (SRS) Antijen APMV-1**

Ticari firmalardan temin edilmiş olan, test edilen aşı suşlarına spesifik titresi bilinen pozitif antijen.

#### **3.1.3.6. Sertifikalı Referans Standart (SRS) Antiserum APMV-1**

Ticari firmalardan temin edilmiş test edilen aşı suşlarına spesifik, titresi bilinen pozitif antiserum.

#### **3.1.4. NDV Eprüvasyon Suşu**

Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Bölümü bünyesinde muhafaza edilen NDV Herts 33/56 suşunun titresi (ELD<sub>50</sub>) testi ile belirlenmiştir. Suşun moleküler karakterizasyonu Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından DNA dizi analizleriyle doğrulanmıştır. Eprüvasyon suşunun titresi 9-11 günlük embriyolu yumurtalara yapılan 3 farklı ekim sonucunun Spearman-Kaerber metoduna göre değerlendirilmesi ile 10<sup>8,16</sup> ELD<sub>50</sub>/0,2 ml olarak bulunmuştur. Eprüvasyon uygulamaları için titresi belirlenmiş olan Herts 33/56 virus süspansiyonundan 6 log<sub>10</sub> ELD<sub>50</sub>/0,5 ml'lik eprüvasyon dozu oluşturulmuştur.

#### **3.1.5. Kullanılan Cihaz ve Gereçler**

- Soğutmalı santrifüj
- Etüv

- Buzdolabı
- Çok gözlü mikrolaka okuyucu (450 nm)
- Çok gözlü plaka yıkayıcı
- Çok gözlü plaka termoshakerı
- Bilgisayar ve yazıcı
- Vorteks
- Hassas terazi
- Laboratuvar tipi bidistile su cihazı
- Laboratuvar Gereçleri
- Otomatik pipet
- Mikropipetler (200 µl, 1000 µl) ve standı
- Çok kanallı mikropipet (8 kanallı 30-300 µl)
- Mikroenjektörler (0,001 ml'lik hassasiyette)
- Mikropipet uçları ( 200 µl, 1000 µl)
- Otomatik pipet uçları(5-10-20 ml)
- 96 kuyucuklu F tabanlı mikrolaka (yüksek bağlama kapasiteli-Nunc Maxisorp)
- 96 kuyucuklu V tabanlı mikrolaka ( HI testi için)
- Kan tüpleri (eppendorf)
- Kriyoviyal tüp (2 ml)
- Steril polypropilen tüp (15 ml, 50 ml)
- Mikrolaka sızdırmazlık bantları
- Cıvıv izolatörleri
- Cıvıv büyütme kafesleri

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. İş Akışı ve Koordinasyon**

Proje çerçevesinde planlanan tüm çalışmalar Ege Üniversitesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ile Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Bölümü'nde yürütüldü.

### 3.2.2. Aşıların Hazırlanması ve Temini

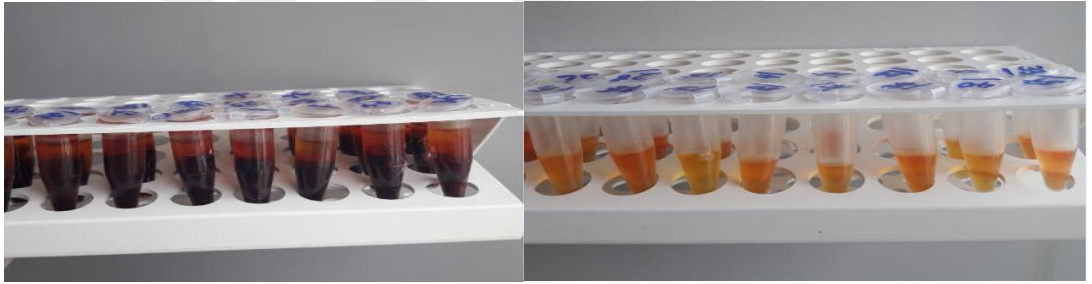
Bu tez çalışmasında, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Bölümü'ne, satışa esas kontrole gelen, farklı marka ve serilerde sadece NDV komponenti içeren tek komponentli ve NDV yanında başka aşı bileşenleri de içeren kombine karakterde toplam 9 inaktif aşı ile olası yalancı reaksiyonların tespiti için içerisinde NDV komponenti içermeyen 2 inaktif aşı, *in-vivo* testlerden immunizasyon-seroloji veya immunizasyon-çalenç testleri ile *in-vitro* ELISA testinde kullanıldı. Kullanılan aşıların içerikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Kullanılan aşılar ve içerikleri

	<b>Aşı Suşu</b>	<b>Aşı Tipi</b>	<b>İnaktivasyon ajanı</b>
<b>Aşı-1</b>	Lasota suşu	Kombine	Formaldehit
<b>Aşı-2</b>	VH suşu	Monovalan	Formaldehit
<b>Aşı-3</b>	Clone 30 suşu	Kombine	Formaldehit
<b>Aşı-4</b>	Lasota suşu	Kombine	Formaldehit
<b>Aşı-5</b>	Lasota suşu	Kombine	Formaldehit
<b>Aşı-6</b>	Ulster 2C	Monovalan	Formaldehit
<b>Aşı-7</b>	Lasota suşu	Kombine	B-propiolaktan
<b>Aşı-8</b>	Lasota suşu	Monovalan	Etilen-imin
<b>Aşı-9</b>	Lasota suşu	Kombine	Formaldehit
<b>Aşı-10</b>	Reovirus suşu	Multivalan	Formaldehit
<b>Aşı-11</b>	<i>Avibacterium paragallinarum</i> serotip A,B,C	Multivalan	Formaldehit

### 3.2.3. İmmünizasyon-Seroloji Testi

Her aşı örneği için SPF sürüden elde edilen ve her biri 21-28 günlük yaştaki 10 civciv kullanıldı. Kontrol grubu olarak en az 5 civciv aşılanmadan bırakıldı. Her gruptaki 10 SPF civcive mikro enjektörle aşı dozunun 1/50' si kas içi yolla verildi. Uygulamadan 17-21 gün sonra her bir civcivden en az 1 ml kan alınarak serumları ayrıldı (Resim 1). Serum örnekleri 56°C'de 30 dakika boyunca bekletilerek komplemanın inaktivasyonu sağlandı ve -20°C'de muhafaza edildi. OIE Manuel Bölüm 2.3.14 belirtildiği şekilde hemaglutinasyon (HA) ve hemaglutinasyon inhibisyon (HI) testleri ile serumların antikor titresi hesaplandı (OIE., 2012). Aşılar için Avrupa Farmakope'de tanımlanan etkinlik kriteri, aşılu grupta ortalama HI titresinin 4.0 log<sub>2</sub> üzerinde, aşılanmamış kontrol grubunda ise 2.0 log<sub>2</sub> ve altında olmasıdır.



**Resim 1.** Ependorf tüplerindeki kan örnekleri ve serumları

### 3.2.4. Hemaglutinasyon Testi

HA testi ile HI testinde kullanılacak olan referans antijenin 4 hemaglutinasyon ünitesine (HAU) ayarlanması amaçlanmakta olup test aşağıda tanımlandığı gibi yürütüldü.

- 96 kuyucuklu V tabanlı mikropolanın tüm kuyucuklarına 25µl PBS eklendi.
- İlk kuyucuklara SRS antijenden 25µl ilave edildi ve ardından iki katlı seri dilüsyon yapıldı.
- Dilüsyon yapılan tüm kuyucuklara tekrar 25µl PBS ilave edildi ve ardından tüm kuyucuklara 25µl %1'lik yıkanmış tavuk eritrositi eklendi.



- Negatif kontrol (kan kontrol) amacıyla ayrılan kuyucuklara 25µl PBS ve üzerine 25µl %1'lik tavuk eritrositi eklendi.
- Plakanın kenarlarına hafifçe vurularak iyice karışması sağlandı ve yaklaşık  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 40 dakika kadar beklendi.
- Süre sonunda eritrositlerin aglutinasyonuna bağlı olarak dantela tarzında görüntü oluşan gözler HA (+), aglutinasyon olmaksızın eritrositlerin mikrolakaya tabanına çökmesi sonucu düğme formasyonu şeklinde görüntü oluşan gözler HA (-) kabul edildi. Dantela tarzında görüntü oluşan son dilüsyon basamağı %100 HA veren dilüsyon basamağı kabul edildi ve 1HAU olarak belirlendi. %100 HA veren dilüsyon basamağının 4'e bölünmesi ile kullanılacak olan 4HAU'ya sahip dilüsyon basamağı belirlendi. Örneğin 1/512'lik dilüsyonda %100 HA görüldüyse  $512/4=128$ , 1 kısım antijen 127 kısım PBS ile karıştırıldı. Elde edilen bu 4HAU'ya sahip süspansiyon mikrolakada iki paralel olacak şekilde çalışıldı 1/2 ve 1/4 'lük dilüsyonlarda tam hemaglutinasyon verdiği görüldükten sonra HI testinde çalışma dilüsyonu olarak kullanıldı (Resim 2).



**Resim 2.** 4HAU'ya ayarlanmış olan antijen

### 3.2.5. Hemaglutinasyon İnhibisyon Testi

- 96 kuyucuklu V tabanlı mikropakanın tüm kuyucuklarına 25µl PBS eklendi.
- Aşılı hayvanlara ve kontrol grubuna ait serum örneklerinden plakanın ilk sırasına 25µl eklendi ve iki katlı seri dilüsyonları yapıldı.
- Pozitif kontrol için ayrılan sıraya SRS antiserumdan 25µl ilave edildi ve iki katlı seri dilüsyonları yapıldı. Seri dilüsyonlar sonrası tüm kuyucuklara 4HAU'ya ayarlanmış olan SRS antijeninden 25µl eklendi.
- Plakanın kenarlarına hafifçe vurularak iyice karışması sağlandı ve yaklaşık 22±3°C'de 30 dakika süreyle beklendi.
- Bekleme süresi sonunda tüm kuyucuklara %1'lik yıkanmış tavuk eritrositinden 25µl eklendi ve hafifçe vurularak karışması sağlandı ve 22±3°C'de 40 dakika süreyle beklendi.
- Bekleme süresi sonunda plaka eğilerek değerlendirildi.
- Düğme formasyonu şekillenen ve gözyaşı damlası şeklinde akan gözler HI (+) kabul edildi. HI titresi 4 HAU antijeni tümüyle inhibe eden serumun en yüksek dilüsyonu olarak değerlendirildi.
- Dantela tarzında görüntü oluşan ve gözyaşı damlası şeklinde akıntı oluşmayan gözler HI (-) kabul edildi.
- Testin geçerliliği negatif kontrol (kan kontrol) kuyucuklarında eritrositlerin antijen ile bağlanıp dantela tarzında görülmesi ve pozitif kontrol (SRS antijen ve antiserum olan) kuyucuklarında inhibisyona bağlı düğme formasyonu oluşması ve plaka eğimli tutulduğunda gözyaşı damlası şeklinde bir görüntü oluşması ile sağlandı.

### 3.2.6. İmmünizasyon-Çalenç Testi

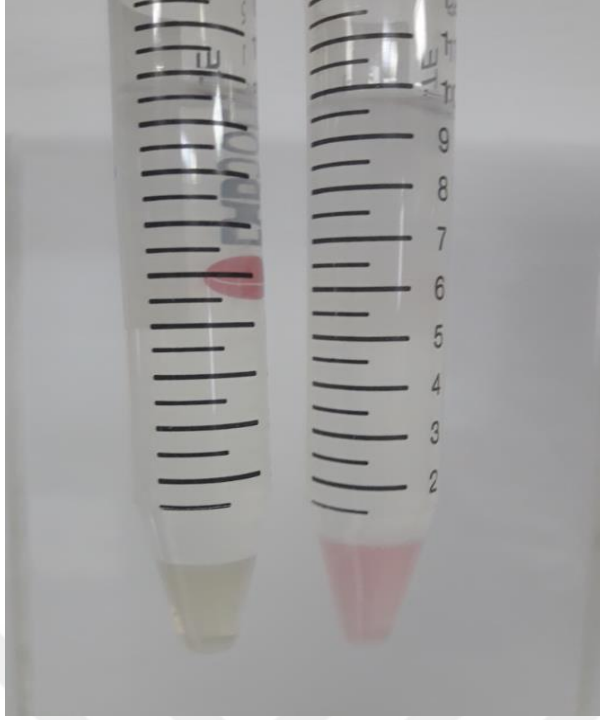
- Avrupa Farmakope'nin 0870 sayılı monografi gereği SPF sürüden elde edilen ve her biri 21-28 günlük civcivler kullanıldı.
- Her birinde 20 civcivin bulunduğu test grupları bir aşı dozunun değişen (1/12,5, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200) oranları ile kas içi yolla aşılandı.
- 10 civciv ise kontrol grubu olarak bırakıldı.

- Aşılamadan 17-21 gün sonra kontrol grubu da dahil tüm gruplar kas içi yolla  $6 \log_{10}$  ELD<sub>50</sub>/doz içeren velojenik APMV-1 (Herts 33/56) ile eprüve edilerek izolatöre yerleştirildi.
- Uygulama sonrası 14 gün boyunca tüm gruplarda Newcastle hastalığı semptomlarını göstermeksizin hayatta kalan civcivler tespit edilerek “Reed and Muench” yöntemine göre koruyucu doz (PD<sub>50</sub>) hesaplandı (Ramakrishnan, 2016).
- Testin geçerli olabilmesi için eprüvasyon sonrası kontrol grubundaki tüm hayvanların 6 gün içinde ölmesi ve etiket bilgisinde verilen en küçük doz aralığındaki koruyucu doz değerinin 50 PD<sub>50</sub>'den büyük olup olmadığı değerlendirildi.

### 3.2.7. Aşıların Ekstraksiyon İşlemi

Test edilecek aşıların ELISA testine alınabilmesi için ekstraksiyon işlemiyle aşı içerisindeki yağ-su emülsiyonunun bozulması ve antijenin su fazı içerisinde serbest kalmasının sağlanması gerekmektedir (Claassen, 2011).

- Bu işlem için 8 ml izopropilmiristat (IPM) 2 ml'lik aşı numunesiyle 15 ml'lik bir tüp içerisinde 1 dakika kadar vortekslendi.
- Karışım 10 dakika boyunca soğutmalı santrifüj kullanarak 8°C'de 2500 rpm'de santrifüjlendi.
- İşlem sonunda tüpün üst kısmında kalan sıvı kısım (yağ+IPM) pipetlenerek uzaklaştırıldı (Resim 3).
- Tüpün dip kısmında kalan değişik renk ve görünümdeki ve yaklaşık 0,5-1 ml'lik hacimlerdeki sıvı kısım kriyoviyallere aktarıldı.



**Resim 3.** Ekstraksiyon işlemi sonrası ayrılmış olan su ve yağ fazı

### 3.2.8. ELISA Testi

İnaktif ND aşlarının potensinin belirlenmesinde APMV-1 serotipinin sahip olduğu HN protein miktarının ölçümüne dayanan çift antikor sandviç (DAS) ELISA prosedürü kullanıldı. Aşı örneklerinin relatif potensi, sahip olduğu HN protein miktarı bilinen referans antijen (6AU/şişe) ile içerdiği antijen miktarı bilinmeyen test örnekleri kıyaslanarak antijen ünitesi (AU) olarak belirlendi (Claassen ve ark., 2004).

- Kaplama antikor-MoAb 1,5 ml distile su içerisinde çözüldü. Üretim lotunda belirtilmiş olan dilüsyon oranında sodyum karbonatlı kaplama buffer solüsyonu içinde 1/20 oranında dilüe edilip 96 kuyucuklu F tabanlı ELISA mikropalakasının tüm kuyucuklarına 100 µl eklendi. Mikropalaka, sızdırmazlık bandı ile kapatılıp 37°C’ de 2 saat inkübe edildi.
- Mikropalaka 350 µl/kuyucuk olacak şekilde 0,05% Tween 80 solüsyonu ile 3 defa yıkandı ve kâğıt havlu üzerinde kurutuldu.
- Referans antijen ve kontrol antijen üretim lotunda belirtilmiş olan dilüsyon oranında 1,5 ml ELISA buffer solüsyonu içinde çözüldü. Transfer

mikroplakanın A1-B1 kuyucuğuna 250 µl referans antijen, B1-B7 kuyucuğuna kontrol antijen 250 µl eklendi. Geri kalan tüm kuyucuklara 125 µl ELISA buffer ilave edildi. Mikroplakanın yukarıdan aşağıya C1'den H1'e kadar olan kuyucuklarına ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuş aşırı örnekleri ELISA buffer içerisinde 1/4 oranında sulandırılarak 2'şerli setler şeklinde 125 µl/kuyucuk olacak şekilde eklendi. 2 katlı seri dilüsyonlar yapılarak soldan sağa doğru plakanın 11. kuyucuklarına kadar gelindi ve her dilüsyon basamağındaki son kuyucuklar sadece ELISA buffer konularak kör kuyucuklar olarak boş bırakıldı. Transfer plakasında gerçekleştirilen dilüsyon işlemlerinden sonra tüm plaka içeriği antikor kaplı mikroplaka kuyucuklarına 100 µl olacak şekilde transfer edildi.

- Mikroplakalar sızdırmazlık bandı ile kapatılıp ve 37°C 'de 4 saat inkube edildi. İnkubasyon sonrası mikroplaka 350 µl/kuyucuk olacak şekilde 0,05% Tween 80 solüsyonu ile 3 defa yıkandı ve kâğıt havlu üzerinde kurutuldu.
- HRPO konjugatı ile işaretli antikor, üretim lotunda belirtilmiş olan dilüsyon oranında 1,5 ml ELISA buffer solüsyonu içinde çözüldü. Çözülmüş olan konjugat 20x oranında ELISA buffer ile sulandırılıp mikroplakanın tüm kuyucuklarına 100 µl ilave edildi. Mikroplaka sızdırmazlık bandı ile kapatılıp 37°C'de 1 saat inkube edildi. İnkubasyon sonrası mikroplaka 350 µl/kuyucuk olacak şekilde 0,05% Tween 80 solüsyonu ile 3 defa yıkandı ve kâğıt havlu üzerinde kurutuldu.
- Mikroplakanın tüm kuyucuklarına 100 µl TMB substratı eklenip 15 dakika oda sıcaklığında inkube edildi. İnkubasyon sonrası stop solüsyonu (0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) tüm kuyucuklara 100 µl ilave edildi.
- Son olarak ELISA okuyucu ile 450 nm dalga boyunda optik dansite (OD) ölçüldü ve veriler kaydedildi.
- Çalışmada kullanılacak tüm reagenler çalışma öncesi oda ısısına getirildi. Plaka üzerine referans antijen, kontrol antijen ve aşırı örneklerinin dilüsyon oranları Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2.** Aşı örneklerinin dilüsyon oranları

Referans	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Kontrol	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
Referans	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Kontrol	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
Aşı 1-1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1028	1/2048	1/4096	1/8192	Kör
Aşı 1-1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1028	1/2048	1/4096	1/8192	Kör
Aşı 2-1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1028	1/2048	1/4096	1/8192	Kör
Aşı 2-1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1028	1/2048	1/4096	1/8192	Kör
Aşı 3-1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1028	1/2048	1/4096	1/8192	Kör
Aşı 3-1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1028	1/2048	1/4096	1/8192	Kör

### 3.2.9. Test Sonuçlarının Yorumlanması

EDQM tarafından sağlanan Combistats İstatistiksel Analiz Yazılım Programının “Combistats Software Statistical Analysis of Biological Dilution Assay Results or Potency Assay 5.0” güncel versiyonu kullanılarak yalnızca dilüsyon oranları ile uyumlu olan dinamik aralıktaki OD değerleri dahil edilerek en fazla 5 ardışık dilüsyon basamağı hesaplamaya dahil edildi. Program kullanılarak test edilen örneklerden alınan OD değerleri ile kullanılan referans antijenin farklı dilüsyon düzeylerinden alınan OD değerleri paralel doğru analizi yöntemiyle logaritmik değerlere dönüştürülerek relatif potens AU/ml cinsinden hesaplandı. İmmünizasyon-seroloji, immünizasyon-çalenç ve ELISA test sonuçları arasındaki ilişki Minitab İstatistik Programı kullanılarak değerlendirildi. Aynı günde iki tekrarlı çalışılan örnekler arasındaki OD değerleri arasındaki varyasyon katsayısı (%CV) ile farklı günlerde 6 örneğin 6 tekrarlı çalışılması ile elde edilen relatif potens değerlerine ilişkin varyasyon katsayısı (%CV) hesaplandı (Türkbal, 2011). ELISA prosedürünün

duyarlılık, özgüllük, relatif doğruluk oranı *in-vivo* test sonuçları esas alınarak hesaplandı (Duygu ve Udoh, 2017).

#### 4. Bulgular

Araştırmamızda, farklı firmalara ait tek komponentli ya da kombine karakterde ve içerisinde farklı lentojenik ND virus suşları içeren yağ emülsiyonlu 9 inaktif aşı ve olası yalancı reaksiyonları belirleyebilmek için ND virusu içermeyen 2 adet yağ emülsiyonlu inaktif aşı kullanılmıştır. Aşıların etkinliği *in-vivo* testler olan immunizasyon-seroloji ve immunizasyon-çalenç testleri ve *in-vitro* antijen ELISA prosedürü ile değerlendirilmiştir. İmmunizasyon-seroloji testinde, SPF civcivler immunize edilmiş ve immunizasyon sonrası gelişen antikor yanıt serolojik olarak HI testi ile değerlendirilmiştir. İmmunizasyon-çalenç testinde, immunizasyon sonrası SPF civcivler eprüve edilerek civcivlerin hayatta kalma oranları üzerinden aşılardan koruyucu doz ( $PD_{50}$ ) miktarları hesaplanmıştır. Antijen ELISA testinde ise, SPF civcivlere herhangi bir immunizasyon yapılmadan, doğrudan aşı içerisindeki HN antijen miktarı saptanarak aşılardan etkinliği değerlendirilmiştir.

##### 4.1. Hemaglutinasyon İnhibisyon Testi Bulguları

Newcastle hastalığı aşılardan kontrolünde kullanılan ve aşı dozunun 1/50'sinin uygulandığı civcivlere ait HI test sonuçlarına göre, 9 adet ND aşısından 5 tanesi  $2^4$  ve altında, 4 tanesi ise bu değerin üstünde antikor yanıtı oluşturmuştur. ND virus komponenti içermeyen 2 adet aşı, kontrol grubundaki civcivlerdeki gibi hiçbir yanıt oluşturmamıştır. Avrupa Farmakope'de inaktif ND aşılardan için tanımlanan potens gerekliliklerine göre, test edilen 9 adet ND aşısının 4'ünün yeterli, 5'inin ise yetersiz bir serolojik yanıt sergilediği görülmüştür. Aşılı ve kontrol grubuna ait hayvanların serum örneklerinde gerçekleştirilen HI test sonuçlarına ilişkin bir örnek Resim 4'de verilmiştir.



**Resim 4.** ND aşısına ait serum örneklerinde HI test sonuçları

#### **4.2. Immunizasyon-Çalenç Testi Bulguları**

Avrupa Farmakope'nin 0870 sayılı monografında inaktif ND aşılarının serolojik testlerle gerekli antikor titresi elde edilemediği takdirde koruyuculuğun belirlenmesi için immunizasyon-çalenç testleri yürütülerek etkinlik hakkında karar verilmesi istenmektedir. Her bir aşı için gerçekleştirilen HI test sonuçlarına göre ortalama  $2^{3,3}$ ,  $2^{3,4}$ ,  $2^{3,3}$ ,  $2^{3,5}$ ,  $2^{3,9}$  düzeyinde antikor yanıtı oluşturarak  $2^4$  altında kalan aşı serileri, immunizasyon-çalenç testi sonrası hayatta kalan civciv sayıları üzerinden değerlendirildiğinde, sırasıyla 56, 60, 70, 75 ve 71 PD<sub>50</sub> koruyuculuk düzeyi sergilemiştir. Geri kalan 4 aşı örneği HI testine alındığında ortalama  $2^{4,1}$ ,  $2^{4,8}$ ,  $2^{4,4}$ ,  $2^{6,1}$  düzeyinde antikor yanıtı oluşturmuş ve bu aşı serilerinde, sırasıyla 100, 108, 100, 136 PD<sub>50</sub> düzeyinde bir koruyuculuk belirlenmiştir. Gerçekleştirilen koruyucu doz çalışmalarında kontrol grubu olarak tutulan tüm aşısız civcivlerin 4. gün itibarı ile öldüğü görülmüştür. Bu sonuçlara göre test edilen tüm inaktif ND aşı serilerinin etkinlik kriteri olarak Avrupa Farmakope'de bildirilen 50PD<sub>50</sub> üzerinde koruyuculuğa sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışılan tüm aşılar a ait HI, PD<sub>50</sub> ve ELISA test sonuçları Tablo 3'te verilmiştir.

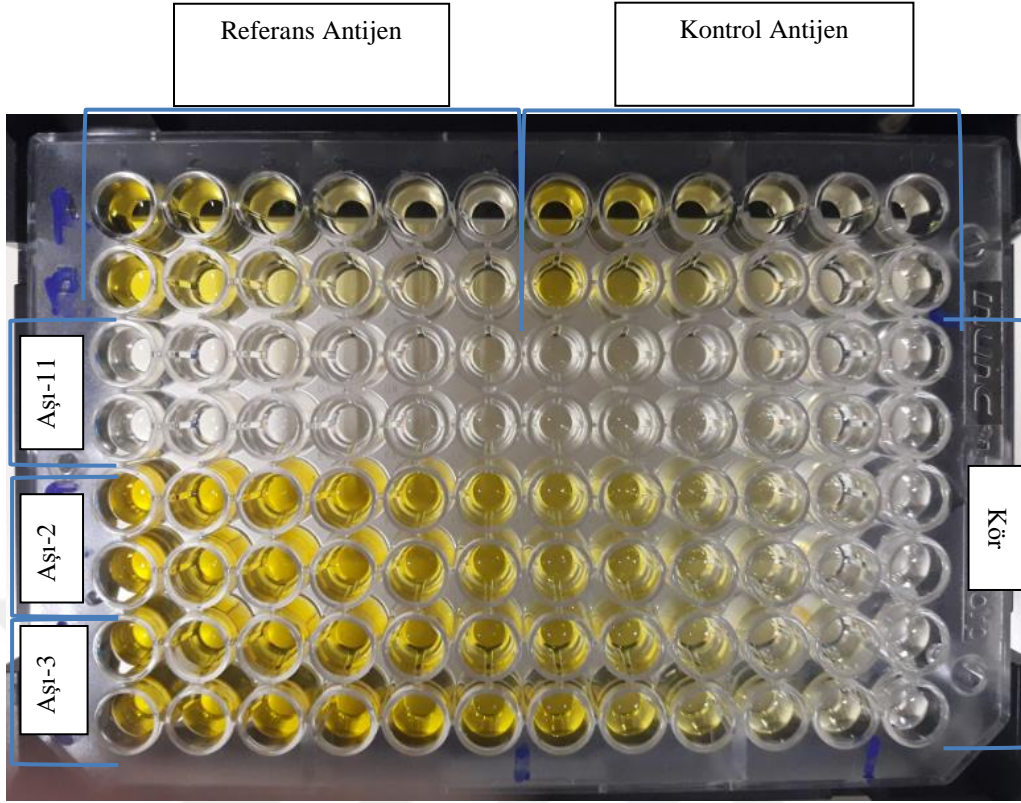


### 4.3. ELISA Bulguları

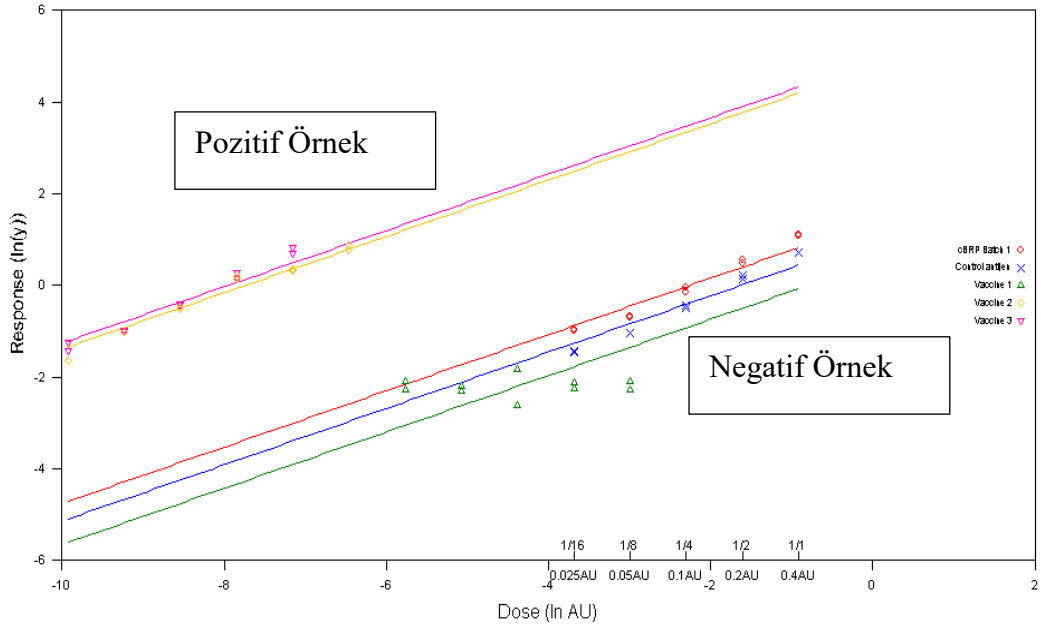
EDQM tarafından üretilmiş olan referans ve kontrol antijeni ile test edilen aşı örneklerinin birlikte çalışıldığı plakalardan alınan OD sonuçları üzerinden relatif potens hesaplanmıştır (Tablo 3). Her bir plakada referans antijen olan inaktif NDV Ulster 2C suşu ve referans kontrolü (pozitif kontrol) olarak çalışılan inaktif Lasota suşu ile test edilen aşı örnekleri birlikte çalışılmış olup, enzimatik reaksiyonun durdurulması ile oluşan renk değişimleri ELISA okuyucu ile değerlendirilmiştir (Resim 5). Referans ve kontrol antijenleri ile birlikte test edilen aşuların Combistats programında relatif potensi hesaplanmış, NDV komponenti içeren aşuların relatif potens değerleri 6,02 ile 98,23 AU/doz, NDV komponenti bulundurmeyen aşuların ise 0,19 ve 0,34 AU/doz olarak bulundu. Yeterli ve yetersiz potense sahip aşulara ait örnek bir sonuç Grafik 1’de gösterilmiştir. Örneklerin doz yanıt ilişkilerini gösteren noktaların paralellik ve linearite yönünden birbirleriyle uyumları önemli olup pozitif sonuçlarda bu durum sağlanırken negatif sonuçlarda sağlanamamaktadır.

**Tablo 3.** Aşılarla ait *in-vivo* ve ELISA etkinlik test sonuçları

	1/50 aşı dozu ile aşılanan hayvanların HI test sonuçları		İnaktif ND aşuların PD <sub>50</sub> /doz sonuçları		ELISA Sonuçları
	Aşılı	Kontrol	Sonuç	Kabul Limiti	AU/doz
<b>Aşı-1</b>	2 <sup>3,3</sup>	0	56	50	6,02
<b>Aşı-2</b>	2 <sup>3,4</sup>	0	60	50	8,93
<b>Aşı-3</b>	2 <sup>3,3</sup>	0	70	50	8,55
<b>Aşı-4</b>	2 <sup>3,5</sup>	0	75	50	10,33
<b>Aşı-5</b>	2 <sup>3,9</sup>	0	71	50	12,01
<b>Aşı-6</b>	2 <sup>4,1</sup>	0	100	50	36,91
<b>Aşı-7</b>	2 <sup>4,8</sup>	0	108	50	75,67
<b>Aşı-8</b>	2 <sup>4,4</sup>	0	100	50	36,75
<b>Aşı-9</b>	2 <sup>6,1</sup>	0	136	50	98,23
<b>Aşı-10</b>	0	0	-	-	0,19
<b>Aşı-11</b>	0	0	-	-	0,34



**Resim 5.** Referans ve aşı örneklerini gösteren bir ELISA testi



**Grafik 1.** Referans ve kontrol antijenle birlikte test edilen yeterli ve yetersiz AU'ya sahip aşı örneklerine ait grafik

#### 4.4. ELISA Testi Validasyon Bulguları

Çalışmada kullanılan 11 aşıdan (9 adet tekli veya kombine formdaki inaktif ND aşısı, 2 adet ND virus komponenti içermeyen yağ emülsiyonlu inaktif aşı) elde edilen gerçek pozitif ve negatif ile yanlış pozitif ve negatif sonuçlar Tablo 4’de verilmiştir.

**Tablo 4.** Gerçek ve yanlış cevaplar dağılımı

Gerçek Durum	Pozitif	Negatif	Toplam
<b>Pozitif</b>	GP (8)	YN (1)	GP+YN (9)
<b>Negatif</b>	YP (0)	GN (2)	YP+GN (2)
<b>Toplam</b>	GP+YP (8)	GN+YN (3)	

GP: Gerçek pozitif, YN: Yanlış negatif, YP: Yanlış pozitif, GN: Gerçek negatif

##### 4.4.1. Duyarlılık

Gerçek pozitif analiz sayısının, pozitif sonuçların toplamına oranı testin duyarlılığını ortaya koymaktadır. ND virusu içeren ve immunizasyon-çalenç testi ile yeterli bağışık yanıt sergilediği görülen 9 adet aşıdan biri ELISA testinde yetersiz görülmüş olup testin duyarlılığı %89 olarak belirlenmiştir.

##### 4.4.2. Özgüllük

Gerçek negatif analiz sayısının negatif sonuçların toplamına oranı spesifite/özgüllük olarak tanımlanır. ND virusu içermeyen ve doğal olarak, immunizasyon-seroloji testi ile hiçbir serolojik yanıt vermeyen aşı örneklerinde ELISA testinde bir pozitiflik tespit edilmemiş olup ELISA testinin spesifitesi %100 olarak belirlenmiştir.

#### 4.4.3. Efektiflik

Efektiflik; gerçek pozitif ve gerçek negatif sonuç sayısının toplam örnek sayısına oranını ifade eder. ELISA ile çalışılan örneklere ait relatif doğruluk oranı %91 olarak bulunmuştur.

#### 4.4.4. Tekrarlanabilirlik

Aynı ölçüm koşulları altında kısa bir zaman aralığında gerçekleştirilen, aynı test örneğinin birbirini izleyen ölçüm sonuçları arasındaki yakınlığın derecesi tekrarlanabilirliği ortaya koyar. ELISA testine alınan aşılardan içerisinden seçilen 6 farklı aşının aynı gün içerisinde çift örnekler olarak çalışılması sonucu oluşan OD değerleri arasında oluşan en yüksek varyasyon katsayısı (%CV) belirlenerek Tablo 5’de verilmiştir. Genel olarak %10 altında bir varyasyon katsayısı hesaplanmış olup 2 örnekte % 13,87 ve %14,25’lik bir varyasyon katsayısı hesaplanmıştır.

**Tablo 5.** ELISA testine alınan aşılardan OD değerleri arasındaki en yüksek varyasyon katsayıları (% CV)

%CV	Aşı-1	Aşı-2	Aşı-3	Aşı-4	Aşı-5	Aşı-6
<b>1.gün</b>	%4,51	%5,58	%4,89	%2,17	%3,67	%4,13
<b>2.gün</b>	%3,47	%4,72	%3,23	%4,43	%13,87	%5,41
<b>3.gün</b>	%4,62	%1,86	%4,31	%8,92	%9,62	%3,75
<b>4.gün</b>	%5,97	%5,35	%4,59	%5,37	%3,65	%1,96
<b>5.gün</b>	%2,68	%8,56	%5,56	%14,25	%6,06	%2,37
<b>6.gün</b>	%2,18	%3,91	%4,69	%5,26	%4,88	%3,21

#### 4.4.5. Tekrar Üretilirlik

Aynı test örneklerinde farklı ölçüm koşulları altında ve farklı zaman aralıklarında gerçekleştirilen, birbirini takip eden ölçüm sonuçları arasındaki yakınlığın derecesi tekrar üretilebilirlik olarak ifade edilir. Tekrar üretilebilirliğin belirlenmesi için 9 adet ND aşısı içerisinde seçilen 6 farklı ND aşısı farklı günlerde referans antijen ile birlikte değerlendirilerek relatif potens hesaplanmış olup, bu sonuçların ortalaması ve varyasyon katsayıları Tablo 6’da verilmiştir.

**Tablo 6.** ELISA testine alınan aşuların relatif potens değerleri arasındaki varyasyon katsayıları (% CV)

<b>Günler</b>	<b>RP-1</b>	<b>RP-2</b>	<b>RP-3</b>	<b>RP-4</b>	<b>RP-5</b>	<b>RP-6</b>
<b>1</b>	10	112,4	5,34	84,9	10,4	8,6
<b>2</b>	8,3	90,8	6,4	81,6	11,2	7,4
<b>3</b>	8,5	91,5	6,3	60,5	9,4	8,8
<b>4</b>	9,04	120	6,25	91	9,95	7,6
<b>5</b>	9,7	98,2	6,04	86,2	10,23	7,2
<b>6</b>	8,7	103	6,25	88	10,71	8,12
<b>Ortalama</b>	9,04	102,65	6,09	82,03	10,31	7,67
<b>% CV</b>	<b>7,5</b>	<b>11,3</b>	<b>6,2</b>	<b>13,4</b>	<b>6</b>	<b>8,1</b>

RP: relatif potens

## 5. Tartışma

Newcastle hastalığı, kanatlı hayvanlarda virulan APMV-1 suşu tarafından oluşan akut ve sistemik klinik seyir gösteren önemli bir viral enfeksiyondur (Alexander ve Gough, 2003). Hastalık evcil ve yabani birçok kuş türünde görülebilmekle beraber en duyarlı tür olarak tavuklar bildirilmiştir (Von Messling, 2017). Hastalığın morbidite ve mortalitesi kanatlı hayvanların türüne ve hastalığa sebep olan virusun virulansına göre değişkenlik gösterebilmektedir. Hastalık patogenezi üzerine yapılan çalışmalarla hastalığın sırasıyla lentojenik (düşük virulan), mezojenik (orta virulan) ve velojenik (yüksek virulan) formları tanımlanmış olup velojenik formdaki suşlar da afinite gösterdikleri dokular ve klinik tabloya göre viserotropik ve nörotropik olarak iki klinik formda görülebilmektedir (Alexander, 2000). Hastalığın tanımlandığı yıldan bugüne kadar ekonomik olarak önemli zarara yol açtığı 4 büyük pandemi bildirilmiştir (Miller ve Koch, 2013). Hastalığa sebep olan APMV-1 virusunun tek bir serotipe sahip olmasına rağmen çok fazla sayıda genotipik varyasyonunun olması, geniş bir coğrafi dağılım göstermesi, hastalık epidemiyolojisinde önemli bir yere sahip olan yabani kuşlarla taşınabilmesi ve geniş konakçı spektrumu nedeniyle yeni pandemilere yol açabilme tehlikesi bulunmaktadır. Dünyanın birçok ülkesinde endemik olarak görülen Newcastle hastalığı kanatlı hayvan yetiştiriciliği için her zaman bir tehdit olarak önemini korumaktadır. Kanatlı endüstrisi içerisinde sıkı biyogüvenlik önlemleri ve aşılama uygulamaları sayesinde birçok ülkede görülme oranı önemli derecede azalsa da Endonezya, Malezya, Kamboçya, Vietnam, Kamerun, Orta Afrika Cumhuriyetleri, Fildişi Sahilleri ve Nijerya gibi ülkelerde hala sıklıkla gözlenmektedir (Snoeck ve ark., 2013; Choi ve ark., 2014). Newcastle hastalığı OIE tarafından ihbari mecburi hastalıklar listesine alınmış ve ülkemizde de hastalıkla mücadele kapsamında ND'nin kontrol altına alınmasına ilişkin 92/66/EEC sayılı Avrupa Birliği Konsey Direktifi doğrultusunda "Yalancı Tavuk Vebası Hastalığına Karşı Korunma ve Mücadele Yönetmeliği" bulunmakta ve uygulanmaktadır. Hastalığın viral kaynaklı olması ve kanatlı hayvanlarda çok yüksek bir morbidite ve mortalite ile seyretmesi nedeniyle, aşılama, hastalıktan korunmada en akılcı yol olarak görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), AB tarafından bir takım hastalıkların yok edilmesi ve hayvancılık endüstrisinde viral enfeksiyonları azaltmak amacıyla, aşılamanın önemi vurgulanmaktadır (Hendriksen ve ark., 1998).

Bu kapsamda, ND'ye karşı 1940'lı yıllardan bu yana kullanılmakta olan canlı ve inaktif karakterde aşılar bulunmaktadır. Hayvan ve insanlarda kullanılan biyolojik ürünlerin beklenen kalitede olmasında, ana sorumluluk üretici firmalarda olmakla beraber, kontrolden sorumlu resmi otoriteler de, aşılarda güvenli ve etkin olmasını sağlamak için gerekli kontrol prosedürlerini oluşturmak ve uygulamaktan sorumludurlar. Üretimde tutarlılık yaklaşımı çerçevesinde üretilen her biyolojik ürün serisinin, orijinal suşundan başlayarak, ambalajlanmış son ürün haline gelinceye kadar geçirdiği tüm üretim süreçlerinde kontrol edilmesi gerekmektedir (Finn, 2011; Hill, 2011). Bu kontroller için uygulanan testler; aşı tiplerine göre değişkenlik gösterebilmekle beraber sterilite, güvenlik ve etkinlik testleri olarak sınıflandırılabilir. Etkinlik testleri; canlı bakteriyel aşılarda, "colony forming unit"(CFU) testleri şeklindeken; canlı viral aşılarda, primer ya da devamlı hücre kültürü hatları ile embriyolu tavuk yumurtalarında yürütülen titrasyon testleri, sitopataloji veya virus nötralizasyon testleriyle gerçekleştirilmektedir (Draayer, 2011; Kumar ve ark., 2018). İnaktif aşılarda potens değerlendirilmesinde yaygın olarak immunizasyon-seroloji veya çalenç testleri kullanılmaktadır. İmmunizasyon-çalenç testlerinde, çok sayıda hayvan kullanılması, hayvanlarda acı ve ölümlere neden olması ve test sürelerinin çok uzun sürmesi, önemli dezavantajlardandır (Draayer ve ark., 2011). Geleneksel yaklaşımda aşı kontrol çalışmalarında laboratuvar/deney hayvanları veya hedef hayvanlar, potens testlerinde kullanılmaktadır (Hendriksen, 2009). Gerçekleştirilen potens testlerinin %37'si *in-vitro* titrasyon testleri, %22'si *in-vitro* ELISA testleri, % 12 diğer *in-vitro* testler, %8'i *in-vivo* seroloji ve %21'i *in-vivo* çalenç testlerinden oluşmaktadır (Draayer ve ark., 2011). Bu oranlardan anlaşılacağı üzere veteriner aşılarda hala önemli bir kısmının *in-vivo* etkinlik testleriyle değerlendirildiği görülmektedir. Aşıların, insan ve hayvan sağlığı üzerinde gittikçe artan önemi ve buna paralel olarak artan aşı üretimi ile beraber yürütülen kontrol testlerinin de hızlı ve etkin bir şekilde gerçekleştirilmesi zorunluluk haline gelmiştir. Bu amaçla klasik hayvan testlerine alternatif yöntemlerin geliştirilmesi ve uygulanmasına öncelik verilmiştir. Bu kapsamda 3R konsepti olarak bilinen yaklaşım ile hayvan modellerinin yerine *in-vitro* alternatif metotlar, kuduz, pastorelloz, leptospiroz, şap, klostridial ve Newcastle aşılarda kullanılmaya başlanmıştır (Wood, 1991; Stokes ve ark, 2011b; Salama ve ark, 2014; Sigoillot-Claude ve ark, 2015; Chabaud-Riou ve ark, 2017).



Günümüzde Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) ruhsatlanmış ND aşılarda potans belirlemede; aşının önerilen doz miktarı ile 10 adet SPF civcivin immunize edilmesi ve 14-21 gün sonra immunize edilen hayvanlara uygun epruvasyon kültürleri uygulanması, ardından hayvanların günlük olarak gözlenmesi, hayatta kalma oranlarının değerlendirilmesi ve %90 ve üzeri koruyuculuk görülmesi halinde aşının etkin olduğu kararına varılması ile ilgili *in-vivo* bir test tanımlanmıştır (USDA APHIS, 2018a). Avrupa'da ruhsat almış ND aşılarda ise, Avrupa Farmakope gereklilikleri dikkate alınmakta olup ND aşılarda en az 10 adet SPF civcivin immunizasyonu ve immunizasyon sonrası serolojik yanıtın değerlendirildiği HI testi ve koruyucu dozun ( $PD_{50}$ ) belirlendiği epruvasyon uygulamaları ile hiçbir SPF civciv aşılanmaksızın doğrudan aşı içerisindeki antijen miktarını belirlemeye yönelik alternatif ELISA testinin kullanılabilmesi bildirilmiştir (European Pharmacopoeia, 2017a).

Bu çalışmada Avrupa Farmakope'de önerilen immunizasyon-seroloji protokolü uygulanarak 9 ND aşısından 5'i  $2^4$  ve altında serolojik yanıt vermiştir. Söz konusu bu aşılar koruyucu dozun belirlenmesi için immunizasyon-çalenç testine tabi tutulduğunda hepsinin 50  $PD_{50}$  üzerinde bir değer sergilediği görülmüştür. Benzer şekilde, aşılamaya bağlı serolojik yanıtın değerlendirildiği bir çok çalışma bulunmaktadır. 25 farklı ticari ND aşısının immunizasyon-çalenç ve immunizasyon-seroloji testlerine alındığı bir çalışmada, yeterli koruyuculuğa sahip oldukları belirlenen 21 aşının 20'sinin ortalama HI test sonuçlarının  $>2^{3,81}$  den büyük olduğu, 4 aşının ise  $2^3$  ve altında sonuç verdiği ve bu aşılarda  $PD_{50}$  sonuçlarının da yetersiz olduğu bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada koruyucu dozu belirlemek için aşı dozunun 1/25, 1/50 ve 1/100'ünü uyguladıkları gruplarda doz miktarına uyumlu bir şekilde  $2^{4,39}$ ,  $2^{3,53}$  ve  $2^{2,83}$  azalan bir HI yanıtı alındığı,  $PD_{50}$  testi ile HI testi arasında büyük bir korelasyon ( $r^2 = 0,988$ ) olduğu ve HI testinin inaktif ND aşılarının potans testinde  $PD_{50}$  testi yerine kullanılabilmesi bildirilmiştir (Goddard ve ark., 1988). Monovalan veya polivalan karakterdeki 27 farklı ticari inaktif ND aşısında bir aşı dozunun 1/50'si verilerek HI testi ile potans değerlendirilmiş ve ND aşılarının HI test sonuçlarının  $2^{2,2}$  ile  $2^{8,1}$  arasında değiştiği gözlenmiştir. Araştırmacılar, düşük HI yanıtı aldıkları aşı serilerinde koruyuculuk düzeylerini ortaya koyacak çalenç testlerini uygulamamışlar ancak, aşılarında kullanılan adjuvanların, çevresel ve bireysel faktörlerin etkisinin olabileceğinin dikkate alınması gerektiğini

belirtmişlerdir (Zekic-Stozic ve ark., 2014). İnaktif ND aşılarında HAU düzeyi ile potensin sağlanması için gerekli minimum koruyucu doz miktarı ve serolojik yanıt düzeyinin araştırıldığı bir çalışmada, içerisinde 5 ile 2000 aralığında değişebilen HAU'ya sahip Hitchner B1 antijeni bulunduran inaktif aşı serileri kullanılmıştır. Aşıların sahip oldukları HAU'ya karşı oluşan serolojik yanıt düzeyi HI ve ELISA testleri kullanılarak araştırılmıştır. Araştırmacılar, çalışmada çalenç öncesi 500, 750, 1000, 2000 HAU'ya sahip gruplarda sırasıyla  $\log_2$  4.1, 3.2, 5, 7.2 düzeyinde serolojik yanıt görüldüğünü ve çalenç uygulamasından sonra  $2^5$  ve üzerinde yanıt aldıkları ve 1000-2000 HAU'ya sahip grupların %100 korunduğunu bildirmişlerdir (Liljebjelke ve ark., 2008). Lentojenik suş içeren canlı ND aşıları ile 3 haftalık SPF civcivlerin aşılınması sonrası  $2^3$  ile  $2^4$  arasında bir HI tepkisi oluştuğu, inaktif ND aşısıyla tek bir aşılama sonrası ise  $2^6$  ile  $2^8$  arasında bir yanıt alınabildiği ifade edilmiştir (Miller ve Koch, 2013). Herts 33/56 eprüvasyon suşu kullanılarak HI değerleri ve koruyuculuk arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada,  $2^2$  altında serolojik yanıt alınan tüm hayvanların öldüğü;  $2^2$ - $2^5$  arasında ve ortalama  $2^{3.75}$  serolojik yanıt alınan hayvanlarda %10 oranında bir ölüm görüldüğü;  $2^4$ - $2^6$  arasında ve ortalama  $2^{5.2}$  düzeyinde serolojik yanıt alınan hayvanların ise hepsinin korunduğu bildirilmiştir (Allan ve ark., 1978). Gerçekleştirilen bu testler göstermektedir ki İnaktif Newcastle aşılarında potensin belirlenmesinde immunizasyon-seroloji test sonuçları açısından değişken sonuçlar alınabilmekte, test sonuçları genel olarak çalenç testleriyle uyumlu sonuçlar vermekte ve onlara alternatif olarak kullanılabilirler. Yukarıda bildirilen çalışmalarda araştırmacıların HI testlerinde Avrupa Farmakope gerekliliğini karşılamayan sonuçlar aldıkları ve bu serolojik yanıtların da belirli bir koruyuculuğa sahip olduğu anlaşılmaktadır. Goddard ve ark. (Goddard ve ark., 1988) ile Allan ve ark.'nın (Allan ve ark., 1978) yaptıkları çalışmalarda, koruyuculuğun gerçekleşmediği serolojik yanıtın  $2^2$  altındaki değerlerde olduğu dikkati çekmektedir. Bizim çalışmamızda HI titre sonuçlarını değerlendirdiğimizde hiçbir aşının  $2^3$  altında bir yanıt vermediği, bir grup aşının Avrupa Farmakope'nin belirlediği sınır değer olan  $2^4$  değerinin altında sonuç verdiği ve bu aşılarda 50 PD<sub>50</sub> üzerinde koruyuculuk sağladığı belirlenmiştir. Zira Avrupa Farmakope'nin 0870 sayılı monografında inaktif ND aşılarının serolojik testlerle gerekli antikor titresi elde edilemediği takdirde koruyuculuğun belirlenmesi için immunizasyon-çalenç testleri yürütülerek etkinlik hakkında karar verilmesi

istenmektedir. Çalışmamızda elde edilen  $2^3$  ile  $2^4$  arası HI titresi veren aşılarda, her ne kadar 50 PD<sub>50</sub> olan Farmakope kabul kriterlerini karşılarsa da belirlenen  $2^4$  altı değerlerin aşı uygulama güçlüğünden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Çünkü uygulama dozlarını manipülatif hataya neden olabilecek 1/50 oranı gibi çok düşük aşı dozları oluşturmuştur. Çalışmamızda HI düzeyleri ile PD<sub>50</sub> değerleri birbiri ile karşılaştırıldığında ( $r^2=0,95$ ) anlamlı bir korelasyon görülmüş sonuçlar istatistiksel açıdan ( $p=0,000$ ) anlamlı bulunmuştur.

İnaktif ND aşılarda potansi belirlemeye yönelik eprüvasyon uygulamaları, aşı içerisindeki tüm bileşenlerin (adjuvanlar, emülsifiye edici ajanlar) immun sisteme olan etkilerini net bir şekilde ortaya koymasına rağmen, testin başlamasından sonlandırılmasına kadar geçen süreler 2 aya yakın sürmekte, her bir aşı için en az 70 SPF civiv kullanılmakta ve test sonuçlarının değerlendirilmesi, hayvanlardaki sağ kalım düzeyleri ve hastalık semptomlarının gözlenmesine dayanmaktadır. Günümüzde endüstriyel üretim ve ürün çeşitliliğindeki büyümeye paralel bir şekilde, kontrol süreçlerinin kısaltılmasına yönelik yaklaşımlar sonucunda *in-vivo* temelli test yöntemlerine alternatif serolojik tabanlı ve hücre kültürleri kullanımına dayalı *in-vitro* metot geliştirme çalışmaları hız kazanmıştır. Alternatif metotların geliştirilmesi noktasında başta EDQM olmak üzere çeşitli uluslararası kuruluşların desteklediği çalışmalar yürütülmüş ve yasal çerçeveyi düzenleyen değişiklikler yapılmıştır (EDQM, 2008). Kullanılmakta olan alternatif metotlar, immunize edilmiş hayvanların serum örneklerinde yürütülen ELISA prosedürleri, hücre kültür ortamlarında yürütülen serolojik tabanlı çalışmalar ve doğrudan aşı içerisindeki antijen miktarının ölçülmesine yönelik immunokimyasal çalışmalar şeklindedir (Halder, 2001). Avrupa Farmakope biyolojik ürünlerin potens testlerinde uygun bir immunokimyasal veya hücre kültürü metodunun kullanılabilmesini belirtmektedir (European Pharmacopoeia, 2017a). Immunokimyasal yöntemler, hayvan kullanımını azaltma ya da tamamen ortadan kaldırma, kolay uygulanabilme ve test sürelerini kısaltma gibi birçok avantaja sahiptirler (EDQM, 2008).

Çalışmamızın *in-vitro* bölümünü oluşturan çift antikor sandviç ELISA testi, SPF civivlerde immunizasyon ve çalenç uygulamalarına gereksinim olmaksızın, doğrudan aşı içerisindeki HN antijeninin spesifik monoklonal antikorla birleşmesi ve oluşan antijen antikor kompleksinin, antijen miktarı bilinen referans bir örnekle

kıyaslanması sonrası relatif potensin ölçülmesine dayanmaktadır. Referans ürün olarak, benzer aşı serileri, virus veya bakteri alt ünitelerini içeren ürünler ile saf mikroorganizma kültürlerinin kullanılabilmesi bildirilmiştir (Karlı ve Rippke, 2015). ELISA testine aldığımız ND aşılarının, referans ve kontrol antijenlerinden elde edilen OD değerleri üzerinden, Combistats software 5.0 programı kullanılarak paralel doğru analiz metoduyla RP değerleri 6,02 AU/doz ile 98,23 AU/doz arasında belirlenmiştir. İnaktif ND aşılarının potensinin belirlenmesinde ELISA metodunun kullanılabilmesi için aşılarda bulunması gereken minimum antijen miktarının 7 AU/doz olarak bildirildiği çalışma (Claassen ve ark., 2004) dikkate alındığında, bir örnek hariç tüm ND aşılarının yeterli antijen miktarına sahip olduğu görülmüştür. Çalışmamızda 9 adet ND aşısının 8'i 7 AU üzerinde görülmüş sadece bir aşının 6 AU değeriyle limite çok yakın olsa da limit altında kaldığı ve bu aşı örneğinin yeterli PD<sub>50</sub> sonucuna sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda ELISA testi ile immunizasyon-çalenç testi arasında (p=0,000) anlamlı bir korelasyon (r<sup>2</sup>=0,93) bulunmuştur. Bir aşımızda meydana gelen 6 AU olarak bulunan görece yetersiz relatif potens değerinin, kullanılan inaktivasyon ajanı (formaldehit) kaynaklı olabileceği veya ekstraksiyon işlemleri sırasında yağ fazının su fazından tam olarak ayrılamamasıyla ilişkili olarak antijen miktarı yeterli düzeyde olsa da yağ fazı ile maskelenmesine bağlı olabileceği düşünülmüştür. İnaktivasyon ajanı (formaldehit) konusunda çalışmamızı destekleyen bir araştırmada, formaldehit kullanılan aşılarda β propiolaktona göre daha az miktarda antijen saptandığı ve bu durumun inaktivasyon ajanının etki mekanizmasından kaynaklandığı vurgulanmıştır. Formaldehitin bakteri ya da virus proteinleri üzerine etkisi bulunurken, β propiolakton'un doğrudan nükleik asit üzerinde etkisinin olduğu, formaldehitin, hemagglütinin epitoplarında konformasyonel bir değişime sebep olabileceği ifade edilmiştir (Jagt ve ark., 2010). Ekstraksiyon işlemleri sırasında yağ fazının su fazından tam olarak ayrılamamasına veya antijen miktarı yeterli düzeyde olsa da yağ fazı ile maskelenmesine bağlı olabileceği düşünülen bir çalışmada, 27 farklı inaktif ND aşısında potens belirlenmesi için isopropilmiristat ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş, antijen miktarı HA testi ve ticari ELISA test kiti ile değerlendirilmiştir. Testlerdeki yetersiz antijen düzeylerinin, farklı aşı formülasyonlarına isopropilmiristatın aynı düzeyde etki edememesine bağlı olabileceği bildirilmiştir (Aly ve ark., 2018).

İnaktif ND aşılarının *in-vitro* potens testlerine olan uyumlarının araştırıldığı bir çalışmada, 4 farklı firma tarafından üretilen 8 farklı ND aşısının sahip olduğu HN ve F antijen miktarları ile aşılar karşı oluşan serolojik yanıt HI testi ile değerlendirilmiş ve HI yanıtı ile HN antijeni arasında pozitif yönde bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Maas ve ark., 2000a). 20 farklı ND aşısı Avrupa Farmakope’de bildirilen serolojik test yöntemiyle ve Hayvan Hastalıkları Merkez Enstitüsü (CIDC) tarafından geliştirilen ELISA testi ile karşılaştırılmış ve her iki metot arasında yüksek bir korelasyon ( $r^2=0,86$ ) olduğu görülmüştür (Maas ve ark., 2000b). Biyolojik ürünlerin resmi kontrol laboratuvarı olarak görev yapan 3 farklı laboratuvar tarafından 6 inaktif ND aşısı, Avrupa Farmakope’nin 0870 sayılı monografında bildirilen *in-vivo* uygulamalar olan immunizasyon-seroloji ve immunizasyon-çalenç testleri ve alternatif olarak geliştirilmiş olan *in-vitro* ELISA testi ile etkinlik yönünden değerlendirilmiş ve 3 laboratuvarın aşı örneklerini 3 tekrarlı olarak çalışmış olduğu sonuçların kendi içerisinde tutarlı bulunduğu *in-vivo* ve *in-vitro* test sonuçlarının istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bildirilmiştir (Claassen ve ark., 2003). Test edilen 5 aşının farklı firmaların ticari aşıları olduğu, bir aşının ise *in-vivo* olarak yetersiz potense sahip olan bir ürün olduğu ve her bir laboratuvarın yapmış olduğu *in-vitro* test sonuçlarına göre yetersiz potense sahip bu ürünün çok düşük düzeyde antijen içerdiği ortaya konulmuş olup testin spesifikliğı ortaya konulmuştur. Bizim çalışmamızda da içerisinde ND komponenti bulunmayan bir bakteriyel ve bir viral aşığı ELISA testine aldığımızda tespit sınırı olarak bildirilen 7AU/doz değerinden çok daha düşük düzeyde (0,19 AU/doz ve 0,34 AU/doz) RP bulunmuş olup bu sonuçlarla testin spesifikliğı doğrulanmıştır. Claassen ve ark. (2003) gerçekleştirdiğı çalışmada 6 farklı aşı kendi içerisinde yetersiz, düşük ve yüksek antijen içerecek şekilde gruplanabilmiş, yüksek antijen miktarına sahip aşıların PD<sub>50</sub> sonuçlarının da maksimum düzeyde olduğu ve farklı ND suşları içeren aşıların aynı MoAb tarafından tanınıyor olmasının en önemli çıktığı olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da Lasota, Ulster ve Clone 30 gibi farklı suşlar içeren aşılar çalışılmış olup bir aşı örneğı hariç tüm aşı serilerinin yeterli RP yanıtı oluşturduğu ve yüksek RP’ye sahip aşıların PD<sub>50</sub> ve HI sonuçlarının da yüksek olduğu görülmüştür. ND aşıları için gerçekleştirilen validasyon çalışmasında 8 kontrol laboratuvarı ve 6 farklı üretici firmanın katılımıyla 9 farklı aşı örneğı üzerinde 3 tekrarlı olarak ELISA testleri gerçekleştirilmiştir. Çalışılan aşı örnekleri içerisinde bir adet yetersiz potense sahip aşı

ve bir adet NDV komponenti içermeyen kanatlı aşısı dahil edilmiştir. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi sonucunda antijen miktarının yüksek bir kesinlik ile belirlenebildiği, çalışılan aşı örneklerinin antijen miktarları açısından birbirleri ile uyumlu sonuçlar verdiği, metodun tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliğinin yeterli olduğu bildirilmiştir (Claassen ve ark., 2004). Yeterli ve yetersiz potense sahip aşı serilerini birbirinden ayırmada kullanılacak olan eşik antijen seviyesinin 7 AU/doz olarak belirlendiği, hesaplanan bu antijen seviyesinin laboratuvarlar tarafından gerçekleştirilen *in-vitro* ölçümlerde herhangi bir yanlış pozitif sonuca neden olmadığı ve sınırlı sayıda yanlış negatif sonuç alındığı ifade edilmiştir. Araştırmacılar gerçekleştirdikleri bu validasyon çalışması ile PD<sub>50</sub> yüksek olan aşuların sahip oldukları antijen ünitesi (AU) değerlerinin de yüksek olduğunu ortaya koymuşlar ve antijen miktarını ölçmeye yönelik alternatif metodun Avrupa Farmakope'sine girebileceğini bildirmişlerdir (Claassen ve ark., 2004). Validasyon çalışmasını destekleyen bir şekilde bizim çalışmamızda da ELISA testi sonucunda sınırlı sayıda (sadece bir örnekte) yanlış negatif sonuç alınmış, yanlış pozitif sonuç oluşmamış, spesifite, sensitivite ve relatif doğruluk oranlarının yüksek olduğu görülmüştür. Validasyon çalışması ile uyumlu bir şekilde koruyucu dozu (PD<sub>50</sub>) yüksek olan aşuların sahip oldukları antijen ünitesi (AU) değerlerinin yüksek olduğu ortaya konulmuştur.

Alternatif metotların uygulamaya aktarılmadan önce geçerliliğinin ortaya konulması gereklidir. Avrupa Farmakope'de bildirilen validasyon kriterleri; varlığı ortaya konulmak istenilen antijen veya antikorun referans ve test örnekleri arasında ciddi bir farklılık oluşturmaması, matriksten etkilenmemesi, tespit limitinin kabul kriteri altında olması, analiz kesinliğinin beklenen limitler içerisinde olması, sistematik hataya neden olmaksızın uygulanabilmesi olarak tanımlanmaktadır (European Pharmacopoeia, 2017a). Bu gereklilikleri sağlamak için test edilen örneklerin en az 3 tekrarlı olarak çalışılması, analiz edilen test örneklerinin referans örnekle aynı formda olması ve sonuçların uygun istatistiksel yöntemler ile değerlendirilmesi gerektiği bildirilmektedir (European Pharmacopoeia, 2017a). Veteriner Biyolojikleri Merkezi ("Center for Veterinary Biologics"-CVB)'nin *in-vitro* potens testleri ile ilgili kılavuzunda; ELISA testleri için sensitivite, spesifite, kesinlik (plaka içi, plakalar arası, ölçümler arası vb), tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik verilerinin, metot verifikasyonu ve validasyonu için yapılması önerilmektedir

(USDA APHIS, 2014). EDQM tarafından, üretilen biyolojik referans olan kontrol antijeninin, ELISA testini kullanacak her bir laboratuvar tarafından uygunluğunun belirlenmesi ve tekrarlı çalışmalarla elde edilen değerlerin metod validasyonu sırasında belirlenen değerden %70 ile %140 daha büyük olmaması gerektiği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda kontrol antijeninin ortalama değeri 3,2 AU/şişe olarak saptanmış, alarm limiti olarak 2,24 AU ile 4,48 AU belirlenmiştir. Kontrol antijene yönelik 18 sonuç değerlendirildiğinde en düşük 2,31 AU ve en yüksek 4,13 AU değerleri alınmış olup alarm limiti dışı bir değerle karşılaşılmamıştır. ND aşılı için bildirilen validasyon çalışmasında çalışılan örnekler için tahmini potens değerinden %80 ile %125'lik oranda bir varyans belirlenirse sonuçların istatistiksel olarak geçerli olacağı bildirilmektedir (Claassen ve ark. 2004). Çalışmamızda tekrarlı olarak gerçekleştirilen testlerde dahil varyansın bu limitler içerisinde seyrettiği görülmüştür. Bir popülasyon içerisindeki değerlerin değişkenlik düzeyi varyasyon katsayısı (%CV) ile değerlendirilmekte olup tekrarlı çalışmalar arasında varyasyon katsayısının (%CV) küçülmesi elde edilen verilerin kesin ve tekrarlanabilir olduğunu göstermekte ve testin stabilitesini ortaya koymaktadır. İmmunokimyasal testlerde kesinliği belirlemek için analiz içi ve analizler arası varyasyon kullanılabilir (Crowther, 2009). Analiz içi varyasyon, ölçüm değerleri arasındaki değişkenliğin ifadesi olup, tekrarlanabilirliği ortaya koyarken; analizler arası varyasyon, aynı örneğin farklı zamanlarda çalışılması ile elde edilen sonuçları arasındaki varyasyondur ve tekrar üretilebilirliğini ortaya koyar. ELISA çalışmalarında analiz içi varyasyonun %10'u, analizler arası varyasyonun %15'i geçmemesi istenmektedir. (Crowther, 2009; Arslan ve ark, 2016). Laboratuvarımızda ELISA test metodunun validasyonunu belirlemek için; 11 farklı aşı örneği içerisinde belirlenen 6 aşı, referans antijen ile birlikte, farklı zamanlarda tekrarlı olarak çalışılmıştır. Tekrarlanabilirlik çalışması içerisinde değerlendirilen analiz içi varyasyonun iki aşı örneğindeki görülen %13,87 ve %14,25'lik varyasyon katsayıları hariç %10'un altında olduğu görülmüştür. Analiz içi varyasyonun %10 üzeri değerler almasında, plaka kuyucuklarındaki kurumaların, pipetleme hatalarının ve kuyucuklar arasında oluşan sıçramaların rol alabileceği düşünülmüştür. Tekrar üretilebilirlik verisi olarak değerlendirilen farklı günlerde çalışılan aşı örneklerinin relatif potens değerleri arasındaki varyasyon katsayıları, tüm çalışmalarda %15'den küçük olarak bulunmuştur.

## 6. Sonuç ve Öneriler

Araştırmamızda inaktif ND aşularının potens testinde *in-vivo* immunizasyon-seroloji ve immunizasyon-çalenç testleri yerine, aşının içerdiği HN antijen miktarının ölçülmesine dayanan sandviç ELISA metodunun uygulanabilirliği araştırılmıştır. *In-vivo* yöntemler olan immunizasyon-serolji ve immunizasyon-çalenç testleri ile alternatif ELISA metodunun arasında yüksek korelasyon olduğu, genel olarak ELISA testinin tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik değerleri açısından kabul edilebilir sınırlar içinde seyrettiği yüksek bir spesifite ve sensitiviteye sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre ELISA metodunun aynı örnekler üzerinde benzer sonuçlar verebilme yeteneği, standart prosedüre olan uyumu ve laboratuvar şartlarında uygulanabilirliği ortaya konulmuştur. Sonuç olarak 3R yaklaşımı çerçevesinde hayvan kullanımı gerektirmeksizin uygulanabilecek olan alternatif ELISA metodu ile günlerle ifade edilebilen kısa sürelerde güvenli test sonuçları alınabileceği görülmüştür.



## 7. Kaynaklar

- Alexander, D. J. (2000). Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus Infections. *Rev Sci Tech off Int Epiz*, 19(2), (s.443–462). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0297-8.00402-X>
- Alexander, D. J. ve Gough, R. E. (2003). Newcastle Disease and Other Avian Paramyxovirus Infections. In: Saif, Y. M., Barnes, H. J., Glisson, J. R., Fadly, A. M., McDougal, L. R. ve Swayne D. E. (Ed.), *Disease of Poultry* (11. Baskı), (s. 63–87). Iowa State: University Press.
- Allan, W. H., Lancaster, J. E. ve Toth, B. (1978). *Newcastle Disease Vaccines: Their Production and Use*. Rome: FAO.
- Aly, S. E., Hussein, H. A., Abdel-baky, M. H. ve El-sanousi, A. A. (2018). Assessment of *in vitro* potency of inactivated Newcastle disease oil adjuvanted vaccines using hemagglutination test and blocking ELISA. *Veterinary World*, 11(9), (s.1222–1228). <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1222-1228>
- Arslan, A., Dilik, Z., Özyer, M., Oktay, N. ve Yılmaz, Ş. (2016). Klostridial Aşıların Potensinin Belirlenmesinde Toksin Nötralizasyon Testlerine Alternatif Olarak Elisa'nın Kullanımı TAGEM/ HSGYAD, 13/ A07 /P02 / 32, Araştırma - Geliştirme Destekleri Proje Sonuç Raporu, (s.1-36).
- Bastola, R., Noh, G., Keum, T., Bashyal, S., Seo, J. E., Choi, J., Lee, S. (2017). Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Archives of Pharmacal Research*, 40(11), 1238–1248. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0969-z>
- Bello, M. B., Yusoff, K., Ideris, A., Hair-bejo, M., Peeters, B. P. H. ve Omar, A. R. (2018). Diagnostic and Vaccination Approaches for Newcastle Disease Virus in Poultry: The Current and Emerging Perspectives. *BioMed Research International*, (s.1-18). <https://doi.org/10.1155/2018/7278459>
- Brown, C., King, D. J. ve Seal, B. S. (1999). Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence. *Veterinary Pathology*, 36(2), (s.125–132). <https://doi.org/10.1354/vp.36-2-125>

- Butt, S. L., Taylor, T. L., Volkening, J. D., Dimitrov, K. M., Williams-Coplin, D., Lahmers, K. K., Stanton, J. B. (2018). Rapid virulence prediction and identification of Newcastle disease virus genotypes using third-generation sequencing. *Virology Journal*, 15(1), 179. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1077-5>
- Carlı, K. T. (2018). *Kanatlı Hayvanların Enfeksiyon Hastalıkları*. Ankara: Ankara Nobel Tıp Kitapevleri.
- Cattoli, G., Susta, L., Terregino, C. ve Brown, C. (2011). Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(4), (s.637–656).
- Choi, K. S., Kye, S. J., Kim, J. Y., To, T. L., Nguyen, D. T., Lee, Y. J., ... Lee, H. S. (2014). Molecular epidemiology of Newcastle disease viruses in Vietnam. *Trop. Anim. Health Prod.* 46, (s.271–277).
- Chabaud-Riou, M., Moreno, N., Guinchart, F., Nicolai, M. C., Niogret-Siohan, E., Seve, N., ... Riou, P. (2017). G-Protein Based Elisa As A Potency Test For Rabies Vaccines. *Biologicals*, 46, (s.124-129).
- Claassen, I. (2011). Case study of development, validation, and acceptance of a non-animal method for assessing veterinary vaccine potency. *Procedia in Vaccinology*, 5, (s.175-183).
- Claassen, I., Maas, R., Daas, A. ve Milne, C. (2003). Feasibility Study to Evaluate the Correlation Between Results of a Candidate *In Vitro* Assay and Established *In Vivo* Assays For Potency Determination of Newcastle Disease Vaccines. *Pharmaeuro-Bio*(2003-1), (s.53–66).
- Claassen, I., Maas, R., Oei, H., Daas, A. ve Milne, C. (2004). Validation Study to Evaluate the Reproducibility of a Candidate *In vitro* Potency Assay of Newcastle Diseases Vaccines and to Establish the Suitability of a Candidate Biological Reference Preparation. *Pharmeuropa-Bio*(2004–1), (s.1-15).
- Crowthwer, J. R. (2009). *The ELISA Guidebook*, (2. Baskı), New York: Humana Press.

- Czegledi, A., Ujvari, D., Somogyi, E. Wehmann, E., Werner, O. ve Lomniczi, B. (2006). Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Research*, 120, (s. 36–48).
- Dimitrov, K. M., Afonso, C. L., Yu, Q. ve Miller, P. J. (2017). Newcastle disease vaccines—A solved problem or a continuous challenge? *Veterinary Microbiology*, 206, (s.126–136). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.019>
- Dinse, G. E., Umbach, D. M. (2011). Quantifying Relative Potency in Dose-Response Studies. In: Lee, M. L. T., Pfeiffer M., Cai T., Gail, M., Satten, G., Gandy A. (Ed.) *Risk Assessment and Evaluation of Predictions*. (s.315-331). New York: Springer.
- Draayer, H. (2011). Overview of currently approved veterinary vaccine potency testing methods and methods in development that do not require animal use. *Procedia in Vaccinology*, 5, (s.171-174).
- Draayer, H., Kulpa-Eddy, J., Jones, B., Claassen, I., Stokes, W. S., Woodland, R., Halder, M. (2011). Non-animal replacement methods for veterinary vaccine potency testing: state of the science and future directions. *Procedia in Vaccinology*, 5, (s.60–83). <https://doi.org/10.1016/j.provac.2011.10.005>
- Duygu D. Y. ve Udoh A.U. (2017). Validation of Microbiological Testing Methods. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 18(1), (s.65-69).
- EDQM (The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare). (2008). *Alternatives to Animal Testing: New Approaches in the Development and Control of Biologicals*, Proceedings of the International Symposium, Croatia, Dubrovnik.
- European Pharmacopoeia. (2017a). Immunochemical methods. Monograph (2.7.1), (9. Baskı), (s.239-240), Council of Europe, Strasbourg (France),
- European Pharmacopoeia. (2017b). Newcastle Disease Vaccine (Inactivated). Monograph (0870), (9. Baskı), (s. 1080-1082), Council of Europe, Strasbourg (France).

- European Pharmacopoeia. (2017c). Substitution of In Vivo Method(s) By *In Vitro* Method(s) For The Quality Control of Vaccines. Monograph (50214), (9. Baskı), (s. 4737-4738), Council of Europe, Strasbourg (France).
- Finn, T. (2011). U.S. FDA requirements for human vaccine safety and potency testing. *Procedia Vaccinology*, 5, (s.137-140).
- Gallili, G. E. ve Ben-Nathan, D. (1998). Newcastle disease vaccines. *Biotechnology advances*, 16(2), (s.343-366).
- Goddard, R. D., Nicholas, R. A. J. ve Luff, P. R. (1988). Serology-based potency test for inactivated Newcastle disease vaccines. *Vaccine*, 6(6), (s.530–532). [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(88\)90106-5](https://doi.org/10.1016/0264-410X(88)90106-5)
- Halder, M. (2001). Three Rs Potential in the Development and Quality Control of Immunobiologicals. *Altex*, 18(1), (s.13-46).
- Hendriksen, C. F. M. (2009). Replacement reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert Review of Vaccines*, 8(3), (s.1-10).
- Hendriksen, C. F. M., Spieser, J. M., Akkermans, A., Balls, M., Bruckner, L., Cussler, K., Valadares, A. (1998). Validation of Alternative Methods for the potency testing of vaccines. *Atla*, 26(6), (s.747–761).
- Hill, R. E. (2011). 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*, 5, (s.141-145).
- Jagt, H. J., Bekkers, M. L., Bommel, S. A., Marel P. ve Schrier C. C. (2010). The influence of the inactivating agent on the antigen content of inactivated Newcastle disease vaccines assessed by the *in vitro* potency test. *Biologicals*, 38(1), (s.128-134).
- Karli, S. A., Rippke, B. E. (2015). Using Software to Estimate Relative Potency United States Department of Agriculture Center for Veterinary Biologics Standard Operating Policy/Procedure CVBSOP0102.03, (s. 1-8).

- Knight-Jones, T. J. D., Edmond, K., Gubbins, S., ve Paton, D. J. (2014). Veterinary and human vaccine evaluation methods. *Proceedings of the Royal Society B*, (s. 1-10). <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2839>
- Kumar, S., Sing, M. P., Bharti, V. K., ve Pandey, R. P. (2018). Quality control of vaccines-A journey from classical approach to 3Rs. *Microbiology: Current Research*, 2(3), (s.45-61).
- Liljebjelke, K. A., King, D. J. ve Kapczynski, D. R. (2008). Determination of Minimum Hemagglutinin Units in an Inactivated Newcastle Disease Virus Vaccine for Clinical Protection of Chickens from Exotic Newcastle Disease Virus Challenge. *Avian Diseases*, 52, (s. 260–268).
- Liu, H., Servan, R., Almeida, D., Gil, P., Majó, N., Nofrarias, M., ... Albina, E. (2018). Can genotype mismatch really affect the level of protection conferred by Newcastle disease vaccines against heterologous virulent strains? *Vaccine*, 36(27), (s. 3917-3925). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.074>
- Lumeij, J. T. ve Stam, J. W. (1985). Paramyxovirus disease in racing pigeons. Clinical aspects and immunization. A report from the Netherlands. *The Veterinary Quarterly*, 7(1), (s.60–65). <https://doi.org/10.1080/01652176.1985.9693954>
- Maas R. A., Oei H. L. ve Claassen I. J. T. M. (2000b). Dossier on the development and validation of an *in vitro* antigen quantification test as candidate potency assay vaccines for inactivated Newcastle disease vaccines. The Netherlands: ID-Lelystad.
- Maas, R. A., Winter M. P. M., Venema, S., Oei. H. L. ve Claassen I. J. T. M. (2000a). Antigen quantification as *in vitro* alternative for potency testing of inactivated viral poultry vaccines. *The Veterinary Quarterly*, 22(4), (s.223-227).
- McGinnes, L. W., Pantua, H., Reitter, J. ve Morrison, T. G. (2006). “Newcastle disease virus: propagation, quantification, and storage,.” In *Current Protocols in Microbiology* (Vol. 15F.2).
- Meng, C., Qiu, X., Yu, S., Li, C., Sun, Y., Chen, Z., Tan, L. (2016). Evolution of Newcastle Disease Virus Quasispecies Diversity and Enhanced Virulence after

- Passage through Chicken Air Sacs. *Journal of Virology*, 90(4), (s.2052–2063).  
<https://doi.org/10.1128/JVI.01801-15>
- Miller, P. J. ve Koch, G. (2013). Newcastle disease. In: Swayne D. E., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L. K., Suarez D. L., Nair V. (Ed.) *Diseases of poultry*, (13.baskı), (s.89–107). New York: Wiley-Blackwell.
- Motitschke, A., Jungbäck, C. (2011). The Quantitative ELISA for Inactivated Newcastle Antigen: Experience Report From an OMCL. Potency Testing of Veterinary Vaccines for Animals: The Way From *in Vivo* to *in Vitro*, Jungbäck, C. (Ed.), vol 134, (s.55-66). Basel: Karger.
- OIE (2012). Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Newcastle Disease, Chapter 2.3.14. Erişim adresi:  
[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.03.14\\_NEWCASTLE\\_DIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf).
- OIE (2018). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Minimum Requirement for The Production and Quality Control of Vaccines, Chapter 3.7.2. Erişim adresi:  
[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.7.02\\_MANU\\_SITES\\_VACCINE\\_PROD\\_CONTROL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.7.02_MANU_SITES_VACCINE_PROD_CONTROL.pdf)
- Piacenti, A. M., King, D. J., Seal, B. S., Zhang, J. ve Brown, C. C. (2006). Pathogenesis of newcastle disease in commercial and specific pathogen-free Turkeys experimentally infected with isolates of different virulence. *Veterinary Pathology*, 43(2), (s.168–178). <https://doi.org/10.1354/vp.43-2-168>
- Plotkin, S. (2014). History of vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(34), (s.12283–12287). <https://doi.org/10.1073/pnas.1400472111>
- Ramakrishnan, M. A. (2016). Determination of 50% Endpoint Titer Using A Simple Formula. *World Journal of Virology*, 5(2), (s.85-86).
- Razmaraii, N., Toroghi, R., Babaei, H., Khalili, I., Sadigh-Eteghad, S. ve Frogly, L. (2012). Immunogenicity of commercial, formaldehyde and binary ethylenimine

- inactivated Newcastle disease virus vaccines in specific pathogen free chickens. *Archives of Razi Institute*, 67(1), (s. 21–25).
- Salama, S. S., El-Maghraby, A. S., Mohamed, G. M., El-Sadek, G. M., Sobhy, G. ve El-Naby, A. A. (2014) Assessment of Relative Potency of Inactivated *Pasteurella multocida* Vaccine in Poultry. *Zagazig Veterinary Journal*, 42(3), (s.176-180).
- Senne, D. A., King D. J., Kapczynski, D. R. (2004). Control of Newcastle disease by vaccination. *Dev Biol*, Basel Karger, 119, (s. 165-170).
- Shahid, N., Rao, A. Q., Kristen, P. E., Ali, M. A., Tabassum, B., Umar, S., ... Husnain, T. (2017). A concise review of poultry vaccination and future implementation of plant-based vaccines. *World's Poultry Science Journal*, 73(03), (s.471–482). <https://doi.org/10.1017/s0043933917000484>
- Siev, D. (1997). Interpretation and estimation of relative potency in vaccines. *Journal of Immunological Methods*, 208(2), (s.131–139).
- Sigoillot-Claude, C., Battaglio, M., Fiorucci, M., Gillet, D., Vimort, A., Giraud, Y., Meriala, H.P. (2015). *In Vitro* Elisa Test for Quantification and Quality Testing of Infectious, Inactivated And Formulated Rabies Virus Used in Veterinary Monovalent or Combination Vaccine. *Vaccine*, 33(32), (s.3843–3849).
- Snoeck, C. J., Owoade, A. A., Couacy-Hymann, E., Alkali, B. R., Okwen, M. P., Adeyanju, A. T., ... Muller, C. P. (2013). High genetic diversity of Newcastle disease virus in poultry in West and Central Africa: Cocirculation of genotype XIV and newly defined genotypes XVII and XVIII. *Journal of Clinical Microbiology*, 51, (s. 2250–2260).
- Spickler A. R. (2016). Newcastle Disease. Iowa State University, College of Veterinary Medicine. <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.htm>
- Stokes, W.S., Kulpa-Eddy, J., Brown, K., Srinivas, G., McFarland, R. (2011a). Recent Progress and Future Directions for Reduction, Refinement, and Replacement of Animal Use in Veterinary Vaccine Potency and Safety Testing: A report from the 2010 NICEATM-ICCVAM. *Potency Testing of Veterinary Vaccines for*

- Animals: The Way From *In Vivo* to *In Vitro*, Jungbäck, C. (Ed.), vol 134, (s.9-21). Basel: Karger.
- Stokes, W. S., Brown, K., Kulpa-Eddy, J., Srinivas, G., Halder, M., Draayer, H., Galvin, Jones, B. (2011b). Improving Animal Welfare and Reducing Animal Use for Veterinary Vaccine Potency Testing: State of The Science and Future Directions. *Procedia in Vaccinology*, 5, (s.84-105).
- Swayne, D. E. ve King, D. J. (2003). Zoonosis update: Avian Influenza and Newcastle Disease. *Javma*, 222(11), (s.1534–1540).  
<https://doi.org/10.2460/javma.2003.222.1534>
- Tlaxca, J. L., Ellis, S. ve Remmele, R. L. (2015). Live attenuated and inactivated viral vaccine formulation and nasal delivery: Potential and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 93, (s.56–78). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.002>
- Türkbâl, A. (2011). *Uygulamalı İstatistik (1.Baskı)*. İstanbul: Umuttepe.
- USDA APHIS (The United States Department of Agriculture). (2018a). Newcastle Disease Vaccine, Killed Virus (113.205). Code Of Federal Regulations U.S. Government Publishing Office Title 9 Animal and animals products (1-1-18 Ed), (s.796-797).
- USDA APHIS (The United States Department of Agriculture). (2014). Veterinary Services Memorandum No: 800.112, Guidelines for Validation of *In Vitro* Potency Assays, United States Department Of Agriculture Center For Veterinary Biologics Testing Protocol, (s.1-17).
- Von Messling, V. (2017). *Paramyxoviridae* and *Pneumoviridae*. Maclachlan, N. J. (Ed.), Fenner's Veterinary Virology, (s.327-356). London: Academic Press.
- Wilbur, L. A. (1993). Statistical methods for analysis of *in vitro* antigen quantification data for veterinary biologic products. *Veterinary Microbiology*, 37, (s.31-40).
- Wood, K.R. (1991). 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*, 19(4), (s.281-286).

Zekic-Stosic, M., Ratajac, R., Lazic, S., Orlic, D., Kapetanov, M. ve Cebedzic, R. (2014). Potency test of commercially available inactivated Newcastle disease vaccines in Serbia. *Arhiv Veterinarske Medicine*, 7(2), (s.111–121).



## Ekler



T.C.  
**GIDA TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI**  
**İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü**



**BORNOVA VETERİNER KONTROL ENSTİTÜSÜ**  
**DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU**  
**PROJE DEĞERLENDİRME RAPORU**

Projenin Adı	In-vivo Yöntemlere Alternatif Olarak İn-vitro Yöntemle İnaktif Newcastle Hastalığı Aşılarında Etkinlik Tayini	
Proje Yürütücüsü	Mustafa KARS	Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Bölümü
Yardımcı Araştırmacılar		
Projenin yürütüleceği yer/Bölüm	Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü	
Projenin süresi	20 ay	
Kullanılacak Deney hayvanı türü ve sayısı	SPF Cıvciv	750 adet
Yapılacak İşlemin kısa tanımı	İnaktif Newcastle aşısının potansinin belirlenmesinde in-vivo testler olarak bilinen immunizasyon-seroloji ve immunizasyon-challenge testlerine alternatif olarak geliştirilmiş in-vitro ELISA testi kullanılacaktır. Test avian paramyxovirus-1 virusunun sahip olduğu hemaglutinin-nöraminidaz(HN) proteininin kantitatif olarak ölçülmesine dayanmaktadır. Bu ölçümde içerdiği antijen miktarı bilinen standart referans bir antijen ile test edilen aşının sahip olduğu antijen miktarı kıyaslanarak relatif potens hesaplanacaktır. Gerçekleştirilmesi planlanan ELISA testi ile inaktif Newcastle aşısının potansinin hiçbir SPF hayvan kullanımı gereksizdir hızlı, etkin ve doğru bir şekilde belirlenmesi hedeflenmektedir.	
<b>GÖRÜŞLER</b>		
Sunulan proje " Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik (6 Temmuz 2006 tarih ve 26220 sayılı Resmî Gazete) ve Enstitü Etik Kurul Yönergesine UYGUN bulunmuştur.		
<b>KARAR</b> (UYGUN / DÜZELTİLMESİ GEREKİR / KOŞULLU OLARAK UYGUN / UYGUN DEĞİLDİR) <b>UYGUN</b>		

26.04.2017

Dr. Neşide KOVEN  
Veteriner Hekim

Dr. Seza ESKİİZMİRLİLER  
Veteriner Hekim

Dr. Gülçin ERDAL  
Veteriner Hekim

Bülent KAYA  
Uz. Veteriner Hekim

Zeynep ERHAN  
Veteriner Hekim

H. Gökhan ÖZDEMİR  
Sivil Üye

Turgut Mesut YILMAZ  
Sivil Üye

Adres: Erzene Mah. Ankara Cad. No:172-155 Bornova 35040 İZMİR  
Tel: +90 232 388 00 10 Faks: +90 232 388 50 52 E-posta: Bornova.vke @ tarim.gov.tr  
Web: http://vetkontrol.tarimgov.tr/bornova

## Teşekkür

Doktora öğrenimime başladığım günden bugüne yardım ve desteğini hiç eksik etmeyen danışmanım Prof. Dr. Mine HOŞGÖR LİMONCU'ya, tez izleme komitesi üyelerim Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şafak ERMERTCAN ve Prof. Dr. Süleyha HİLMİOĞLU-POLAT'a ve Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Hüseyin TAŞLI'ya, Doç. Dr. Bayrı ERAÇ'a, Doç. Dr. Fethiye Ferda Yılmaz'a ve ayrıca tez çalışmamda desteklerini esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Yamaç Tekintaş'a, Öğr. Gör. Dr. İsmail Öztürk'e ve araştırma görevlileri Mustafa Ökeer ile Aybala Temel'e ve personeline teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda metodolojinin oluşturulmasında bilgi ve deneyimlerine başvurduğum Veteriner Biyolojik Ürün Kontrol Bölüm Şefi Dr. Ahmet ARSLAN'a, çalışmalarım boyunca hayvan denemeleri ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını hiç eksik etmeyen Hasan Hüseyin PALA, Bilgehan YILDIRIM ENGÜR, Habibe ECEVİT OKAN'a, Etlik Veteriner Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünden Dr. Özlem KARDOĞAN'a, Enstitümüz Kanatlı Teşhis laboratuvarından İsmail ŞAHİN DOKUYUCU ve Hamza KILIÇ'a ve Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdür'ü Dr.Özhan TÜRKYILMAZ'a teşekkür ederim. Son olarak, çıktığım bu yolda maddi ve manevi destekleriyle moral bulduğum değerli aileme, desteği ve göstermiş olduğu güzel sabrı için müstakbel eşim Rabia DOLUMAY'a, bu çalışmayı maddi olarak destekleyen Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na (Proje No 16/ECZ/008) teşekkür ederim.

İzmir, 14.05.2019

Mustafa KARS

## Özgeçmiş

**Adı, Soyadı** : Mustafa KARS  
**Doğum yeri ve tarihi** : Kayseri 13/09/1985  
**Telefon** : 05532544664  
**E-mail** : vethekmustafa@gmail.com

## EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Ege Üniversitesi Farmasötik Mikrobiyoloji A.B.D.	.....
Y. Lisans	Ankara Üniversitesi Doğum ve Jinekoloji A.B.D.	01.06.2015
Lisans	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi	12.06.2009

## İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2011 - ...	İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü	Veteriner Hekim