

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞU KARADENİZ BÖLGESİNDE ŞAP AŞISI UYGULANAN
BÜYÜKBAŞ RUMİNANLARIN SERUMLARINDAKİ
ANTİKOR MİKTARLARININ LİKİT FAZ BLOKİNG ELISA VE
SOLİD FAZ KOMPETİTİF ELISA İLE BELİRLENMESİ**

Murat ŞEVİK
DOKTORA TEZİ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Feridun ÖZTÜRK

KONYA-2011

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞU KARADENİZ BÖLGESİNDE ŞAP AŞISI UYGULANAN
BÜYÜKBAŞ RUMİNANLARIN SERUMLARINDAKİ
ANTİKOR MİKTARLARININ LİKİT FAZ BLOKİNG ELISA VE
SOLİD FAZ KOMPETİTİF ELISA İLE BELİRLENMESİ**

Murat ŞEVİK
DOKTORA TEZİ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Feridun ÖZTÜRK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09202025 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2011

ÖNSÖZ

Şap virusu özellikle çift tırnaklı çiftlik hayvanları arasında yüksek derecede bulaşma riski olan bir etkidir. Hastalığın bulaşma derecesinin yüksek olması önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Tipik klinik semptomlar ağız ve tırnaklarda görülen veziküller ve derinin kılsız bölgelerindeki erozyonlardır.

Şap hastalığına duyarlı vakaların saptanmasında, enfeksiyon yokluğunun doğrulanmasında ve aşılamanın etkisini göstermek amacıyla serolojik testlerden faydalanılmaktadır.

Bu çalışmada, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde; 5 farklı ilde şap aşısı ile aşılanmış büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlardaki şap virusu O ve A serotiplerine karşı gelişen antikor miktarları likit faz bloking ELISA (LPB ELISA) ve solid faz kompetitif ELISA (SPC ELISA) ile belirlenmiştir.

Doktora tez çalışmam sırasında ilgi ve yardımlarını gördüğüm başta danışman hocam Sayın Prof. Dr. Feridun ÖZTÜRK'e, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sibel Yavru'ya, Şap Enstitüsü Müdürlüğü Seroloji laboratuvarında çalışma olanağı sağlayan Dr. Serdar KIZIL ve Vet. Hekim A. Naci BULUT'a, laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Dr. Beyhan SAREYYÜPOĞLU ve seroloji laboratuvarı personeline, örneklemelerimde bana yardımcı olan Fatsa Tarım İlçe Müdürlüğü'nde görevli Vet. Hekim Kemal GÜMÜŞ, Şebinkarahisar Tarım İlçe Müdürlüğü'nde görevli Vet. Hekim Oğuz YİĞİT ve Vet. Hekim Zeki ARDİL, Trabzon Tarım İl Müdürlüğü Hayvan Sağlığı Şube Müdürü Vet. Hekim Okan BARUTÇU ve personeline, Rize Tarım İl Müdürlüğü Hayvan Sağlığı Şubesi'nde görevli Vet. Hekim Hakan DİLLİ, Ardanuç İlçesi, Aşağırmaklar Köyü'nde görevli Vet. Hekim Ayhan YAĞMUR'a, çalışmalarım boyunca ilgi ve desteğini esirgemeyen anneme ve babama teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını maddi yönden destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne (Proje No: 09202025) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	v
RESİM LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Şap Hastalığının Tarihçesi	2
1.2. Etiyoloji	5
1.3. Epidemiyoloji	9
1.4. Patogenez ve Patoloji	11
1.5. Klinik	14
1.6. Teşhis	16
1.6.1. Virolojik Testler	17
1.6.1.1. Virus İzolasyonu	17
1.6.1.2. Komplement Fiksasyon Testi (CFT)	19
1.6.1.3. Antijen Belirlenmesi	19
1.6.1.4. Nükleik Asit Tanımlama Yöntemleri	20
1.6.2. Serolojik Testler	22
1.6.2.1. Virus Nötralizasyon Testi (VNT)	22
1.6.2.2. Likit Faz Bloking ELISA	23
1.6.2.3. Solid Faz Kompetitif ELISA	24
1.6.3. Yapısal Olmayan Proteinlerin Antikor Testleri	24
1.7. Ayırıcı Teşhis	25
1.8. İmmunoloji	26
1.9. Kontrol	28
1.10. Aşılama	29
1.10.1. İnaktif Aşılar	31
1.10.2 Moleküler Aşılar	34
1.10.3. Boş Kapsid Aşılar	34
1.10.4. Canlı Attenuue Aşılar	35
1.10.5. DNA Aşıları	36

1.10.6. Acil Durum Aşıları	36
2. GEREÇ ve YÖNTEM	38
2.1. Kan Serumları	38
2.2. ELISA Pleytleri	38
2.3. Yakalayıcı Antikor	38
2.4. Kontrol Antijenleri	38
2.5. Kontrol Serumları	39
2.6. Tespit Edici Antikor (Kobay Anti-Serumu)	39
2.7. Anti-tür Konjugat	39
2.8. Kaplama Solüsyonu	39
2.9. Phosphate Buffered Saline (PBS)	39
2.10. ELISA Diluent (PBS-Tween)	39
2.11. Bloklama Solüsyonu	40
2.12. Substrat	40
2.13. Kromojen	40
2.14. Stop Solüsyonu	40
2.15. ELISA Pleyt Yıkama Sıvısı	40
2.16. Likit Faz Bloking ELISA (LPB ELISA)	40
2.16.1. Immunoabsorbans Test Pleytlerinin Kaplanması	41
2.16.2. Taşıyıcı Pleytlerde Test Serumlarının Dilusyonu	41
2.16.3. Kontrol Serumlarının İlavesi	42
2.16.4. Virus Dilusyonu	43
2.16.5. Virus (Antijen) İlavesi	43
2.16.6. İmmunoabsorbans ELISA Pleytlerinin Yıkanması	44
2.16.7. Antijen-Antikor Kompleksi Bulunan U tabanlı Taşıyıcı Pleyt İçeriğinin ELISA İmmunoabsorbans Test Pleytlere Aktarılması	44
2.16.8. Tespit Edici Kobay Anti-Serumlarının İlavesi	44
2.16.9. Konjugatın İlavesi	45
2.16.10. Kromojen-Substratın İlavesi	45
2.16.11. Reaksiyonun Durdurulması	45
2.16.12. Pleytlerin Spektrofotometre ile Okunması	45
2.16.13. Sonuçların Değerlendirilmesi	46
2.17. Solid Faz Kompetitif ELISA (SPC ELISA)	47

2.17.1. Immunoabsorbans Test Pleytlerinin Kaplanması	47
2.17.2. İmmunoabsorbans ELISA Pleytlerinin Yıkanması	47
2.17.3. Virusların İlavesi	48
2.17.4. Test Serumları ve Kontrol Serumlarının İlavesi	48
2.17.5. Yarışmacı Kobay Anti-serumlarının İlavesi	49
2.17.6. Konjugat İlavesi	49
2.17.7. Kromojen-Substrat İlavesi	49
2.17.8. Reaksiyonun Durdurulması	49
2.17.9. Pleytlerin Spektrofotometre ile Okunması	49
2.17.10. Sonuçların Değerlendirilmesi	50
3. BULGULAR	51
3.1. Likit Faz Bloking ELISA Testi Sonuçları	51
3.2. Solid Faz Kompetitif ELISA Testi Sonuçları	63
3.3. LPB ELISA ve SPC ELISA Test Sonuçlarının Karşılaştırılması	75
3.4. İnfeksiyöz Bovine Rhinotracheitis (IBR), Bovine Viral Diyare (BVD) ve Sığır Löykozunun, Şap Hastalığı Antikor Oluşumu Üzerine Etkileri	76
4. TARTIŞMA	78
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	85
6. ÖZET	87
7. SUMMARY	88
8. KAYNAKLAR	89
9. EKLER	94
EK. A: Etik Kurul Raporu	94
10. ÖZGEÇMİŞ	95

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	:	Angstrom
AGID	:	Agar Jel İmmunodiffüzyon Testi
Ark	:	Arkadaşları
BEI	:	Binary Ethyleneimine
BHK-21	:	Baby Hamster Kidney Cell Line
BSE	:	Bovine Spongiform Encephalopathy
CFSPH	:	Center for Food Security and Public Health
CPE	:	Sitopatojenik Etki
CFT	:	Komplement Fiksasyon Testi
cDNA	:	Komplementer DNA
Da	:	Dalton
EUFMD	:	Avrupa Şap Hastalığı Kontrol Komisyonu
FAO	:	Gıda ve Tarım Örgütü
IBRS-2	:	Instituto Biologico Rim Suino-2 Cell Line
kDa	:	Kilodalton
Ig	:	Immunglobulin
LPB ELISA	:	Likit Faz Bloking ELISA
M	:	Molar
µl	:	Mikrolitre
nm	:	Nanometre
NSP	:	Yapısal Olmayan Proteinler
OD	:	Optik Dansitite
OIE	:	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
OPD	:	Orthophenilaminediamine
PANAFTOSA:		Pan-Amerikan Şap Hastalığı Merkezi
PBS	:	Phosphate Buffered Saline

PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PD ₅₀	:	Koruyuculuk Dozu
PK15	:	Porcine Kidney Epithelial Cell Line
RGD	:	Arginin, Glisin, Aspartik Asit
RNA	:	Ribonükleik Asit
RT-PCR	:	Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SK6	:	Swine Kidney Cell Line
SPC ELISA	:	Solid Faz Kompetitif ELISA
TCID ₅₀	:	%50 Doku Kültürü Enfektif Dozu
VIA	:	Virusun Enfeksiyon ile İlgili Antijeni
3Cpro	:	3C Proteaz

RESİM LİSTESİ

Resim 1.1. 2011 yılının ilk 6 ayında şap hastalığı görülen bölgeler	5
Resim 1.2. Şap virusu C-S8c1(C1/Santa Pau/Spain/70) serotipinin viral kapsid yapısı	7
Resim 1.3. Dildeki multiple büyük mukozal erozyonlar ve ülserler	12
Resim 1.4. Rumen mukozasındaki düzensiz şekilli erozyonlar	13
Resim 1.5. Koyunda miyokardiyal nekroz tablosu	14
Resim 1.6. Sığırdada kesici dişlerin altında rüptüre olmuş vezikül	15
Resim 1.7. Domuzda ayak derisinin soyulmasına öncülük eden koroner band civarındaki büyük yarıklar	16

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Şap virusunun genom yapısı	6
Şekil 2.1. Serum örneklerinin sulandırılması ve kontrol serumlarının ilavesi	43
Şekil 3.1. Ordu İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (LPB ELISA)	51
Şekil 3.2. Ordu İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (LPB ELISA)	52
Şekil 3.3. Ordu İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılardan sonra Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı (LPB ELISA)	53
Şekil 3.4. Giresun İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (LPB ELISA)	53
Şekil 3.5. Giresun İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (LPB ELISA)	54
Şekil 3.6. Giresun İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılardan sonra Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı (LPB ELISA)	55
Şekil 3.7. Trabzon İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (LPB ELISA)	55
Şekil 3.8. Trabzon İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (LPB ELISA)	56

Şekil 3.9. Trabzon İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılama sonrası Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı (LPB ELISA)	57
Şekil 3.10. Rize İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (LPB ELISA)	57
Şekil 3.11. Rize İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (LPB ELISA)	58
Şekil 3.12. Rize İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılama sonrası Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı (LPB ELISA)	59
Şekil 3.13. Artvin İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (LPB ELISA)	59
Şekil 3.14. Artvin İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (LPB ELISA)	60
Şekil 3.15. Artvin İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılama sonrası Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı (LPB ELISA)	61
Şekil 3.16. Doğu Karadeniz Bölgesindeki büyükbaş ruminantların O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının aşılama sayısına bağlı değişimi (LPB ELISA)	61
Şekil 3.17. Doğu Karadeniz Bölgesindeki büyükbaş ruminantların Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı (LPB ELISA)	62

Şekil 3.18. Ordu İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (SPC ELISA)	63
Şekil 3.19. Ordu İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (SPC ELISA)	64
Şekil 3.20. Ordu İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılardan sonra Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı (SPC ELISA)	65
Şekil 3.21. Giresun İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (SPC ELISA)	65
Şekil 3.22. Giresun İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (SPC ELISA)	66
Şekil 3.23. Giresun İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılardan sonra Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı (SPC ELISA)	67
Şekil 3.24. Trabzon İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (SPC ELISA)	67
Şekil 3.25. Trabzon İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (SPC ELISA)	68
Şekil 3.26. Trabzon İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılardan sonra Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı (SPC ELISA)	69

Şekil 3.27. Rize İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (SPC ELISA)	69
Şekil 3.28. Rize İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (SPC ELISA)	70
Şekil 3.29. Rize İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılama sonrası Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı (SPC ELISA)	71
Şekil 3.30. Artvin İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (SPC ELISA)	71
Şekil 3.31. Artvin İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi (SPC ELISA)	72
Şekil 3.32. Artvin İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılama sonrası Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı	73
Şekil 3.33. Doğu Karadeniz Bölgesindeki büyükbaş ruminantların O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının aşılama sayısına bağlı değişimi (SPC ELISA)	73
Şekil 3.34. Doğu Karadeniz Bölgesindeki büyükbaş ruminantların Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı (SPC ELISA)	74

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1. LPB ELISA testi sonucu elde edilen bir pleyttteki serumların OD değerleri	46
Çizelge 2.2. LPB ELISA testi sonucu elde edilen bir pleyttteki serumların OD değerlerinin, % inhibisyon değerleri	46
Çizelge 2.3. SPC ELISA testi sonucu elde edilen bir pleyttteki serumların OD değerleri	50
Çizelge 2.4. SPC ELISA testi sonucu elde edilen bir pleyttteki serumların OD değerlerinin, % inhibisyon değerleri	50
Çizelge 3.1. Ordu İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi (LPB ELISA)	52
Çizelge 3.2. Giresun İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi (LPB ELISA)	54
Çizelge 3.3. Trabzon İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi (LPB ELISA)	56
Çizelge 3.4. Rize İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi (LPB ELISA)	58
Çizelge 3.5. Artvin İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi (LPB ELISA)	60
Çizelge 3.6. Doğu Karadeniz Bölgesindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi(LPB ELISA)	62

Çizelge 3.7. Ordu İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi (SPC ELISA)	64
Çizelge 3.8. Giresun İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi (SPC ELISA)	66
Çizelge 3.9. Trabzon İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi (SPC ELISA)	68
Çizelge 3.10. Rize İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi (SPC ELISA)	70
Çizelge 3.11. Artvin İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi (SPC ELISA)	72
Çizelge 3.12. Doğu Karadeniz Bölgesindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi (SPC ELISA)	74
Çizelge 3.13. Aşılama sayısına bağlı antikor titresi değişiminin LPB ELISA ile incelenmesi	75
Çizelge 3.14. Aşılama sayısına bağlı antikor titresi değişiminin SPC ELISA ile incelenmesi	75
Çizelge 3.15. Şap virusu O serotipine karşı oluşan antikor miktarlarının belirlenmesinde kullanılan LPB ELISA ve SPC ELISA testlerinin karşılaştırılması	75
Çizelge 3.16. Şap virusu A serotipine karşı oluşan antikor miktarlarının belirlenmesinde kullanılan LPB ELISA ve SPC ELISA testlerinin karşılaştırılması	76

Çizelge 3.17. Kan serumlarının IBR, BVD Antikor, BVD Antijen ve Löykoz Testleri sonuçları.	76
Çizelge 3.18. IBR, BVD Antikor, BVD Antijen ve Löykoz Testleri sonuçları pozitif çıkan serumların Şap virusu Serotip O ve Serotip A yönünden incelenmesi	77

1. GİRİŞ

Şap hastalığı sığır, domuz, koyun ve keçi gibi çift tırnaklı hayvanlar arasında görülen çok bulaşıcı bir hastalıktır (Ko ve ark 2009). Ayrıca şap virusu; Afrika bufalosu, bizon, geyik, dağ keçisi, antilop ve ceylan gibi yaklaşık 70 yabancı hayvan türünü de enfekte etmektedir (Aftosa 2007). Etken, insanlara da bulaşmakta ve klinik semptomlara neden olmaktadır (Mahy 2005).

Şap hastalığı dünya çapında yaygın olarak görülmektedir. Günümüzde Kuzey Amerika ve Avrupa'nın birçok ülkesi (Almanya, Arnavutluk, Avusturya, Belçika, Bosna-Hersek, Büyük Britanya, Çek Cumhuriyeti, Danimarka, Estonya, Finlandiya, Fransa, Hırvatistan, Hollanda, İrlanda, İspanya, İsveç, İsviçre, İtalya, İzlanda, Karadağ, Kıbrıs, Letonya, Litvanya, Lüksemburg, Macaristan, Makedonya Cumhuriyeti, Malta, Norveç, Polanya, Portekiz, Romanya, San Marino, Slovakya, Slovenya, Ukrayna, Yunanistan) şap hastalığı yönünden eradikedir (Aftosa 2007, OIE 2011). Hastalık, süt üretiminde önemli ekonomik kayıplara neden olmakla birlikte canlı hayvan ve hayvan ürünlerinin uluslararası ticaretini de sınırlamaktadır (Ko ve ark 2009).

Şap virusu, hayvanlar ve insanlar arasında direkt veya enfekte hayvanlarla fiziksel olarak temas eden canlı, cansız materyaller ile indirekt olarak hızla yayılır ve büyük salgınlara neden olur (Center for Food Security and Public Health 2006).

Klinik olarak etkilenmiş sığırlarda ağız, ayak ve meme de veziküler lezyonlar görülür. Bu tabloya ateş, topallık, salivasyon ve anoreksi de eşlik edebilir. Şap hastalığında morbitide yüksek, mortalite ise düşüktür. Özellikle genç hayvanlar arasında mortalite yüksektir (Paixão ve ark 2008).

Hastalık hayvan hareketlerinin sınırlandırılması, enfekte ve yüksek risk altındaki çiftlik hayvanlarının itlaf edilmesi, bu bölgelerdeki yeni enfeksiyonların geçmişinin ve ilerleyişinin takip edilmesiyle eradike edilebilir. Ölü şap virusu ile yapılan aşılama da enfeksiyonun yayılmasını sınırlandırabilir. Hastalığın görüldüğü ülkeler veya bölgeler eradikasyon tedbirlerini alarak, hastalığı eradike ettiklerini kanıtlanmaları durumunda, şap hastalığından ari statüsü kazanırlar (Arnold ve ark 2008). Şap hastalığından ari olan ülkeler, çiftlik hayvanlarının ticaretini serbestçe yapabilmelerinden dolayı büyük ekonomik kazanç elde etmektedirler.

Şap hastalığından arı olan ülkelerde hayvanların şap virusu ile temasının, enfeksiyon sonucu mu yoksa aşılama sonucu mu gerçekleştiği, virusun yapısal proteinlerine karşı oluşan antikorların ölçülmesi ile belirlenir. Hastalığın kontrolü ve eradikasyonu amacıyla subünit aşuların kullanmasından dolayı, virusun kapsid ve yapısal proteinlerine karşı oluşan antikorların ölçülmesi ile virusla temasın enfeksiyon veya aşılama sonucu gerçekleştiği belirlenmektedir.

Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) tarafından, şap hastalığına karşı oluşan antikorların belirlenmesi için geçerli kabul edilen serolojik testler; Virus Nötralizasyon, Likit Faz Bloking ELISA (Liquid Phase Blocking Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay; LPB ELISA) ve Solid Faz Kompetitif ELISA (Solid Phase Competitive ELISA; SPC ELISA)'dır (Mackay ve ark 2001).

Bu araştırmada, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde bulunan kapalı ve küçük aile tipi işletmelerde şap aşısı uygulanan büyükbaş hayvanlar; yaş (0-11, 12-35, 36 ve 36 Ay üstü) ve cinsiyete göre (Dişi ve Erkek) sınıflandırılıp, tesadüfi örnekleme metodu ile her bir gruptan alınan kan serumlarındaki şap virusunun yapısal proteinlerine karşı oluşan antikor miktarları LPB ELISA ve SPC ELISA ile belirlendi. Antikor miktarlarının yaş, cinsiyet ve aşılama sayısına bağlı değişimleri değerlendirildi.

1.1. Şap Hastalığının Tarihçesi

Şap hastalığının ilk tanımı, 1546 yılında İtalya'da bir papaz olan Hieronymous Fracastorius tarafından yapılmıştır (Mahy 2005). Yaklaşık 400 yıl sonra 1897 yılında Loeffler ve Frosch, şap hastalığı etkeninin filtre edilebilir bir ajan olduğunu göstermişlerdir. İlk kez filtre edilebilir bir ajanın, bir hayvan hastalığına neden olduğunun kanıtlanması, Viroloji için bir dönüm noktası olmuştur (Grubman ve Baxt 2004).

İlk şap hastalığı araştırma enstitüsü, 1910 yılında Almanya'nın Riems adasında kurulmuştur. Daha sonra 1925'de Büyük Britanya'da Pirbright ve 1926 yılında Danimarka'daki Lindholm Adası'nda şap hastalığı üzerine araştırma enstitüleri açılmıştır. Hastalıkla ilgili atılan en önemli adımlar enstitülerin kurulmasıyla birlikte kobay ve farelerin araştırma hayvanı olarak kullanımına ve 1937 yılında hastalığa karşı aşı geliştirme çalışmalarına başlanmasıdır (Klein 2009).

Ondokuzuncu yüzyılda Güney ve Kuzey Amerika, Avrupa, Afrika ve Asya'da birçok şap hastalığı vakası bildirilmiştir (Murphy ve ark 1999). Eş zamanlı olarak hastalık, 1870 yılında Arjantin, Urugay ve Güney Brezilya'da tespit edilmiştir (Saraiva 2004). Amerika Birleşik Devletleri'nde hastalık, 1929 yılında eradike edilmiştir. İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra hastalık tüm Dünya'da büyük bir hızla yayılmıştır (Wikipedia 2010). 1951 yılında kurulan Pan-Amerikan Şap Hastalığı Merkezi (PANAFTOSA), hastalığın kontrolü ve eradikasyonu için düzenli olarak haftalık raporlar hazırlayarak, Güney Amerika'da hastalığın kontrol altına alınmasına büyük katkıda bulunmuştur. Kanada'da 1952, Meksika'da ise 1954'den beri şap hastalığı görülmemektedir. OIE tarafından, Şili ve Urugay aşılama uygulanmayan hastalıktan ari ülke statüsünde, Arjantin, Paraguay ve Brezilya'nın Rio Grande do Sul ile Santa Catarina eyaletleri aşılama uygulanan hastalıktan ari ülkeler olarak tanımlanmışlardır (Rodriguez-Torres 2001).

Avrupa genel olarak şap hastalığından aridir. Ancak zaman zaman hastalık görülmekte olup, enfekte olsun olmasın o bölgede bulunan tüm duyarlı hayvanların kesilmesi ile hastalık yok edilmektedir. Asya'da görülen şap hastalığı salgınlarının, Rusya'yı geçerek batıya doğru yönelmesi sonucu, Doğu Avrupa'da 1910 yılında şiddetli salgınlar görülmüştür. Fransa'da 1937 ve 1939 yılları arasında, epizotik olarak belirlenen şap hastalığının, Kuzey Afrika'dan köken aldığı ve Doğu Avrupa'nın merkezi ile Batı Avrupa'ya hızla yayıldığı gözlenmiştir. Avrupa'da, 1950'li yıllarda uygulanan sistemik aşılama ile hastalığın insidensi önemli derecede düşürülmüştür (Leforban ve Gerbier 2002a).

Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization; FAO) tarafından şap hastalığının kontrolü için 1954 yılında kurulan komisyon (European Commission for the Control of Foot and Mouth Disease; EUFMD) üye ülkelerin hastalıktan korunmasında ve eradikasyonunda önemli katkılar sağlamıştır (Leforban ve ark 2002b).

İtalya'da 1993, Yunanistan'da 1994, 1996 ve 2000, Bulgaristan'da 1991, 1993 ve 1996, Arnavutluk ve Makedonya'da 1996 ve 1998 yıllarında şap hastalığı çıkmış ve eradike edilmiştir. İngiltere, Fransa, Hollanda ve İrlanda'da 2001 yılında görülen Pan-Asya O tipi salgınları, Hollanda'da aşılama, İngiltere, Fransa ve İrlanda'da

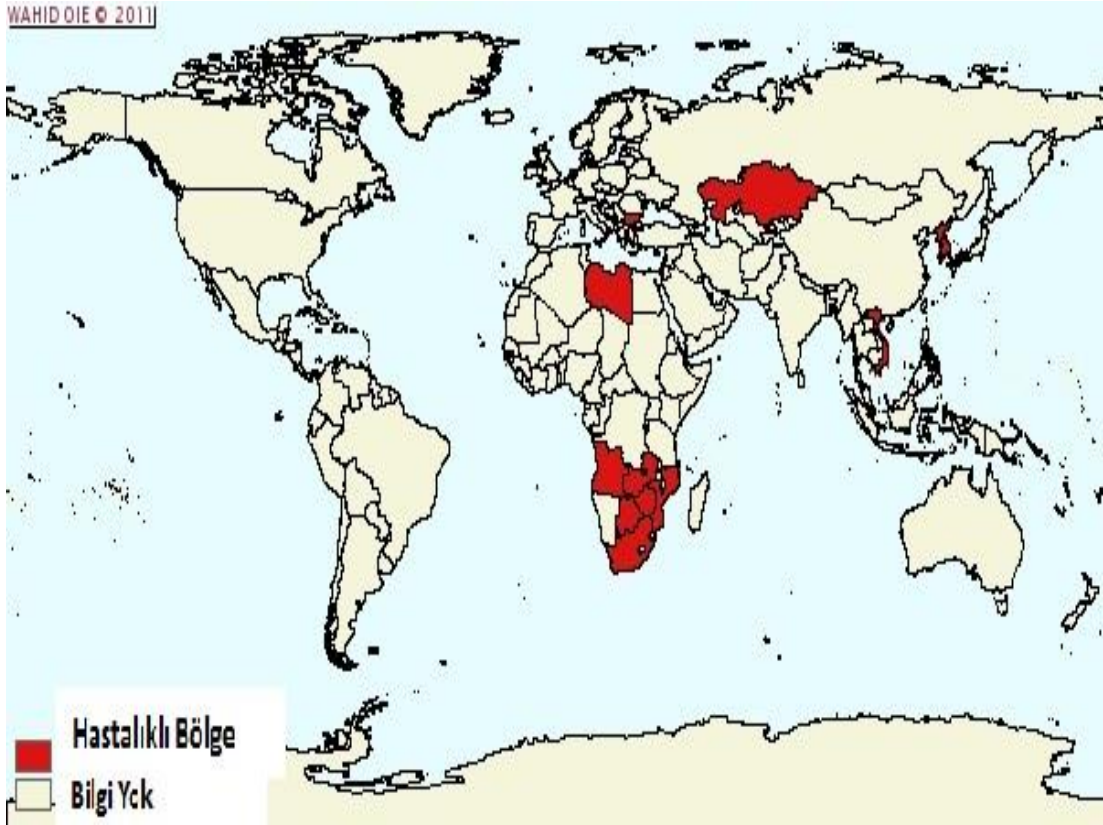
kesim yöntemleri ile kontrol altına alınmıştır (Sobrino ve Domingo 2001, Leforben ve Gerbier 2002, Sutmoller ve ark 2003).

Afrika'da, şap hastalığının yayılmasında; Afrika bufaloları ve impalaların önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Thomson 1995, Hunter 1998). Güney Afrika'daki, Kruger Ulusal Park'ında, şap hastalığı yönünden persiste enfekte bufalo oranı % 60 olarak tespit edilmiştir (Sutmoller ve ark 2003). Kuzey Afrika'da; Fas, Cezayir ve Tunus'da uygulanan koruma amaçlı aşılama ile 1999 yılından beri şap hastalığı bildirilmemiştir (Rweyemamu ve ark 2008). Güney Afrika'da, 2000 yılının sonlarında bir domuz çiftliğinden köken alan, O serotipi salgını ortaya çıkmış ve duyarlı hayvanların, ring aşılama yöntemi ile aşılansıyla hastalık kontrol altına alınmıştır (Sutmoller ve ark 2003). Zimbabve, Namibya, Botsvana ve Güney Afrika Cumhuriyeti hariç geri kalan Afrika ülkelerinin çoğunda şap hastalığı endemik olarak ele alınmaktadır (Hunter 1998, Kitching 1999).

Asya'nın birçok ülkesinde (Kamboçya, Laos, Malezya, Filipinler, Tayland ve Vietnam) şap hastalığı endemik olarak görülmektedir (Mahy 2005, Rweyemamu 2008). Şap hastalığının 1929 yılından beri görülmediği Tayvan'da, 1997 yılında şap hastalığı belirlenmiştir (Kitching 1999). Çin'in bazı bölgelerinde ve Tayland'da 1999 yılında şap virusunun O serotipinin farklı bir türü (Pan-Asya tip O) tespit edilmiştir. Şap hastalığından 1908'den beri ari olan Japonya ve 1934'den beri ari olan Kore'de, 2000 yılında Pan-Asya tip O serotipi belirlenmiştir (Sutmoller ve ark 2003, Mahy 2005).

Yeni Zelanda'da hastalığın hiç görülmediği bildirilmiştir (Grubman ve Baxt 2004).

Türkiye'de şap hastalığı ile ilgili ilk istatistiksel bilgiler, 1914 yılında yayımlanmıştır (Nazlıoğlu ve Örün 1969). Şap virusunun; A, O, C, SAT-1 ve Asia-1 serotipleri 1914 yılından beri değişik tarihlerde izole ve identifiye edilmiştir. Şap hastalığının kontrolü için karantina tedbirleri ile birlikte 1962 yılından itibaren aşılama uygulanmaktadır. Asia-1 serotipi, 2001 yılından beri görülmemiştir. Günümüzde hastalık, Türkiye'de endemik olarak seyretmekte ve etkenin yalnızca A (A/İran/2005) ve O (Panasia-II) serotipleri tespit edilmektedir (Sobrino ve ark 2001, Rweyemamu ve ark 2008, Knowles ve ark 2009, Şap Enstitüsü Müdürlüğü 2009a).

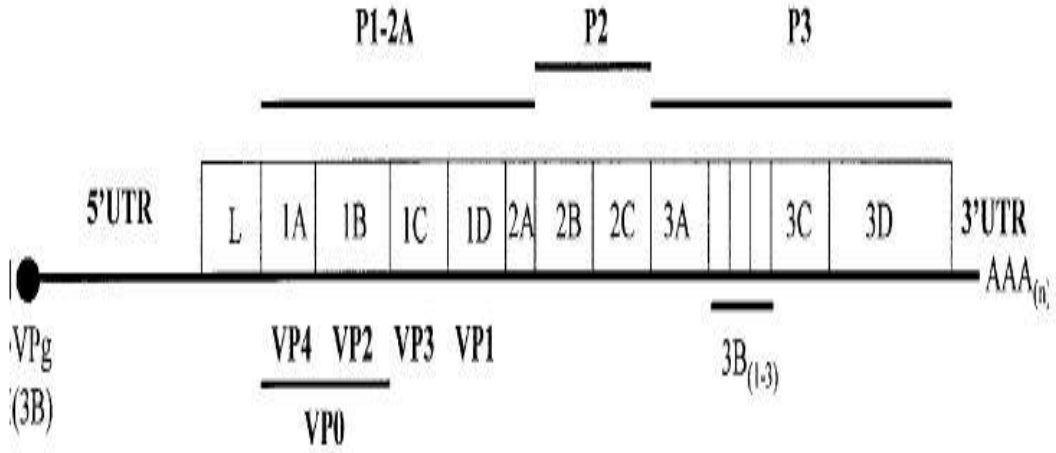


Resim 1.1. 2011 yılının ilk 6 ayında şap hastalığı görülen bölgeler (OIE 2011).

1.2. Etiyoloji

Şap virusu; *Picornaviridae* familyasının, *Aphthovirus* alt grubunda yer almakta olup, yaklaşık 30 nanometre (nm) çapında ve zarsızdır. İkosahedral simetriye sahip virus kapsidinin çapı, 300 Angstrom (Å)'dur (Alexandra ve Gomes, Mahy 2005). Kapsid; 4 yapısal virus proteininden (VP) ve bunların her birisinin, 60 kopyasından oluşmaktadır (Grubman ve Baxt 2004). Yapısal proteinler; VP1(1D), VP2(1B), VP3(1C) ve VP4(1A)'dır (Mackay ve ark 2001). Her bir yapısal proteinin bir kopyası bir araya gelerek, protomerleri, 5 protomer, pentameri ve 12 pentamer kapsidi şekillendirmektedir (Domingo ve ark 2002).

Viral genom, 8 500 nükleotid uzunluğunda ve tek zincirli, pozitif polariteli RNA içermektedir (Gómez ve ark 2006, Mahy 2005). Virus RNA'sı, 3' ucunda, 5' ucuyla kovalent olarak bağlı küçük bir proteine (VPg) sahiptir. Genom üzerinde, 3 fonksiyonel bölge bulunmaktadır. Bu bölgeler; 5' uç kodlanmayan düzenleyici bölge (5'UTR; untranslated region), protein kodlayan bölge (alt bölümleri L/P1, P2 ve P3) ve 3' uç kodlanmayan düzenleyici bölge (3'UTR)'dir (Domingo ve ark 2002).



Şekil 1.1. Şap virusunun genom yapısı (Mahy 2005).

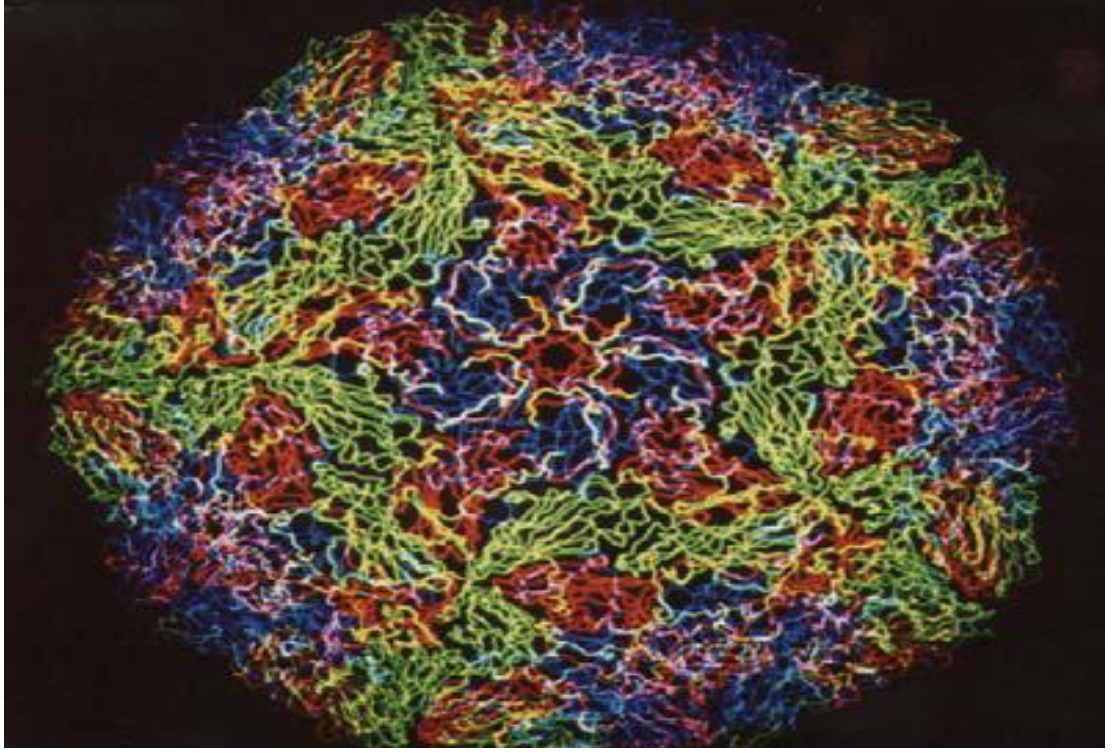
Viral genomun P1 bölgesinde, yapısal proteinler (VP1, VP2, VP3 ve VP4) üretilmektedir (Rueckert 1984, Diego ve ark 1996). VP0, VP2 ve VP4'ün ön ürünüdür (Mackay 2001). VP1, VP2 ve VP3 proteinleri; $2,4 \times 10^3$ dalton (Da) ağırlıktayken, VP4; $8,5 \times 10^3$ Da molekül ağırlığındadır (Morrell ve ark 1987).

Monoklonal antikor bağlanma çalışmaları ve X ışını kristallografisi ile VP1, VP2 ve VP3'ün virus yüzeyinde, VP4 proteinin ise iç kısımda bulunduğu tespit edilmiştir (Alexandra ve Gomes 2000, Shaila 2001). VP1, VP2 ve VP3 benzer yapısal özelliklere sahiptirler ve antijenik özellik gösterirler (Sáiz ve ark 2002).

VP1 yapısal proteini, major antijenik özellik göstermektedir ve serotip spesifik nötralizan antikor oluşumunu teşvik etmektedir (Shaila 2001, Clavijo 2003). VP1 proteininin G-H halkasında yer alan arjinin-glisin-aspartik asit peptid dizileri hücresel tanımlama ve bağlanmayı sağlamaktadır (Grubman 2004).

VP2 ve VP4, RNA enkapsidasyonunu takiben, VP0'nun otokatalitik bölünmesi sonucu ortaya çıkmaktadır (Sáiz M ve ark 2002).

VP3'ün kapsid stabilitesini, VP4'ün ise bir dominant T hücre epitopu olarak, virus spesifik T hücre yanıtının oluşmasını sağladığı düşünülmektedir (Mahy 2005).



Resim 1.2. Şap virusu C-S8c1 (C1/Santa Pau/Spain/70) serotipinin viral kapsidinin yapısı; VP1, Mavi; VP2, Yeşil; VP3, Kırmızı; VP4, Sarı Bölgeler (Alexandra 2000).

Yapısal olmayan proteinler; L^{pro} , 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, $3C^{pro}$ ve 3D-RNA bağımlı RNA polimeraz'dır (Nagendrakumar ve ark 2009). 2A, 2B ve 2C viral genomun P2 bölgesinden, 3A, 3B, 3C ve 3D proteinleri ise P3 bölgesinden üretilmektedir (Rueckert 1984, Jackson 2007). Yapısal olmayan proteinler, virusun enfekte hücredeki fonksiyonları ile ilgilidirler (Sobrinho ve ark 2001). 2A proteini, P1 bölgesi öncü yapısal proteinlerinin oluşumu ile ilişkilidir. 2B ve 2C proteinleri ise sitopatolojik etki (CPE)'lerin oluşumunu teşvik etmektedir. 3A ve 3B proteinleri viral replikasyonda görev almaktadır (Mahy 2005). 3C proteini, viral proteaz olarak tanımlanmıştır ve viral poliproteinlerinin işlenmesi ile ilişkilidir (Grubman 2004). 3D proteini RNA'ya bağlı RNA polimeraz olup, viral RNA replikasyonunda yer almaktadır (Mahy 2005).

Viral RNA bağımlı RNA polimerazının proofreading kabiliyetinin olmamasından dolayı etken, yüksek mutasyon oranına sahiptir (Ayelet 2009). Virus replikasyonu ve translasyonu, enfekte hücre sitoplazmasında gerçekleşir. Etkenin RNA'sı enfeksiyözdür (Sobrinho ve ark 2001).

Yirminci yüzyılın başlarında şap virusunun, serolojik olarak birden fazla serotipinin olduğu belirlenmiştir. Başlangıçta 2 serotip isimlendirilmiştir. (O tipi;

Fransa ve A tipi; Almanya) Daha sonra Almanya'da, C serotipi tanımlanmıştır. C serotipinin tanımlanmasından yaklaşık 30 yıl sonra İngiltere'de, Pirbright laboratuvarında, Güney Afrika'daki şap hastalığı salgınlarından toplanan örneklerde 3 yeni serotip (SAT1, SAT2 ve SAT3) belirlenmiştir. Yedinci ve son serotip olan Asia-1 ise Pakistan'dan elde edilen örneklerden izole ve identifiye edilmiştir (Mahy 2005). Bu serotiplerin de birçok alt tipleri mevcuttur (Ko ve ark 2009). Geçirilen bir enfeksiyon veya bir serotipe karşı yapılan aşılama diğer serotiplere karşı koruma sağlamamaktadır (Mahy 2005).

Şap virusu ısı, UV ve gamma ışınlarına duyarlıdır. Isı etkisi; zamana, uygulanan sıcaklığa ve korunmak istenen ürüne bağlı olarak değişmektedir. Kontamine sıvıların, 90°C'da işlem görmesi önerilmektedir (Mann ve Sellers 1990). Etken doğada uygun koşullar altında aylarca aktivitesini koruyabilir. Etkenin, süt ve süt ürünlerinin normal pastörizasyon sıcaklıklarında ve etlerin donma sıcaklığının altında canlı kalabildiği tespit edilmiştir (Center for Food Security and Public Health 2006).

Şap virusu pH 7 ve pH 9 arasında stabildir (Mann ve Sellers 1990). Etken, pH 6,5'in altında ve pH 11'in üzerinde inaktive olur (Aftosa 2007). Fosforik, sülfirik, sitrik, asetik ve formik asit, sodyum karbonat, sodyum metasilikat ve sodyum hidroksit gibi kimyasal maddeler etkeni inaktive etmektedir. Genellikle asitler, deterjanlarla formüle edilerek kullanılmaktadır. Organik materyal yokluğunda, oksidasyon ajanları (Hipokloritler) virusu inaktive ederler. Rigor mortis sonucu salınan laktik asit, etkenin inaktivasyonuna öncülük etmektedir (Mann ve Sellers 1990).

Virus stabilitesi, düşük sıcaklıklarda artar. Kültür ortamında, +4°C'da bir yıldan fazla varlığını sürdürebilir. Dondurulmuş lenf nodüllerinde ve kemik iliğinde uzun süre canlı kalabilir. Organik maddeler, etkenin fomitler üzerinde varlığını sürdürmesini sağlar. Şap virusunun, laboratuvar ortamındaki buğday kepeği ve samanda üç aydan fazla süreyle bulunduğu tespit edilmiştir.

Sıcaklık 18°C'ye yükseldiğinde etkenin inaktive olmaya başladığı görülmüştür. Virus, sığır dışkısında 18°C'de, 2-3 ay canlı kalabilmektedir. Etken, güneş ışığına duyarlıdır (Aftosa 2007).

Şap virusu, primer sığır tiroid hücrelerinde veya primer domuz, buzağı ve kuzu böbrek hücre kültürlerinde üretilebilmektedir. Ayrıca yavru hasmter (Baby Hamster Kidney; BHK-21) ve domuz böbrek hücre kültürlerinde (Istituto Biologico Rim Suino; IBRS-2) de üretilmektedir. Fakat bu hücre hatları primer hücrelere göre daha az duyarlıdır (Aftosa 2007). Virusun enfektivite çalışmalarında, yenidoğan farelere şap virusunun intraperitoneal inokülasyonu yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca immunolojik araştırmalarda kullanılan kobaylara, şap virusu bir seri pasaj sonucu adapte edilerek, bu hayvanlarda klinik semptomların gelişmesi gözlenmiştir (Sobrinho 2001).

1.3. Epidemiyoloji

Şap hastalığı, çift tırnaklı hayvanları etkilemektedir. Sığır, koyun, keçi ve domuz gibi evcil hayvanların yanı sıra vahşi ruminantlarda da hastalık görülmektedir (Mann ve Sellers 1990). Şap virusunun en yaygın konağı sığırlardır (Aftosa 2007). Afrika bizonu, geyik (Karaca, Asya Geyiği, Antilop ve Afrika Ceylanı) ve yabani domuz da doğal konaklar arasındadır. Ayrıca fillerin, kunduzların ve kirpilerin, şap virusuna karşı duyarlı oldukları ve etkenin yayılmasında rol oynadıkları bildirilmiştir (Mann ve Sellers 1990, Mahy 2005).

Şap virusunun 7 serotipi dünya üzerinde farklı şekilde dağılım göstermektedir. 6'sı (O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3) Güney Afrika'da ortaya çıkmışken, 4 serotip (O, A, C, Asia-1) Asya'da ve 3 serotip (O, A, C) Güney Amerika'da gözlemlenmiştir. Dünya üzerinde en yaygın serotip O serotipidir (Rweyemamu 2008). A serotipinin, alt tipleri büyük antijenik farklılıklar göstermektedir ve bu alt tipler arasında çapraz koruma görülmemektedir. Ayrıca A serotipinde, diğer serotiplerden daha fazla rekombinasyon görülmektedir. Asia-1 serotipinin virulensi, diğer serotiplere göre daha düşüktür. SAT1, SAT2 ve SAT3 serotipleri arasında oldukça yüksek sekans farklılıkları bulunmaktadır. Son 20 yıl içerisinde C serotipinin neden olduğu büyük bir salgın bildirilmemiştir. Sadece sporadik olarak Güney Amerika, Doğu Afrika ve Pakistan'da görülmüştür (Klein 2009).

Şap hastalığı aynı zamanda insanları da etkilemektedir. Fakat insanlar arasında büyük kapsamda bir etkilenme görülmemiştir (Hyslop 1973). İnsanlar,

çiftlik ve mezbahanelerde, aşı üretim tesisleri ve laboratuvarlarda, enfekte hayvan veya materyaller ile temas sonucu enfekte olmaktadır. Waldman tipi aşı üreten laboratuvarında çalışan bir işçi iki kez şap virusu ile enfekte olmuştur. İlkinde etkenin C serotipi, ikincisinde ise O serotipi enfeksiyona neden olmuştur. Ayrıca insanlarda enfekte sütün içilmesi ve virus aerosollarının solunması sonucu da enfeksiyon meydana gelebilmektedir (Mann ve Sellers 1990).

Hastalık yüksek derecede bulaşıcıdır (Center for Food Security and Public Health 2006). Virusun nakli enfekte hayvanlarla veya kontamine fomitlerle direkt veya indirekt temasla gerçekleşmektedir. Etkenin giriş yolları; aerosol virusun solunması, kontamine yemin sindirimi, deri sıyrıklarından veya mukus membranlardan virusun girişi ile gerçekleşmektedir.

Hayvan türlerine göre etkenin giriş yolları önemlilik arz etmektedir. Örneğin aerosol virus girişine; domuz, sığır ve koyuna göre daha az duyarlılık göstermektedir (Aftosa 2007). Sığırlar, bir metreküp havadaki 0,06 TCID₅₀ (Median tissue culture infective dose; % 50 doku kültürü enfektif dozu) virus konsantrasyonu ile enfekte olurken, domuzlar bu miktarın 6 000 katı ile enfekte olmaktadır (Mahy 2005).

En yaygın bulaşma, ağız rüptüründe keseciklerin şekillendiği zaman görülmektedir. Oluşan aftlardan salınan sıvılarla bol miktarda virus saçılmaktadır. Virus, uygun hava şartlarında rüzgarla birlikte uzak mesafelere yayılabilmektedir. 1981 yılında, İngiltere’de şap hastalığı salgını sırasında etkenin aerosol yolla yaklaşık 250 km. yayılarak, Fransa’da salgınlara neden olduğu bildirilmiştir (Donaldson ve Alexandersen 2002). Virusun hava ile yayılarak duyarlı hayvanlarda enfeksiyon meydana getirme kabiliyeti, şap virusunun serotiplerine göre değişmektedir. Alexanderson ve Donaldson (2002) İngiltere’de yaptıkları bir çalışmada domuzların Log₁₀ 6,1 TCID₅₀ Pan Asya serotipi ile enfekte olurken, C Noville serotipi ile enfeksiyon için bu miktarın 300’de birinin yeterli olduğunu tespit etmişlerdir (Mahy 2005). Enfekte hayvanlarla temas eden insanlar nazal kanalları, ayakkabıları ve elbiselerinde etkeni taşıyarak, hastalığın yayılmasında rol oynarlar.

Şap virusu, akut enfekte hayvanların bütün sekresyon ve ekstraksiyonlarında bulunabilir (salya, ekspire edilen hava, süt, idrar, gaita ve semen gibi) (Aftosa 2007).

Klinik belirtiler görülmeden 4 gün önceye kadar süt ve semende etken bulunmaktadır (Mahy 2005).

Ruminantlar (sığır, koyun ve keçi) şap virusunun taşıyıcısı olabilirler. Taşıyıcı hayvan enfekte olmakta, fakat hastalanmamaktadır. Hastalığı atlatan ve aşılanan hayvanlar, taşıyıcı olabilirler (Center for Food Security and Public Health 2006). Taşıyıcı hayvanlarda virus özellikle faringeal bölgede bulunur (Mann ve Sellers 1990). Sığır farenks epitelyum hücrelerinde virusun 3 yıldan fazla süre ile canlı kaldığı tespit edilmiştir (Mahy 2005). Hastalığı atlatan sığırlar 6-24 ay, koyunlar ise 4-6 ay etkeni taşıyabilirler. Domuzlar da taşıyıcılık görülmemiştir (Center for Food Security and Public Health 2006).

1.4. Patogenez ve Patoloji:

Duyarlı çiftlik hayvanları, enfekte hayvan veya materyal ile direkt veya indirekt temas etmeleri halinde şap virusu ile enfekte olurlar. Enfekte ve duyarlı hayvanlar çok sıkı temas halinde iseler en yaygın bulaşma şekli aerosol yolla yayılan damlacıklarla gerçekleşmektedir (Alexandersen 2003).

Şap hastalığının doğal enfeksiyon yolu solunum sistemidir. Virusun girişi ve çoğalması, muhtemelen faringeal bölgede gerçekleşmektedir. Virusun küçük hava partikülleri ile birlikte alveoler boşluklara ulaşır, makrofajlarla direkt kan dolaşımına taşındığı düşünülmektedir. Enfeksiyonun akciğerde meydana gelebileceğine dair bazı kanıtlar bulunmaktadır. Enfeksiyondan hemen sonra virus lenfatik sistem ve kan yoluyla birçok doku ve organa yayılır. Klinik belirtiler ortaya çıkmadan önce sekresyon ve ekstraksiyonlarda çok miktarda virus bulunur.

Hayvanlarda virus titreleri, nötralizan antikor miktarının artmasıyla birlikte düşmektedir. Enfeksiyonu takiben sığırların önemli bir bölümü taşıyıcı konumuna gelirler. Taşıyıcı hayvanların farenksinde virus 2,5 yıldan daha fazla bir süre bulunabilmektedir (Mann ve Sellers 1990).

Sığırlarda enfeksiyon, genellikle aerosol virusun solunum yoluyla alınması ile ortaya çıkmaktadır. Enfeksiyon aynı zamanda etkenin, deri veya müköz membranlardan girmesiyle de gerçekleşmektedir. Fakat bu yolla enfeksiyonun meydana gelebilmesi için aerosol yolla alınan virusdan, 10 000 kat daha fazla virusa

ihtiyaç vardır. Aerosol yolla deneysel olarak enfekte edilen bir sığırın in situ hibridizasyon yöntemi ile ilk 24 saat içerisinde respiratuar bronşial epitelyumunda, subepitelyumunda ve akciğerin interstisyel alanlarında virus belirlenmiştir. 72 saat sonra dilin epiteliyal hücrelerinde, yumuşak damak, ayak, tonsiller ve trakeabronşiyal lenf nodüllerinde belirtiler ortaya çıkmıştır (Grubman ve Baxt 2004).

Şap hastalığının karakteristik lezyonları; içi sıvı dolu tekli veya birçok kesecik ve 2 mm'den 10 cm'e kadar değişen çaplara sahip olan kabarcıklardır. İlk lezyonlar; küçük solgun alanlar veya veziküllerdir. Veziküller kısa bir süre sonra kaybolurlar. Veziküllerin yerini kırmızı, zedelenmiş ruptur alanları veya ülserler alır. Bu alanlar, gri fibrinoz tabaka ile kaplanabilir ve yeni gelişen epitelyumda demarkasyon çizgisi şekillenebilir. Epidermisdeki vezikül sıvılarının kaybolması, nekrotik kuru lezyonların oluşmasına neden olmaktadır (Aftosa 2007).



Resim 1.3. Dildeki multiple büyük mukozal erozyonlar ve ülserler (CFSPH 2009).

Şap hastalığı lezyonlarının konumu ve belirgin özellikleri, türler arasında değişmektedir. Sığırlarda oral kavitede birçok erozyon, ülser veya vezikül bulunabilir. Domuzlarda, koyunlarda ve keçilerde ise bu lezyonlar topuk bölgesinde, koroner bantta ve ayağın interdigital yarığında daha yaygındır (Aftosa 2007).

Ayakta görülen lezyonlar deriye kadar ulaşarak, koronitise neden olabilmektedir. Ağır hasta hayvanların tırnakları düşebilir. Lezyonlar; meme ve meme başında, ruminal pillarda, prepisyumda ve vulvada görülebilir.

Genç hayvanlarda kardiyak dejenerasyon ve nekroz, miyokardiyumda gri veya sarı çizgiler görülebilmektedir. Bu lezyon görünüşleri, bazen kaplan postunu andırmaktadır (Aftosa 2007).

İlk histopatolojik değişiklikler; kornifiye, çok katlı yassı epitelde balon dejenerasyonu, stratum spinosumdaki hücrelerin sitoplazmik ve eozinofilik boyanmasında artış ve dermiste intraselüler ödem başlangıcı ile karakteristiktir. Ödem tablosunu nekroz, mononükleer hücre ve granülosit infiltrasyonu takip eder. Doku altındaki epitelyumun bölünmesi ile veziküller içerisindeki lezyonlar makroskobik olarak görülebilir. Veziküler sıvı üretimine bağlı olarak vezikül büyüklüğü değişmektedir.



Resim 1.4. Rumen mukozasındaki düzensiz şekilli erozyonlar (CFSPH 2009).

Şap virusu replikasyonu, kalpde yüksek seviyelerde gerçekleşmekte ve vireminin meydana gelmesine neden olmaktadır. Akut miyokarditis vakalarında kalbin makroskobik incelemesinde; kalbin yumuşak olduğu, düzenli kasılmadığı, kalbin sol ventrikülünde ve interventriküler septumunda beyaz gri benekler veya çizgiler görülmektedir (Mahy 2005).



Resim 1.5. Koyunda miyokardiyal nekroz tablosu (CFSPH 2009).

Hiperakut durumlarda kalpde makroskopik lezyonlar açıkça görülmeyebilir. Ancak virus, miyokardiyum veya kandan izole edilebilir. Histopatolojik incelemede; hiyalin dejenerasyonu ile birlikte lenfohistiositik miyokarditis, miyosit nekrozu ve mononükleer hücre infiltrasyonu gözlenebilir. Bazen iskelet kasları da etkilenebilmekte olup yaşlı hayvanların miyokardiyum ve iskelet kaslarında lezyonlar görülmemektedir (Mahy 2005).

1.5. Klinik

Hastalığın inkübasyon süresi alınan virus dozunun miktarına, bulaşma yoluna, spesifik virus serotipine, hayvan türüne ve çiftlik şartlarına göre farklılık göstermektedir. İşletmeler arası indirekt yolla yayılmada inkübasyon süresi 4 ile 14 gün arasında değişmektedir. Enfekte hayvanın bulunduğu işletmelerde, direkt kontakt yolla yayılmada ise hastalığın inkübasyon süresinin 2 ile 14 gün arasında değiştiği bildirilmiştir (Mahy 2005). Çiftlik içinde ise yayılma şartlarına bağlı olmak üzere inkübasyon süresi 2-14 gündür. Fakat bu süre 24 saate kadar düşebilmektedir (Alexandersen ve ark 2003).

Sığırlarda inkübasyon süresi virus dozuna ve enfeksiyon yoluna bağlı olarak 2 ile 14 gün arasındadır. İnkübasyon süresi koyunlarda 3 ile 8 gün arasında iken domuzlarda bu süre genellikle 2 gündür (Aftosa 2007).

Şap hastalığı akut ateşle karakterize olup ağız ve ayak çevresinde veziküller şekillenmektedir (Alexandersen ve ark 2003). Topallık, iştahsızlık, depresyon, aşırı salivasyon, burun akıntısı ve süt miktarının azalması da klinik belirtiler arasında yer almaktadır (Center for Food Security and Public Health 2006). Genç hayvanlarda virusa bağlı şekillenen multifokal miyokarditis sonucu ölüm meydana gelmektedir (Aftosa 2007). Hastalık gebe hayvanlarda abortlara neden olabilmektedir.

Lezyonlar büyük çoğunlukla ağız ve ayakta görülmekle birlikte burunda, memede, meme başlarında, prepisyumda, vulvada ve deri ile mukozanın diğer bölgelerinde de görülebilmektedir (Mahy 2005).

Enfekte sığırlarda; dilde, diş etinde, yumuşak damakta ve burunda kabarcıklar görülmektedir. Bu kabarcıklar acı veren yaralara dönüşmektedir. Ayak lezyonları, koroner band ve çatal arasında görülmektedir (Center for Food Security and Public Health 2006).



Resim 1.6. Sığırdaki kesici dişlerin altında rüptüre olmuş vezikül (CFSPH 2009).

Hastalık koyun ve keçilerde hafif seyretmekte olup; ateş, oral lezyonlar ve topallık görülebilir (Center for Food Security and Public Health 2006).

Domuzlarda ayakta çok şiddetli lezyonlar görülmektedir. İlk semptomlar topallık ve koroner bant civarının beyazlaşmasıdır. Koroner bant, ökçe ve çatal arasında veziküller gelişmektedir. Veziküller bazen burun ve memede bulunabilmektedir. Ağız lezyonları, sığırlardakine göre daha küçük ve az belirgindir.

Nadiren ağızdan salya akmaktadır. Çok kısa süreli ateş görülebilmektedir (Aftosa 2007).



Resim 1.7. Domuzda koroner band civarındaki büyük yarıklar (CFSPH 2009).

Yetişkinlerin çoğu iki veya üç haftada iyileşir. Fakat sekonder enfeksiyonların varlığı iyileşme sürecini uzatabilir. Olası komplikasyonlar geçici veya kalıcı süt veriminin azalması, kronik topallık, mastitis, ağırlık ve kondisyon kaybına neden olabilmektedir. Mortalitenin genç hayvanlarda yüksek olduğu tespit edilmiştir. Nadir de olsa hastalığın şiddetli seyretmesi halinde yetişkin hayvanlar arasında da ölüm görülebilmektedir (Aftosa 2007).

Hastalıktan etkilenmiş sürülerde morbiditenin % 100, mortalitenin ise genellikle % 1'den az olduğu bildirilmiştir (Center for Food Security and Public Health 2006).

1.6. Teşhis:

Şap hastalığının hızlı teşhisi büyük önem taşımaktadır. Özellikle hastalıktan ari olan ülkelerde karantina ve eradikasyon programlarının hızlı bir şekilde uygulanması için hastalığın kısa sürede tanımlanması gerekmektedir (Murphy 2000). Ayrıca hastalığın teşhisi; salgın meydana getiren suşun antijenik ve genomik özellikleri, aşı seçimi ve virus kaynağının takip edilmesi bakımından önemlidir (Clavijo 2003).

Klinik belirti gösteren hayvanların, gözetimi veya virusun örneklerden direkt tespit edilmesi ile teşhis konulabilmektedir (Ko ve ark 2009). Klinik belirti gösteren hayvanlardan genellikle teşhis için vezikül sıvısı, dil, bukkal mukoza ve ayaktaki rüptüre olmamış veya yeni rüptüre olan vezikül kenarlarından alınan epiteliyal doku, antikoagulanlı kan, serum ve özefagus/farinks sıvıları toplanır (Murphy 2000, OIE 2009).

Ölü hayvanlardan lenf nodülleri, tiroid ve kalpden örnekler alınabilir. Bu örnekler, % 10 fetal buzağı serumu içeren eşit hacimdeki hücre kültürü ile dilüe edilir. Alınan örnekler dondurulmalı (tercihen -70°C) ve soğuk zincir altında laboratuvara gönderilmelidir (Murphy 2000).

Klinik belirti göstermeyen taşıyıcı hayvanlar, özefagus ve farinks sıvılarından, şap virusu izolasyonu ve RT-PCR (Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu) metotlarıyla belirlenebilir (Aftosa 2007).

1.6.1. Virolojik Testler:

Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü tarafından 4 virolojik teşhis metodu tanımlanmıştır. Bu metodlar; virus izolasyonu, antijen ELISA, komplement fikzasyon testi ve nükleik asit tanımlama metotlarıdır (Clercq ve ark 2008).

Virolojik teşhis metotları yanında spesifik antikor yanıtlarının belirlenmesi ile şap hastalığının teşhisinde serolojik metotlar da kullanılmaktadır (Re'mond ve ark 2002).

1.6.1.1. Virus İzolasyonu:

Virus izolasyonu, canlı şap virusunun varlığını kanıtlayan en kesin yöntem olarak uzun süredir kullanılmaktadır. Virus izolasyonu için genellikle IBRS-2, PK15, SK6, BHK-21, primer fetal kuzu böbreği veya primer sığır tiroid hücreleri gibi duyarlı hücre kültürleri kullanılmaktadır (Clercq 2000, Clercq ve ark 2008).

Virus izolasyonunda buzağı tiroid hücrelerinin primer kültürleri, sığırların intradermal inokülasyonu kadar duyarlılık göstermektedir. Bununla birlikte primer tiroid hücrelerinden, monolayer elde etmek için yüksek maliyet ve yoğun emek

harcanmakla birlikte yapılan çalışmalar esnasında bu hücreler, onkogen transenfeksiyonuna karşı immortalize olurlar ve daha az duyarlı hale gelirler (Re'mond ve ark 2002).

Virus izolasyonu amacıyla şüpheli örneklerin inokule edildiği hücre kültürleri, CPE yönünden 48 saat sonra incelenmektedir (OIE 2009). CPE meydana gelen hücre kültürü süpernatantındaki, şap virusunun serotipi ELISA, komplement fikzasyon (CFT) ve RT-PCR testleri ile belirlenmektedir (Alonso ve ark 1992, Reid ve ark 1998). Eğer hücre kültürlerinde CPE tespit edilmezse, hücreler dondurulup çözündürülmeli ve yeni bir kültüre inoküle edilerek tekrar CPE yönünden incelenmelidir (OIE 2009). ELISA, CFT ve RT-PCR testleri ile negatif sonuç veren örnekler 2 kez daha doku kültüründe pasajlanır ve incelenirler (Alonso ve ark 1992, Reid ve ark 1998). Fakat primer hücrelerin bir pasajdan sonra dondurulmasının, duyarlılıklarının azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (Re'mond ve ark 2002).

Kullanılan hücre kültürü, farklı hayvan türlerinden gelen numunelerdeki şap virusunu izole edebilecek duyarlılıkta olmalıdır. Örneğin domuz hücre kültürünün, keçi ve koyundan gelen numunelerden şap virusunu izole edilebilecek duyarlılıkta olmadığı belirtilmiştir (Clercq ve ark 2008). Bununla birlikte BHK-21 hücre kültürleri farklı hayvan türlerinden elde edilen örneklerden, şap virusunun izole edilmesine daha fazla duyarlılık göstermektedir (Clercq 2000). Hücre kültürlerine alternatif olarak süttten kesilmemiş, 2-7 günlük ve genetik olarak aynı türdeki fareler kullanılabilir. Fakat virusun fareye uygulanmasından önce birkaç kez pasaj yapılması gerekebilir (OIE 2009).

Reid ve ark (1998) şap virusunun izolasyonu için sığır, koyun, domuz ve keçiden elde ettikleri toplam 166 epitelyal örneği, primer buzağı tiroid ve domuz böbrek hücre kültürlerine inoküle etmişler ve hücre kültürlerinde gelişen antijenleri daha sonra ELISA ve RT-PCR metodları ile incelemişlerdir. ELISA metodunda örneklerin 80'ini, RT-PCR metodunda ise 78'ini şap virusu yönünden pozitif olarak tespit etmişlerdir (Reid ve ark 1998).

Paixão ve ark (2008), Brezilya'daki şap hastalığından ari olan bölgeden 200 ve hastalık salgınlarının görülmüş olduğu bölgelerden 260 adet olmak üzere, toplam 460 adet oral svap toplamışlar ve bu örnekleri virus izolasyonu amacıyla IBRS-2

hücre kültürüne inokule etmişlerdir. İnokulasyondan sonra kültürleri, 72 saat boyunca her 24 saatte bir CPE yönünden kontrol ederek, CPE oluşan kültürleri indirekt sandwich ELISA ile incelemişlerdir. Salgınların görüldüğü bölgelerden elde ettikleri örneklerin 3'ünü, RT-PCR metodu ile pozitif tespit etmişler ve bu pozitif tespit edilen 3 örneğin, sadece 2'sini virus izolasyon ve ELISA ile pozitif olarak belirlemişlerdir. Hastalıktan ari olan bölgelerden elde ettikleri 200 örneği, hem RT-PCR hem de virus izolasyon ve ELISA ile negatif olarak tespit etmişlerdir.

1.6.1.2. Komplement Fiksasyon Testi (CFT):

Uzun süre CFT, epitelyal örneklerden şap virusunun belirlenmesinde ve tiplendirilmesinde kullanılmıştır. Ancak CFT'nin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Duyarlılığının nispeten az olması, örneklerin pro ve anti kompleman aktivitelerini yorumlamada güçlükler göstermesi dezavantajları arasındadır. Bu dezavantajlar, antijen ELISA'nın gelişmesine öncülük etmiştir (Re'mond ve ark 2002).

Alonso ve ark (1992) tarafından yapılan bir çalışmada, şap hastalığından şüpheli 248 adet sığır epitelyal örneğini, CFT ve ELISA ile incelemişlerdir. CFT'inde 102 adet, polivalan antiserumlu ELISA metodunda ise 144 adet örneği pozitif olarak tespit etmişlerdir. BHK hücre kültürlerine 248 adet sığır epitelyal örneğin, inokülasyonu sonucu 179 örnekte spesifik CPE tespit etmişlerdir ve CPE tespit edilen 179 örneğin, tamamı polivalan antiserumlu ELISA ile tiplendirilirken, CFT ile 177 adet örneği tiplendirebilmişlerdir.

1.6.1.3. Antijen Belirlenmesi:

Ferris ve Dawson (1988), antijen ELISA ile şap virusunun serotiplerinin saptanabileceğini bildirmişlerdir (Clercq ve ark 2008). Antijen ELISA metodu ile 3-4 saat içerisinde şap virusunun serotip tayini yapılabilmektedir (Alexandersen 2003). Koyun sürülerinde ve düşük ekstrasyondaki virus ile aşılansmış sığırlarda, şap virusunun varlığının kontrolünün istatistiksel açıdan anlamlı olması için örnek sayısının çok olması gerekmektedir (Clercq ve ark 2008).

Dünya Referans Laboratuvarı tarafından yıllık yayınlanan verilere göre; Birleşik Krallık dışında kalan bölgelerde, pozitif tespit edilen örneklerin % 70-80'i antijen ELISA ile belirlenmektedir (Alexandersen 2003). Bazı Avrupa ülkesi

laboratuvarlarında antijen ELISA testi, sadece belli başlı şap virusu serotipleri (A/ O/ C ve Asia 1) ile sınırlandırılmıştır. Bu nedenle testin yanlış negatif sonuç verme riski bulunmaktadır. Bu riski ortadan kaldırmak için, ELISA yönteminde negatif sonuç veren örneklerin daha sonra yüksek duyarlılık gösteren hücre kültürleri ve RT-PCR ile incelenmesi gerekmektedir (Clercq ve ark 2008).

Nordengrahn ve ark (2007), şap hastalığından şüpheli 54 adet epitel örneğin, antijen ELISA ile 42'sini pozitif, 12'sini ise negatif tespit etmişlerdir. Aynı örnekleri, RT-PCR ile incelemişler ve antijen ELISA sonuçlarını doğrulamışlardır.

Antijen antikor arasındaki reaksiyonu temel alarak geliştirilen bir diğer testte Pen-Side testidir (Alexandersen 2003). Kromatografi teknolojisi ile geliştirilen bu test hızlı ve kolayca tekrar edilebilir olması ile şap virusuna karşı oluşan antikorların belirlenmesinde kullanılmaktadır (Clercq 2003).

Montassier ve ark (1994), yaptıkları bir çalışmada *Staphylococcus aureus*'un protein A yoluyla doğal olarak kobaylardaki şap virusu antikorlarına bağlandığını tespit etmişlerdir (Re'mond ve ark 2002). Protein A, *Staphylococcus aureus*'un hücre duvarında yer alan 42 kilodalton (kDa) olan bir proteindir (Go'mez ve ark 2006). Bu test Türkiye'deki saha örneklerinde başarı ile uygulanmış ve özefagus/farinksten alınan örneklerde yüksek sensitivite göstermiştir.

Reid ve ark, monoklonal antikoru renkli lateks partikülleri ile birleştirerek, kromatografik strip testte kullanmışlar ve laboratuvar çalışmalarında olumlu sonuçlar almışlardır. Bu test, epitelyal süspansiyonlar ile nazal svaplara, ELISA'dan daha yüksek sensitivite göstermiştir (Re'mond ve ark 2002).

1.6.1.4. Nükleik Asit Tanımlama Yöntemleri:

Yakın zamanda klinik örneklerden şap virusunun, viral RNA'sını tespit ederek, teşhis konulması amacıyla farklı RT-PCR metotları geliştirilmiştir. Günümüzde şap hastalığının teşhisinde kullanılan PCR yöntemleri; PCR-ELISA ve antijen capture RT-PCR'dır. PCR metodları hızlı, duyarlı ve spesifiktir (Baxi ve ark 2006).

Pirbright Laboratuvar'ında geliştirilen RT-PCR metodları, ELISA ve virus izolasyonu kombinasyonları kadar duyarlıdır ve örneğin geldiği gün kesin sonuç elde edilmesini sağlamaktadır (Alexandersen 2003). PCR metodunun sahip olduğu yüksek duyarlılık sayesinde oldukça küçük örneklerle çalışılabilmektedir. Spesifisite, hedef viral RNA bölümlerinin amplifiye olması ile daha da artabilmektedir (Re'mond ve ark 2002).

Bu metotlarda, viral RNA'nın belirlenmesi ve tiplendirilmesi için genel ve serotipe spesifik primerler kullanılmaktadır (Baxi ve ark 2006). Primer seçimi çok önemli olup seçilen primer hedefinde, şap virusunun bütün serotiplerinin ve alt tiplerinin yer alması gerekmektedir (Re'mond ve ark 2002).

Etkenin izolasyonu ve PCR'da başarılı bir amplifikasyon için sahadan elde edilen örneklerden, viral RNA'nın yeterli ekstraksiyonunun yapılması gerekmektedir. Özefagus/farinks sıvıları ve nasal salgı gibi örneklerden RNA ekstra edilmeden önce virusun, polietilen glikol presipitasyonu ile konsantre edilmesi gerekmektedir. Farklı ekstraksiyon metotları geliştirilmiştir. Numunenin kaynatılması ile RNA'nın virustan serbest kaldığı, yapılan ekstraksiyon testlerinde belirlenmiştir. Ayrıca plastik plâtelere, direkt viral süspansiyonla kaplanması ile virion yapısının plastiğe yapışma esnasında deformasyona uğrayarak RNA'nın açığa çıkmasının kolaylaşacağı düşünülmektedir (Re'mond ve ark 2002).

Bununla birlikte RT-PCR metotlarında, bütün serotiplerin multipleks biçimlerinin aynı anda amplifiye olmaması veya birçok viral patojenin aynı anda belirlenememesi, dezavantaj olarak kabul edilmektedir (Baxi ve ark 2006).

Persiste enfeksiyonların hücresel temelini açıklığa kavuşturmada, nükleik asit hibridizasyon testi kullanılmaktadır. Fakat RT-PCR ile karşılaştırıldığında düşük spesifisite ve sensitiviteye sahip olması yüzünden uzun süredir dikkate alınmamaktadır.

Reid ve ark (2002), şap hastalığından şüphelendikleri hayvanlardan 115 adet veziküler epitelyum süspansiyonu, 138 adet kan ve 20 adet süt örneği alarak bu numuneleri virus izolasyon ve RT-PCR metotları ile incelemişlerdir. 115 veziküler epitelyum süspansiyonunun 69'u virus izolasyonunda pozitif çıkarken, RT-PCR

yönteminde 64'ü pozitif, 5'i ise şüpheli tespit edilmiştir. Virus izolasyonunda 138 kan örneğinin 5'i pozitif iken RT-PCR yönteminde 4'ü pozitif bulunmuştur. Hem virus izolasyonu hem de RT-PCR metodunda, 20 süt örneğinin hepsi negatif olarak tespit edilmiştir.

1.6.2. Serolojik Testler:

Subklinik olarak enfekte hayvanların teşhisi, serolojik sürveyansla gerçekleştirilebilir (Ko ve ark 2009). Koyun ve keçi gibi şap hastalığının klinik belirtilerinin az veya hiç görülmediği hayvan türlerinde ortaya çıkan salgınların sürveyansları açısından, serolojik testler oldukça kullanışlıdır (Re'mond ve ark 2002). Şap hastalığının serolojisinde OIE tarafından tanımlanan uluslararası testler kullanılmaktadır.

1.6.2.1. Virus Nötralizasyon Testi (VNT):

Virus nötralizasyon testi, şap hastalığına karşı oluşan antikorları belirlemede kullanılan uluslararası bir testtir (Che'nard 2003). Bu testte enfeksiyon ve aşılama sonucu şap virusunun yapısal proteinlerine karşı oluşan antikorlar tespit edilir (Re'mond ve ark 2002). VNT'nin, 1/45 dilüsyonda spesifisitesi % 100'e ulaşabilmektedir (Alexandersen 2003).

Mackay ve ark (2001), şap hastalığından şüpheli sığırlardan elde ettikleri 85 adet serumu, şap virusunun A₂₂ serotipi yönünden LPB ELISA, SPC ELISA ve VNT metodlarıyla incelemişlerdir. LPB ELISA metodunda 48 adet, SPC ELISA metodunda 4 adet ve VNT metodunda 2 adet serumu, A₂₂ serotipi yönünden pozitif olarak tespit etmişlerdir. LPB ELISA metodunun spesifisitesi % 43,5 SPC ELISA metodunun spesifisitesi % 95,2 ve VNT metodunun spesifisitesinin % 97,6 olduğunu bildirmişlerdir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda; aşılı hayvanların, enfekte veya aşılama sonras enfeksiyöz virusla temas sonucu persiste enfekte olan hayvanlardan ayrılması gerektiği vurgulanmıştır (Re'mond ve ark 2002). Canlı bir virusla enfekte hayvanda, viral replikasyon sırasında ekspirese edilen yapısal olmayan proteinlere (başlıcaları proteazlar ve RNA polimeraz) karşı oluşan antikor yanıt, teorik olarak purifiye viral partikülle aşılanmış hayvanlarda oluşmamaktadır (Re'mond ve ark 2002, Cao ve ark

2007). Bu nedenle yapısal olmayan proteinler (NSP), enfekte hayvanların belirlenmesinde potansiyel antijenler olarak görülmektedir (Re'mond ve ark 2002). Bununla birlikte bazı şap virusu aşılı, NSP'leri içermektedirler. Bu aşılardaki NSP'ler, konsantrasyonlarına bağlı olarak saptanabilir düzeyde immün yanıtın oluşmasına neden olabilirler (O'Donnell ve ark 1996).

Virus nötralizasyon testi serotip spesifik bir testtir. Hücre kültürüne ihtiyaç duymaktadır ve 2-3 günde sonuç vermektedir (Re'mond ve ark 2002). VNT, biyogüvenlik seviyesi 3 olan laboratuvarlarda uygulanabilmektedir (Ko ve ark 2009). Az miktardaki serumla yapılan düşük titrelerde hatalı pozitif sonuç verdiği gözlenmiştir. Bu dezavantajlar göz önüne alınarak, şap virusuna karşı oluşan antikorların belirlenmesinde, ELISA yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır (Re'mond ve ark 2002).

1.6.2.2. Likit Faz Bloking ELISA (LPB ELISA):

Hamblin ve ark (1986), Dünya çapında birçok laboratuvarında rutin araştırma metodu olarak kullanılan LPB ELISA'yı geliştirmiştir (Hamblin ve ark 1986a). Yapılan çalışmalarda, testin sensitivitesinin % 100'e yakın, spesifitesinin ise % 95 olduğu belirlenmiştir (Alexandersen 2003).

Hamblin ve ark (1986), üç buzağıyı şap virusunun O₁ serotipi ile suni olarak aerosol yolla enfekte etmişlerdir. Enfekte edilen buzağılardan 14 gün boyunca serum örnekleri toplayarak, antikor düzeylerini LPB ELISA ve VNT ile kontrol etmişlerdir. İlk 5 günde düşük titredeki antikorunu, hem LPB ELISA hem de VNT metodları ile belirlemişlerdir. Buzağı serumlarındaki antikor titrelerini, LPB ELISA ile 5 günden sonra, VNT metodu ile ise 8-9 gün sonra pozitif olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir (Hamblin ve ark 1986b).

Yapılan çalışmalarda, virus nötralizasyon testinde olduğu gibi hatalı pozitif tepkilerin ortaya çıktığı ve testin tekrarlanabilir sonuçlara ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir (Re'mond ve ark 2002). Özellikle stres altındaki hayvanlarda yapılan testlerde hatalı pozitif oranının % 18'e kadar ulaştığı tespit edilmiştir (Mouchantat ve ark 2005). Bu nedenle LPB ELISA'da kullanılan poliklonal serumun yerini, monoklonal antikorlar almıştır.

Yetersiz sonuç veren örnekler, VNT ile kontrol edilmektedir. LPB ELISA'nın spesifisitesinin nispeten düşük olması ve muhtemelen birçok doğrulayıcı VNT'ye ihtiyaç duyulacak olması, büyük çaptaki araştırmalarda bu testi daha az tercih edilir yapmaktadır (Alexandersen 2003).

1.6.2.3. Solid Faz Kompetitif ELISA (SPC ELISA):

SPC ELISA, yakın zamanda geliştirilmiştir. Validasyon testleri SPC ELISA'nın, yüksek sensitivite ve spesifisiteye (% 99,8) sahip olduğunu göstermektedir. Bu metotla, deneysel olarak enfekte edilmiş bütün hayvanlar (sığır, koyun ve domuz) enfeksiyondan 5-8 gün sonrasında, birkaç ay sonrasına kadar belirlenebilmektedir (Alexandersen 2003).

Mackay ve ark (2001), şap hastalığından şüpheli sığırlardan elde ettikleri 85 adet serumu şap virusunun O₁ serotipi yönünden; SPC ELISA, LPB ELISA ve VNT metodlarıyla incelemiştir. SPC ELISA metodunda 3 adet, LPB ELISA metodunda 73 adet ve VNT metodunda 1 adet serumu, O₁ serotipi yönünden pozitif olarak belirlemiştir. Araştırma sonucunda, LPB ELISA metodunun spesifisitesini % 14,1 SPC ELISA metodunun spesifisitesini % 96,4 ve VNT metodunun spesifisitesini % 98,8 olarak tespit etmişlerdir.

1.6.3. Yapısal Olmayan Proteinlerin (NSP) Antikor Testleri:

Biyoteknolojik gelişmeler sayesinde şap virusunun, NSP'lerinin farklı prokaryotik ve ökaryotik vektörlerde, in vitro olarak ekspirese ettikleri büyük miktarlardaki ürünler, immunolojik testlerle belirlenebilmektedir. *Escherichia coli* ve Baculovirus vektörü kullanılan insekt hücresinde, füzyon proteini olarak bir dizi NSP ekspirese edilmiştir (Re'mond ve ark 2002). NSP antikor testlerinde, şap virusunun farklı 7 serotipinin antijenlerine ihtiyaç duyulmamaktadır. Testler sadece enfeksiyon için spesifiktir (Parida ve ark 2007).

Virusun enfeksiyon ile ilgili antijeni (VIA), şap virusunun replikasyonunda yer alan fakat yapısal olmayan bir antijendir. Bu antijen yapısal olmayan 3D proteinini içermektedir. VIA karşı oluşan antikor yaygın olarak Agar jel immunodiffüzyon testi (AGID) ile belirlenebilmektedir (O'Donnell ve ark 1996).

Bu testin dışında; lateks aglütinasyon, immunoelektro-transfer blot analizi, direkt ELISA ve likit faz bloking sandwich ELISA gibi farklı immunolojik testler, NSP antikör araştırmalarında kullanılmaktadır (Re'mond ve ark 2002, O'Donnell ve ark 1996).

Bergmann ve ark (1993), rekombinant DNA teknikleri ile *Escherichia coli*'den üretilen pürifiye NSP'leri kullandıkları immunoelektro-transfer blot analizinde, 3D proteini dışındaki diğer NSP'lerle, enfekte ve aşıllı hayvan serumlarının ayırt edilebileceğini bildirmişlerdir (Grubman ve Baxt 2004).

Enfekte ve aşıllı hayvanların ayırt edilmesinde, Leader proteaz (L proteini) ve 3ABC, NSP'leri de yaygın olarak araştırılmaktadır (Re'mond ve ark 2002).

O'Donnell ve ark (1996), hastalıktan ari ve şap salgınlarının bulunduğu bölgelerdeki sığırlardan elde ettikleri serum örnekleri ile ELISA-3D, ELISA-VIA ve AGID metodlarının şap hastalığının teşhisindeki spesifisite ve sensitivitelelerini karşılaştırmışlardır. Şap hastalığından ari olan bölgelerdeki sığırlardan elde ettikleri 101 serumu ELISA-3D, 215 serumu ELISA-VIA ve 219 serumu AGID metotları ile incelemişler ve hiçbir pozitif örnek tespit edilmediğini, testlerde % 100 spesifisite bulunduğunu bildirmişlerdir. Şap hastalığı salgını olan ve deneysel olarak enfekte edilmiş sığırlardan 5 gün sonra aldıkları; 111 serumun 101'ini, ELISA-3D metodu ile 69 serumun 59'unu, ELISA-VIA ve 69 serumun 54'ünü, AGID metodu ile pozitif olarak tespit etmişlerdir.

1.7. Ayırıcı Teşhis:

Şap hastalığını, klinik olarak veziküler stomatitisi, domuz veziküler stomatitisi ve veziküler ekzantem gibi veziküler hastalıklardan ayırmak güçtür. Evcil hayvanlarda görülen semptomlar; ayak çürüğü, travmatik stomatitisi, kimyasal ve termal yanıklarda görülen semptomlara benzemektedir. Sığırlarda oral lezyonlar; sığır vebası, infeksiyöz bovine rhinotracheitis, bovine viral diyare, malignant kataral fever ve epizootik hemorajik hastalıklardaki lezyonlara benzerlik göstermektedir. Koyunlardaki lezyonlar; mavidil, kontagiyöz ektima, dudak ve bacak ülserleri ile karışabilmektedir (Aftosa 2007).

1.8. İmmunoloji:

Enfeksiyonu takiben şap virusu, homolog serotip veya antijenik olarak yakın viruslara karşı oluşan enfeksiyondan koruyan, yaygın humoral ve hücrel yanıtın meydana gelmesine neden olur. Etkene karşı immunité öncelikle humoral olarak gerçekleşmektedir (Clavijo ve ark 2003).

Hastalıktan korunma çoğunlukla serumda indüklenen yüksek seviyedeki nötralizan antikor miktarı ile ilişkilidir. Viral opsonizasyonu takiben virus antikor komplekslerinin fagositozunun, in vivo viral temizlenmeye aracılık ettiği ileri sürülmektedir. Nötralizan antikorlar, viral kapside yerleşen B hücre epitoplari tarafından yönetilmektedir. Bu antikorlar, enfeksiyondan hemen sonra veya aşılamaı takiben kısa süre içerisinde tespit edilebilmektedir.

Enfeksiyon veya aşılamağan sonraki 3-4 gün içerisinde, ilk olarak IgM üretilmektedir (Sáiz ve ark 2002). Sığırlarda enfeksiyon sonrası IgM yanıtı 10-14'üncü günler arasında pik yapar ve daha sonra düşer (Sobrino ve ark 2001). IgG, 14'üncü günden itibaren majör nötralizan antikor olarak salınır. Genellikle IgG1 yanıtı, IgG2 yanıtından daha fazladır.

Enfeksiyonun ve aşılamanın erken dönemlerinde, üst solunum ve gastrointestinal sistem salgılarında, antikor yanıtı belirlenebilir (Sáiz ve ark 2002). Sekresyonlarda, ilk olarak IgM daha sonra IgA ve en sonunda da IgG'ler tespit edilmiştir (Sobrino ve ark 2001).

Enfeksiyon veya aşılama, spesifik T hücre yanıtını ortaya çıkarmaktadır. Sığır ve domuzlardaki B hücre aktivasyonu ve antikor üretimi, T hücreleri [özellikle Cluster of Designation 4 (CD4+)] aracılığı ile ortaya çıkan lenfoproliferatif yanıtla ilişkilidir. Bu yardımcı T hücreleri, viral epitoplari tanımakta ve kapsid ile yapısal olmayan proteinlere yerleşmektedirler. Ayrıca bu yardımcı T hücreleri, antiviral antikorların üretimine katılarak, şap hastalığından korunmada etkin bir immunité oluşmasını sağlamaktadır (Sáiz ve ark 2002).

Enfeksiyondan sonraki antikor yanıtı, aylarca devam edebilmekte ve birkaç yıl sonra bile tespit edilebilmektedir. Ama domuzlarda, özellikle hızla gelişen genç domuzlarda, antikorların bulunma süreleri yarılanmakta hatta 1 haftaya kadar

düşmekte ve sadece birkaç ay içerisinde belirlenebilir seviyelerde bulunmaktadır. İyileşen sığırlar, homolog virüslara karşı 3-4 ay bağışıklık kazanırlar. Bu dönemden sonra kısmi immünite ortaya çıkmaktadır.

Cunliffe (1964) 1 yıl önce iyileşmiş hayvanları kontrol etmiş, bu hayvanlarda inokulasyon yapılan bölgelerde lokal lezyonların geliştiğini, generalize enfeksiyonun gelişmediğini ve diğer hastalık belirtilerinin görülmediğini tespit etmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda immün yanıtın 4,5 yıla kadar devam edebileceği ortaya konmuştur. İmmünite oranının azalması; yaşa, beslenme seviyesine, fizyolojik duruma ve hayvan ırkına göre değişmektedir.

İyileşen hayvanlardan alınan tam kan veya serumla, enfekte olmayan sığırları pasif olarak bağışık kılmak mümkündür. Bu yöntemin, aşılama geçerli olmadan önce kullanıldığı bildirilmiştir (Mann ve Sellers 1990). Serum ve kan ile ilk bağışıklık denemelerini, 1897'de Siegel ve onu takiben şap virusunu izole eden Loeffler yapmıştır (Blancou 2002). Hastalığı atlatan veya bağışıklık kazanmış sığırların colostrumundaki antikorlar, kendilerini emen buzağılara geçerek, immün yanıtın hızlı bir şekilde gelişmesini sağlamaktadır (Mann ve Sellers 1990).

Pasif immünite yöntemi yaygın olarak Avrupa'da kullanılmıştır. Danimarka'da 1925 ve 1933 yılları arasında iyileşen hayvanlardan elde edilen 112 000 litre serum pasif immünite çalışmalarında kullanılmıştır. Fakat bu metod terk edilmiştir. Çünkü tehlikeli olabilmekte ve yeterince uzun süre bağışıklık sağlamamaktadır (Blancou 2002).

Aşılamalarla ilgili pozitif sonuçlar, ilk kez 1925 yılında Valle'e, Carre' ve Rinjard'ın in vivo elde edilmiş pürifiye virus ile yaptıkları çalışmalarla yayınlanmıştır (Blancou 2002). Aşılamaya bağlı oluşan immünite, doğal enfeksiyondan sonra gelişen immüniteden daha kısa sürmektedir. Deneysel çalışmalarda tek doz uygulanan inaktif aşının 3-6 ay süre ile koruma sağladığı belirlenmiştir. İmmünite süresini, aşı formülünde kullanılan adjuvant tipi etkilemektedir. Yakın geçmişte geliştirilen yağ emisyonaşılama, uzun süre koruma sağlamaktadır. En azından yılda bir kere düzenli aşılama, sürü bağışıklığının gelişmesi için gereklidir (Mann ve Sellers 1990).

1.9. Kontrol:

Şap hastalığının kontrolünün dayandığı iki ana strateji, enfekte ve taşıyıcı hayvanların kesimi ile şap virusuna duyarlı hayvanların düzenli aşılansdır (Domingo ve ark 2002). Hastalık insidensinin düşük olduğu ülkelerde kesim, diğer ülkelerde ise ekonomik ve sosyal şartlar göz önüne alınarak aşılama yöntemi kullanılmaktadır (Mann ve Sellers 1990). İki strateji birlikte kullanılarak da şap hastalığı kontrol edilebilmektedir. Enfekte ve taşıyıcı hayvanların kesiminin yapıldığı bölgelerde ring aşılama uygulanarak, hastalıktan korunma amaçlanmaktadır (Domingo ve ark 2002).

Yirminci yüzyılın başından itibaren şap hastalığı birçok ülkenin ilgisini çekmiştir. Salgınlardan endişelenen ülkeler, hastalığın kontrolünü araştırmak için enstitüler kurmuşlardır. Almanya'da 1909'da Insel Reims, Birleşik Krallık'da 1924'de Pirbright, Danimarka'da 1925'de Lindholm Island, Brezilya'da 1951'de Centro Panamericano de Fie'bre Afto'sa (PanAftosa) ve Amerika Birleşik Devletleri'nde 1953'de Plum Island Animal Disease Center Enstitüleri şap hastalığını araştırmak için kurulmuştur (Grubman ve Baxt 2004). Türkiye'de ise 1950'de Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde hastalığa karşı aşı üretimine başlanmış ve 1967 yılında Şap Enstitüsü kurulmuştur (Şap Enstitüsü 2009a).

Batı Avrupa'daki bazı ülkelerde 1950'lerin başlarında yılda 10 000 ile 100 000 arasında değişen sayılarda salgınlar ortaya çıkmıştır. Bu salgınlar hayvan hareketlerinin sınırlanması, enfekte hayvanların kesilmesi ve dezenfeksiyon yöntemleri ile kontrol edilmeye çalışılmıştır (Grubman ve Baxt 2004).

Şap virusu enfekte ve duyarlı hayvanlar arasında et, süt, semen, ovum, hava yoluyla, kontamine insanlar, evcil ve vahşi hayvanlar, kuşlar ve kullanılan araç gereçle direkt olarak yayılmaktadır. Hastalığının kontrolü için bu yayılma halkasının kırılması hedeflenmektedir. Yayılmayı engellemekteki amaç hayvanlar tarafından üretilen virus miktarını azaltmaktır (Mann ve Sellers 1990).

Çiftlik hayvanlarının hareketlerinin kontrolü en etkili önlemlerden biridir. Ette laktik asit üretimi, virusu etkili bir şekilde inaktive eder. pH değişimi olmayan

sakatat ve dokuların ısıtılması, sütün ısı ile muamele edilmesi virusun inaktive olmasını sağlar (Mann ve Sellers 1990). Düşük ısıdaki pastörizasyon (63-66°C'de 10 dakika) şap virusunu inaktive etmez. Yüksek sıcaklıkta kısa süreli pastörizasyon (75-85°C'de 15 saniye), sütte bulunan önemli miktardaki virusu yok eder. Enfekte inekten elde edilen süt, 100°C'de 20 dakika ısıtılarak inaktive edilebilir. İnsanların mekanik olarak kısa süre ile şap virusunu taşıdıkları ve yayılmasında rol oynadıkları düşünülmektedir. Bu yüzden enfekte çiftliklere insanların giriş çıkışı hastalığın yayılmasını engellemek amacıyla kısıtlanmalıdır (Mann ve Sellers 1990). Yapılan bir çalışmada; enfekte hayvanla bir arada bulunan sekiz kişiden birinin nazal pasajında, 28 saat sonra virus tespit edilmiştir. Fakat 48 saat sonra yapılan incelemede sekiz kişinin hiçbirinde etken tespit edilememiştir (Aftosa 2007).

Hayvanların taşınmasında kullanılan araç ve gereçler dezenfekte edilmelidir (Mann ve Sellers 1990). Sodyum hidroksit (% 2), sodyum karbonat (% 4), sitrik asit (% 0,2) ve Virkon-S etkili dezenfektanlardır. Özellikle organik materyallerin varlığında iyodoforlar, kuaterner amonyum bileşenleri, hipoklorit ve fenoller daha düşük etkili dezenfektanlardır.

Enfekte karkaslar yakma, rendering, gömme veya diğer tekniklerle güvenli bir şekilde imha edilmelidir. Rodent ve diğer vektörler öldürülerek, virusun mekanik olarak yayılmasının, enfeksiyonun görülmediği çiftliklerde iyi biyogüvenlik önlemleri uygulanarak, virus girişinin engellenebildiği bildirilmiştir (Aftosa 2007).

1.10. Aşılama:

Ondokuzuncu yüzyılın sonlarında, hayvanları enfektif şap virusuna karşı bağışık kılmak amacıyla aşı geliştirme çalışmaları başlamıştır. Fakat viral virulensin tahmin edilememesi ve birçok viral serotipin varlığından dolayı pratik bir aşı geliştirilememiştir (Rodriguez ve Grubman 2009).

Sabin tarafından attenüe polimiyelitis aşısı geliştirilmesinden sonra 1950 ve 1960 yılları arasında şap hastalığına karşı aşı geliştirme çalışmaları yoğunlaşmıştır. Temel yaklaşım; şap virusunun in vitro kültürlerde pasajlanarak hastalık oluşturmadan, immun yanıtı oluşturacak virus popülasyonunun seçilmesi olmuştur (Barteling 2002).

Aşılama şap virusunun yayılmasını önlemede, salgınlardan duyarlı hayvanların korunmasında ve endemik bölgelerde hayvanları klinik hastalıktan korumak için kullanılmaktadır. Şap virusu aşıları, enfeksiyon etkeninin serotipine ve alt tiplerine uygun olmak zorundadır. Bir serotipe karşı aşılama hayvanları diğer serotiplere veya diğer serotiplerin alt tiplerine karşı korumaz. Şu an, şap hastalığına karşı geniş kapsamlı koruyuculuk sağlayan bir aşı bulunmamaktadır (Aftosa 2007).

Klasik ticari aşılarda, aşılama ve korunma arasındaki süre 14 güne kadar çıkabilmektedir. Yeni jenerasyon şap aşıları hayvanları 12 aya kadar koruyabilmektedir. Fakat tam bir immunité gelişmemekte ve saha şap virusları, aşıli hayvanlarda çoğalabilmektedir. Geniş çaplı salgınlarn görüldüğü bölgelerde aşılama programları başarısız olabilmektedir. Araştırmacılar duyarlı hayvanların % 50 veya daha fazlasının aşılarnması halinde çiftlik hayvanı populusyonunun büyük bir epidemik şap hastalığına karşı korunacağını ileri sürmektedir (Davies 2002). Hastalığın aşı yolu ile kontrol çalışmaları birçok enzootik bölgede salgınlarn azaltılmasını sağlamıştır (Grubman ve Baxt 2004).

Klasik aşılar, persiste şap virusu ile enfekte sığırlarda koruma sağlayamaz. Taşıyıcılık durumunu minimize etmek için bir aşının hedefi sistemik ve mukozal immunité olmalıdır. Bazı şap hastalığı salgınlarnının aşı orjinli olduğuna dair önemli kanıtlar bulunmaktadır. Bu kanıtlar, aşının hazırlanması esnasında enfeksiyöz virusa gerek duyulmadığını göstermektedir.

Şap hastalığına karşı yeni bir aşı geliştirilirken aşının, yeterli düzeyde humoral ve hücresele immun yanıt oluşturacak multiple B hücresi ve T hücre epitoplarını içermesi gerekmektedir (Domingo ve ark 2002).

Yapılan bir çalışmada şap aşısı, immunité ve potens yönünden değerlendirilmiştir. Bu çalışmada koruyuculuk dozu (PD₅₀) minimum 3-7 PD₅₀ olarak belirlenmiştir (Mann ve Sellers 1990).

Aşılar monovalan, bivalan, trivalan ve polivalan olabilmektedir. Farklı serotip antijenleri arasında interferens bulunmaktadır. İlk aşılama ruminantlarda 3-6 ay arası bağışıklık sağlamaktadır. Daha sonraki aşılama sığırlarda bir yıla kadar koruma

sağlarken, bu süre koyunlarda 6 aya düşmektedir. Koyunlarda sığırlarda kullanılan aşı dozunun 1/3 kullanılmaktadır.

Enfeksiyonun çok riskli olduğu bölgelerde, ruminantlar yılda üç kere aşılanırken, orta riskli bölgelerde hayvanlar yılda 2 kere aşılanmaktadır. Enfeksiyon riskinin düşük olduğu ülkelerde ruminantlar ilk yıl 2 kez daha sonra ise yılda bir kere aşılanırlar. Sığırların tek aşılama ile tam olarak korunmadığı, tam korunmanın 3 üncü aşılamadan sonra şekillenmeye başladığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Tam korunma şekillenmeden önce virusun, farinks bölgesinde veya abrasyonlu deride lokal çoğalması gerçekleşebilir.

Maternal antikolar, 3-6 ay süre ile bağışıklığı interfere edebilir. Bununla birlikte, bu süreçteki korunma boşluğunu önlemek için 2-6 ay yaşları arasında değişen hayvanların aşılanması önerilmektedir.

Genellikle aşılama sığırlarla sınırlandırılmıştır. Örneğin Avrupa'da sığırların % 46'sı aşılanırken, koyunların % 3,42'si ve domuzların % 2,76'sı aşılanmıştır. Sığırlar, hastalıktan en çok etkilenenler olarak dikkate alınmaktadır. Süt veriminin ve besili hayvanların azalması ekonomik zararlara neden olmaktadır.

Aşılama, yağmurlu ve kuru sezonların bulunduğu bölgelerde kuru sezonun başlangıcında yapılmalıdır. Hayvanların hareketleri yağmurlu dönemlerde kısıtlanmalıdır.

Rekombinant DNA teknikleri ile yeni aşılar geliştirilmektedir. Bu aşılar güvenli ve stabildir. Fakat etkinlikleri, bağışıklık süreleri ve virus serotiplerine karşı immünolojik kabiliyetleri hala değerlendirilmektedir (Mann ve Sellers 1990).

Viral aşılar, immunojenitelerinin korunması için düşük derecedeki soğuk zincirde muhafaza edilmelidir. Düşük sıcaklıklarda muhafaza edilmeyen aşılar, aşılama programının başarısız olmasına neden olmaktadır.

1.10.1. İnaktif Aşılar:

Günümüzde kullanılan aşılar inaktif virus içermektedir (Mann ve Sellers 1990). İlk inaktif aşı Waldmann ve ark tarafından, 1937'li yıllarda deneysel olarak

enfekte sığır dilinden elde edilen veziküler sıvının formaldehit ile inaktive edilmesiyle geliştirilmiştir (Rodriguez ve Grubman 2009).

Frenkel 1940'ların sonunda, kesimhaneden elde ettiği taze sağlıklı sığır dil epitelyumlarını kullanarak, in vitro kültür sistemlerini geliştirmiştir (Barteling 2002). Frenkel'in sağlıklı olarak kesilen hayvanlardan elde edilen dil epitelyum kültürünü tanımlaması ile inaktif aşuların endüstriyel üretimi başlamıştır (Rodriguez ve Grubman 2009).

Frenkel aşı tipi ile çok başarılı sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen en büyük dezavantajının, kültür sırasında bakteri ve maya kontaminasyonunun önlenememesi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca substrat kaynağının belirsizliği (Bovine Spongiform Encephalopathy; BSE riski) iyi üretim uygulamalarının gerekliliklerini tam olarak karşılayamamıştır. Bununla birlikte Frenkel metodu, 1991 yılında bu aşıdan vazgeçilene kadar farklı Avrupa laboratuvarlarında üretilmeye devam edilmiştir. Mowat ve Chapman 1962 yılında, şap virusunun BHK hücre kültüründe etkili bir şekilde çoğaldığını belirlemişlerdir. Daha sonra bu hücreleri, süspanse kültürlere adapte etmişlerdir. Geliştirdikleri bu hücre kültür sistemleri, günümüzde kullanılmakta olan şap aşularının, üretim çalışmalarının temelini teşkil etmektedir. Çünkü bu sistemde, aşı için az miktarda enfektif doza ihtiyaç duyulmaktadır (Barteling 2002).

Günümüzde şap virusu, dil epitelyumunda (Frenkel Metodu), buzağı böbrek veya BHK21 hücrelerinin monolayerlerini içeren roller şişelerinde, BHK21 hücre süspanسیون kültürlerinde ve IBRS-2 hücreleri kültürlerinde üretilmektedir (Mann ve Sellers 1990).

İnaktif şap aşısı üretimi 1960'larda şap virusunun, BHK hücre süspanسیون kültürlerinde geliştirilmesi ve formaldehit ile şap virus antijeninin inaktivasyonu ile gerçekleşmekte idi (Rodriguez ve Grubman 2009). Formaldehit, uzun yıllar şap aşısı virusunun inaktivasyonunda kullanılmıştır. Fakat Avrupa'daki bazı şap hastalığı salgınlarının aşılama ile ilişkili olduğunun belirlenmesi ve bunun nedeni olarak da aşıdaki virusun tamamıyla inaktive edilememesinin gösterilmesi, formaldehitin inaktivasyondaki kullanımını tartışılır hale getirmiştir. Formaldehitin, inaktivasyon işleminin kinetiğinde göstermiş olduğu dezavantajlardan dolayı yerini azidrin

bileşikleri ve kısmen binary ethyleneimine (BEI) almıştır (Barteling 2002).

İnaktif virus aşısı üretiminde 3 kritik nokta vardır. İlki, yüksek düzeyde viral antijen üretilmesidir. Çünkü her bir aşı dozunun etkili olabilmesi için yüksek seviyede inaktif virus içermesi gerekmektedir (Mann ve Sellers 1990). İlk aşı üretim sistemlerinde antijen konsantrasyonu, aliminyum hidroksit jel adsorpsiyonu veya polietilen glikol presipitasyonu ile elde edilmekteydi. Günümüzde ise istenmeyen hücresel protein kontaminantların ve yapısal olmayan viral proteinlerin uzaklaştırılması için bu metotların yerini endüstriyel ultra-filtrasyon ve kromatografi yöntemleri almıştır (Rodriguez ve Grubman 2009).

İnaktif virus aşısı üretiminde ikinci önemli nokta, virusun inaktivasyon işlemi sırasında enfektivitenin kalmamasıdır. Bununla birlikte virusun yüzey proteinlerinin immunojenitesi korunmalıdır. Üçüncü olarak ise viral proteinlere karşı antikor yanıtını güçlendiren adjuvant aşıya eklenmelidir (Barteling 2002). Ayrıca alt tiplerin geniş bir bölümüne karşı koruyuculuk sağlaması gerekir (Mann ve Sellers 1990).

Sığırlarda 1970'lerden itibaren, klasik aliminyum hidroksit saponin aşılardan daha uzun süreli antikor yanıt oluşturan, yağ adjuvantlı şap aşıları kullanılmaya başlanmıştır (Sutmoller ve ark 2003). Yağ adjuvantlı aşılarda kullanılan sürülerin morbiditesinin, aliminyum hidroksit jel-saponin aşılardan daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Yağ adjuvantlı aşılarda en önemli dezavantajlarından biri granulom ve kist gibi istenmeyen yan etkilerin görülmesidir. Bu istenmeyen faktörler, çeşitli nedenlere bağlı olmakla birlikte kontamine yağ adjuvant bileşenlerinin bu yan etkilerin görülmesine neden olduğu düşünülmektedir. Adjuvant olarak kullanılan yağın düşük viskozitede olması ve hidro-karbon zincir uzunluğunun 12-30 atom uzunluğunda olması önerilmektedir. Düşük uzunluktaki hidro-karbon zincirinin inflamatuvar etki yaptığı tahmin edilmektedir (Iyer ve ark 2001).

Bugünkü inaktif aşılarda önemli eksikliklerinin, kısa raf ömrüne sahip olmaları, formalize aşılarda soğuk zincire ihtiyaç duyması, aşı üretimi için serotiplerin ve alt tiplerin hücre kültürlerinde geliştirilme zorluğu olduğu bildirilmektedir. Ayrıca birçok aşılardan sonra hayvanlarda görülen hücresel proteinlere karşı istenmeyen alerjik reaksiyonların engellenmesi, aynı zamanda kontrol programlarında enfekte ve aşılardan hayvanların birbirinden ayrılmasına

imkan sağlanması açısından daha ileri pürifiye aşı antijenlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Rodriguez ve Grubman 2009).

1.10.2. Moleküler Aşılar:

Araştırmacıların 1970'lerin ortalarında, virusun kapsid yapısı hakkındaki bilgileri daha da artmış ve kapsid proteinlerinden biri olan VP1 belirlenmiştir. Elde edilen yeni bilgiler ışığında inaktif aşılara alternatif olarak moleküler aşılarının geliştirilmesi için yeni stratejiler geliştirilmiştir. VP1, pürifiye virustan izole edilmiş ve domuzda nötralizan antikor yanıtının gelişmesine neden olmuştur (Rodriguez ve Grubman 2009).

Rekombinant DNA teknolojisi sayesinde *Escherichia coli*'de üretilen VP1'in hem sığırlarda hemde domuzlarda koruma sağladığı görülmüştür. Daha sonraki çalışmalarda da VP1 proteininin, nötralizan antikor yanıtını teşvik ettiği ve farklı virus türlerinde, VP1 protein kısımlarının farklılıklar gösterdiği ortaya konmuştur. Farklılık gösteren kısımların şap virusunun kapsidindeki G-H düğümleri, VP1'in karboksil uç kısmı ve B hücre epitoplari ile ilgili kısımlar olduğu belirlenmiştir. Bittle ve ark (1982) bu kısımlara karşı sentezledikleri peptidlerin, sığırlarda yüksek oranda nötralizan antikor oluşumuna neden olduğunu tespit etmişlerdir (Rodriguez ve Grubman 2009).

Peptid içerikli sentetik aşilar klasik yöntemlere göre stabilite, elverişlilik, güvenlik, saflık ve maliyet konusunda önemli avantajlar sağlamaktadır. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda, sentetik aşılardaki virus antijen immunojenitesinin klasik aşılara oranla doğal konaklarda daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Alexandra ve Gomes 2000).

Günümüzdeki aşı çalışmalarında rekombinant viruslar, transgenik VP1 ve şap virusunun kapsid proteinlerinin P1 öncü polipeptidi kullanılmaktadır. Farklı peptid aşılari, antijenite ve immunojenite yönünden karşılaştırılması, peptid sunumunun ve yerleşiminin önemli olduğunu göstermiştir (Gomes ve Alexandra 2000).

1.10.3. Boş Kapsid Aşilari:

Araştırmacılar 1980 yılı sonlarındaki çalışmalarında, viral nükleik asit

içermeyen kapsidin (boş kapsid) subgenomik cDNA (complementary DNA)'dan türemiş RNA transkriptlerinden üretilebileceğini tespit etmişlerdir. Bu buluş rekombinant aşı üretimine kısmen ilgi uyandırmış, protein ve peptid aşılara alternatif bir yaklaşım doğurmuştur. Bu yaklaşım, sağlam virus partikülündeki immünojenik bölümleri içeren immünojenlerin geliştirilmesine dayanmaktadır. Boş viral kapsidler, enfekte hücrelerde doğal olarak üretilen, nükleik asitten yoksun ve virionlar kadar immünojenik virus partikülleridir. Birkaç plazmid grubu kapsid ve 3C proteaz (3Cpro) kodlama bölümlerini içermektedir. Yapılan çalışmalar korunma için 3Cpro'nun gerekli olduğunu ortaya koymuştur (Beard ve ark 1999, Rodriguez ve Grubman 2009).

Boş kapsidlerin üretilmesi ile elde edilmiş serumun, yüksek oranda virus partikülü içeren serumdan ayırt edilememesinden dolayı, farklı araştırmacılar virus genomunun bir kısmını içeren cDNA'yı kullanarak, in vitro şartlarda boş virus partikülünün üretilmesi için rekombinant DNA sistemlerini geliştirmişlerdir (Beard ve ark 1999).

Li ve ark, Baculovirus-ipekböceği ekspresyon sistemi ile enfekte ipekböceği hemolenfi inoküle edilen 5 sığırdan 4'ünün hastalıktan korunduğunu tespit etmişlerdir (Rodriguez ve Grubman 2009).

Bununla birlikte bu in vitro sistemlerde kullanılan bütün hücre tipleri için gerekli olan proteinazın, toksik etkisinden dolayı büyük miktarlarda antijen elde edilememiştir (Beard ve ark 1999).

1.10.4. Canlı Attenué Aşılar:

Bu aşılar, laboratuvar hayvanlarından veya hücre kültürlerinden elde edilen attenué fenotip gösteren virusların kullanılması ile elde edilmektedir. Çok zayıflatılmış viruslar tutarlı bir şekilde immun yanıtı teşvik etmektedir. Bununla birlikte attenuasyon mekanizması tam olarak ortaya konamadığı için inaktif aşılar kadar tutarlı koruyucu immun yanıt elde edilememektedir. Bu sorunlarla birlikte mutasyon veya sahadaki viruslarla rekombinasyon sonucu virulensin eski haline dönme endişesinden dolayı canlı şap aşıları uzun yıllardır kullanılmamaktadır. Virulensin viral belirleyicisi olan Leader Protein (Lpro)'in keşfedilmesi önemli

dönüm noktası olmuştur. Bu yapısal olmayan protein bütün şap virusu serotiplerinde bulunmaktadır ve konak doğal yanıtını modüle etmektedir. Genetik olarak düzenlenen Lpro kodlama kısmından yoksun A12 şap virusu serotipinin (A12-LLV2), attenué edilmesi ile kısmen koruyucu immun yanıt oluşturduğu tespit edilmiştir. A12-LLV2 kullanılarak hazırlanan inaktif antijen aşısı, A12'nin saha süşunun meydana getirdiğine benzer tam bir koruma meydana getirmiştir. Bu seri çalışmalar, şap virusu genetik virulens determinantının daha iyi anlaşılmasına ve attenué şap aşısının şekillendirilmesinde faydalı olmaktadır. Yeni bir virulens determinant belirlendiğinde attenué aşının daha etkili olma olasılığı artacaktır. Yapılan aşı çalışmaları sonucunda, duyarlı türlerde tam bir attenuasyon ve virulensin eski haline dönme olasılığının düşürülmesi için virus, konak ilişkisinin ve patogenezi mekanizmasının ayrıntılı olarak bilinmesi gerektiği ortaya konmuştur (Rodriguez ve Grubman 2009).

1.10.5. DNA Aşıları:

Çıplak DNA ile aşılama, humoral ve hücresele immun yanıtı ortaya çıkararak, farklı patojenlere karşı koruma sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda domuzlarda, şap virusunun attenué tam boy enfeksiyöz klonunu içeren DNA aşılarının, koruma sağladığı bildirilmiştir. Bu attenué virusda, L geni ve RGD (arginin, glisin, aspartik asit) reseptör bağlanma yeri silinmiştir. DNA aşısı ile aşılanan farede nötralizan antikor yanıtı gözlenmiştir. DNA aşılarının etkisinin, koruyucu bağışıklıkla ilgili olan şap virusu immunojenlerinin ve sitokinlerin ko-ekspirasyonuna bağlı olabileceği bildirilmiştir (Sobrin ve ark 2001).

1.10.6. Acil Durum Aşıları:

Son yirmi yıldır şap hastalığından arı ülkeler, salgın olasılığına karşı aşı rezervleri geliştirmektedir. Bu ülkeler öncelikle hastalığın kontrolü için kesim, hareketlerin sınırlandırılması ve hijyen tedbirlerini uygulamaktadır. Yaygın salgınlarda ise hastalığın kontrolü için destekleyici yöntem olarak aşılama kullanılmaktadır. Aşı bankaları her 12-18 ayda bir değişen aşılar geliştirmektedirler. Bu aşı bankalarına; Kuzey Amerika Aşı Bankası, Uluslar arası Aşı Bankası ve Avrupa Birliği Aşı Bankası örnek verilebilir. Geleneksel şap aşılardan farklı olarak acil durum aşılarının yüksek potansi bulunmaktadır (Koruyucu Doz ≥ 6 PD50). Ayrıca hızlı

koruyucu bağışıklık ve daha iyi çapraz spesifite sunmaktadır. Yüksek potens, her bir dozdaki antijen miktarının artırılması ile sağlanmaktadır. Acil durum aşılarının, hedef türlerde yağlı ve sulu aşı formülasyonlarına göre 4 gün içinde daha hızlı ve koruyucu bağışıklık sağladığı yapılan araştırmalarda kanıtlanmıştır. Bu tip aşılar duyarlı hayvanlar arasında hastalığın yayılışını kısıtlayarak orofarenksdeki virus replikasyonu azalmaktadır. Yakın geçmişte yağlı yüksek potensli aşılar kullanılan çalışmalarda koyunlarda tek bir aşılamadan sonra geleneksel aşı formülasyonuna göre daha uzun süreli ve yüksek seviyede antikor seviyesinin oluştuğu gözlenmiştir (Sobrin ve ark 2001).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kan Serumları

Şap aşılmasını takiben şap virusunun yapısal proteinlerine karşı oluşan antikor düzeylerinin belirlenmesi amacıyla Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki Ordu, Giresun, Trabzon, Rize ve Artvin İllerindeki büyükbaş hayvanlar yaş (0-11 Ay, 12-35 Ay, 36 ve 36 Ay üstü) ve cinsiyete göre (dişi-erkek) 6 gruba ayrıldı.

Şap Enstitüsü tarafından üretilen, yağ adjuvantlı bivalan şap aşısı (O1 Manisa, A22 Irak virus suşlarını içeren) ile aşılanmış sığırlardan aşılamayı takiben 21-30 uncu günler arasında, her yaş ve cinsiyet grubundan rastgele olmak üzere 7'şer kan örneği toplanarak, toplam 210 kan örneği elde edildi. Normal tüplere alınan kan örnekleri 3 000 - 4 000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edildikten sonra serum kısımları, serum saklama tüplerine aktarılarak -25°C'de muhafaza edildi.

Araştırmaya başlamadan önce Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay (Karar Tarihi: 27.11.2008 ve Karar Sayısı: 2008/081) alınmıştır. (Bkz. EK-A)

2.2. ELISA Pleytleri

Testlerde immunoabsorbans özelliğe sahip düz tabanlı 96 gözlü mikropleytler ve U tabanlı 96 gözlü taşıyıcı mikropleytler kullanıldı.

2.3. Yakalayıcı Antikor

Şap virusu 146S antijenin tavşanlara enjeksiyonu ile elde edilen anti-serumdur. Antijen-antikor kompleksinin pleyte tutunmasını sağlamak amacıyla ELISA pleytlerinin kaplanması şap virusu O ve A serotipi yakalayıcı antikorları kullanıldı. Kullanılan anti-serumlar İngiltere Pirbright laboratuvarın'dan temin edildi.

2.4. Kontrol Antijenleri

Hücre kültürü orjinli, presipite ve santrifüj işlemi yapılmış konsantre şap virusu O ve A serotipi antijenleri testte kontrol antijeni olarak kullanıldı. Kontrol antijenleri, Şap Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edildi.

2.5. Kontrol Serumları

Şap virusu O ve A serotiplerine karşı uygun inhibisyon değerleri ölçüsünde içerdikleri antikor oranına göre kuvvetli pozitif antikor, zayıf kuvvetli pozitif antikor ve negatif antikor olarak sınıflandırılmış referans serumlar kullanıldı. Bu referans serumlar, Pirbright Laboratuvarın'dan temin edildi.

2.6. Tespit Edici Antikor (Kobay Anti-Serumu)

Şap virusu 146S antijenin kobaylara enjeksiyonu ile elde edilen anti-serumdur. Pleyte ilave edilen antijen-antikor kompleksini tanımlamak için şap virusu O ve A serotipi tespit edici antikorları kullanıldı. Kullanılan tespit edici antikorlar, Pirbright Laboratuvarın'dan temin edildi.

2.7. Anti-tür Konjugat

Tavşan immunoglobulinlerinin, horseradish peroksidaz enzimi ile birleştirilmesi sonucu elde edilmiştir. İndikatör olarak kullanılan konjugat, Pirbright Laboratuvarın'dan temin edildi.

2.8. Kaplama Solüsyonu

Sodyum karbonat/Sodyum bikarbonat hazır tableti kaplama solüsyonu hazırlamak için kullanıldı. 100 ml deiyonize suya 1 tablet olacak şekilde, 1 000 ml deiyonize su içinde 10 tablet çözüldü. Hazırlanan solüsyonun pH'sı 9,6 olarak ayarlandı.

2.9. Phosphate Buffered Saline (PBS)

1 poşet PBS tozu (Sigma), 1 litre deiyonize suda 0,01 M ve pH 7,4 olacak şekilde hazırlandı.

2.10. ELISA diluent (PBS-Tween)

1 000 ml. 0,01 M PBS içine % 0,05 oranında Tween 20 ve 250 µl fenol red eklenerek, iyice karıştırılarak hazırlandı.

2.11. Bloklama Solüsyonu

Şap virusu negatif antikoru olan tavşan serumundan 100 ml alındı. Üzerine 200 ml şap virusu negatif antikoru olan sığır serumu ilave edildi. Hazırlanan karışıma 1 ml Tween 20 ve 40 ml % 2 fenol red eklendi. 0,01 M PBS ile hazırlanan solüsyon 2 000 ml'e tamamlandı.

2.12. Substrat

Hidrojen peroksit tablet (Merck 107201) kullanıldı. Orthophenilaminediaminini (OPD) aktive etmek için 1/2000 dilüsyon oranında hidrojen peroksit, OPD'ye ilave edildi.

2.13. Kromojen

Orthophenilaminediamine (OPD) tabletleri (Sigma P-8412, 30 mg) kullanıldı. Bir OPD tableti 60 ml citrate-phosphate buffer içerisinde çözdürüldü.

2.14. Stop Solüsyonu

Enzim, kromojen reaksiyonunun durdurulması için % 98 oranında saf 1,25 M sülfirik asit kullanıldı. Bunun için 1 litre saf suya 68 ml sülfirik asit ilave edildi.

2.15. ELISA Pleyt Yıkama Sıvısı

Bir kısım 0,01 M PBS, 4 kısım distile su içine eklenerek ELISA pleytlerinin yıkanması amacıyla kullanıldı.

2.16. Likit Faz Bloking ELISA (LPB ELISA)

Test, Hamblin ve ark (1986) ile OIE (2009) tarafından belirlenen likit faz bloking ELISA yöntemine göre yapıldı. LPB ELISA, indirekt sıvı fazlı bloking esaslı bir ELISA metodudur. Şap virusu antijeninin sıvı ortamda, serum içinde bulunan antikolar tarafından spesifik olarak bloke edilmesi esasına dayanır.

Sıvı ortamda test serumları içerisinde bulunan şap virusuna karşı oluşmuş olan antikolar, bu ortama optimal dilüsyonunda ilave edilen şap viruslarını bloke eder ve oluşan bu antijen-antikor kompleksi, tavşan anti-serumları (yakalayıcı

antikor) ile kaplanmış absorban özelliği olan Nunc ELISA pleytlerine tutunur. Şap virusu üzerinde test serumları tarafından tutunmayan reseptörler, ilave edilen kobay anti-serumları (tespit edici anti-serum) tarafından tanınır ve bağlanır. Bu bağlanmalar, enzimle işaretli antikor olan konjugat ile belirlendi. Oluşan bu reaksiyon kromojen-substrat ile renk oluşumu sağlanarak ortaya çıkartıldı. Konjugat ve kromojen-substrat arasındaki reaksiyon H_2SO_4 ilave edilerek durduruldu. Pleytler spektrofotometrede okunarak sonuçlar değerlendirildi.

2.16.1. Immunoabsorbans Test Pleytlerinin Kaplanması

Serumlar, O ve A serotipleri için ayrı ayrı çalışılacağından gerekli immunoabsorbans özelliğe sahip NUNC maxisorb mikropleyt sayısı belirlendi. ELISA pleytlerinin sol alt köşesine numara ve serotipleri yazıldı. Hazırlanan kaplama solüsyonunun içerisine 1/5 000 optimal dilüsyonda, her bir tip için tip spesifik olarak O1 Manisa ve A22 Irak tavşan anti-serumu ilave edildi. Uygun çok kanallı pipet yardımıyla serotip spesifik olarak tavşan anti-serumu her bir göz için 50 µl hacimde olacak şekilde her bir pleytin tüm gözlerine aktarıldı. Pleytlerin üzeri pleyt bandı ile kapatıldı. Pleytler, tavşan anti-serumlarında bulunan antikorların pleyte absorbe olması için +4°C’de bir gece inkubasyona bırakıldı.

2.16.2. Taşıyıcı Pleytlerde Test Serumlarının Dilusyonu

OIE ve Şap Enstitüsü Müdürlüğü’nün, LPB ELISA prosedürüne göre kan serumlarının dilusyonu gerçekleştirildi. Aşılamaı takiben şap virusunun yapısal proteinlerine karşı oluşan antikor düzeylerinin belirlenmesi için hayvanlardan alınan kan serumlarının 1/16 başlangıç dilusyonundan başlayarak 1/128 dilusyon basamağına kadar 4 basamaklı log2 tabanına göre katlamalı dilusyonu yapıldı. Virus ilavesinden sonra final dilusyon 1/32 başlangıç dilusyonu ile başlayıp, 1/256 dilusyon basamağı ile sonlandırıldı.

Bu dilusyon işlemi 2 aşamada yapıldı. İlk aşamada U tabanlı taşıyıcı pleytlerde serumların 1/8 dilusyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla tek kanallı pipet ile birinci serumdan 25 µl, pleytin A 1-2 gözlerine (her bir serum iki göze) kondu. Sırasıyla ikinci serum A 3-4; üçüncü serum A 5-6; dördüncü serum A 7-8; beşinci serum A 9-10; altıncı serum B 1-2 gözlere aynı miktarda göz atlamadan kondu. Bu

işleme, test edilecek serumlar bitinceye kadar devam edildi. Pleytin A/H 11-12 gözleri kontrol serumları için boş bırakıldı. Serumların taşıyıcı pleyte konma işlemi sonrası serumların bulunduğu tüm gözler çok kanallı pipet kullanılarak 175 µl PBS-Tween (ELISA diluent) ilave edildi. Böylece serumların 1/8 dilusyonu yapılmış oldu.

İkinci aşamada ise test edilecek serum örneği sayısı kadar U tabanlı pleyt sayısı hesaplanarak, pleytlerin kontrol gözleri hariç (A/H 11-12) tüm gözlerine (A/H 1-10) 50 µl PBS-Tween kondu. Çok kanallı pipetle birinci aşamada hazırlanmış olan 1/8'lik test serumu sulandırmasının bulunduğu taşıyıcı pleytin ilk sırasındaki (A 1-10 gözlerindeki) ilk beş serum sulandırması, O ve A serotipleri için hazırlanmış olan ve gözlerinde 50 µl PBS-Tween bulunan, U tabanlı ikinci taşıyıcı pleytlerin ilk sırasına (A 1-10 gözlerine) 50µl aktarıldı. Bu işlem her bir serotip için ayrı ayrı yapıldı. Böylece ilk sıradaki (A 1-10) gözlerde 100µl miktarında 1/16'lık serum dilusyonu hazırlanmış oldu. İlk sırada en az 8 defa pipetleme yapıldıktan sonra 50µl alındı ve ikinci sıraya (B 1-10 gözlerine) aktarıldı. Her bir defasında bir alt sıraya olmak kaydıyla bu aktarma işlemi 4 dilusyon tekniğinde pleytin D sırasına kadar devam edilerek, serumun 4 basamaklı log₂ tabanına göre katlamalı dilusyonu yapılmış oldu.

Daha sonra birinci aşamada kullanılan taşıyıcı pleytin B 1-10 sırasındaki 1/8'lik serumların sulandırılmalarından, 50 µl alınarak ikinci aşamadaki taşıyıcı pleytin E 1-10 sırasına aktarıldı ve birinci işlemde olduğu gibi aşağıya doğru sulandırma işlemi tamamlandı. Dilusyon işlemi tamamlandıktan sonra, kontrol gözlerine kontrol serumlarının konması işlemi yapıldı.

2.16.3. Kontrol Serumlarının İlavesi

Kontrol serumu olarak şap virusunun, O ve A serotiplerinin kuvvetli pozitif, zayıf pozitif ve negatif serumları kullanıldı. Kontrol serumları, U tabanlı taşıyıcı pleytlerin kontrol gözlerine konulmadan önce ayrı tüplerde tip spesifik olarak PBS-Tween içerisinde 1/16 sulandırması yapıldı. Hazırlanan kontrol serum sulandırılmalarından pleytteki kontrol gözlerine 50 µl kondu. Kuvvetli Pozitif serum A/B 11-12; Zayıf Pozitif Serum C/D 11-12 ve Negatif Kontrol serumu ise E/F 11-12 gözlerine kondu. G/H 11-12 gözleri ise antijen kontrol gözleri olarak ayrıldı ve sadece her bir göze 50 µl miktarında PBS-Tween kondu.

Her bir pleyte 10 örnek													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/16	A	S	1	S	2	S	3	S	4	S	5	Kuvvetli Pozitif	
1/32	B												
1/64	C												
1/128	D												
1/16	E	S	6	S	7	S	8	S	9	S	10	Negatif Kontrol	
1/32	F												
1/64	G												
1/128	H												

Şekil 2.1. Serum örneklerinin sulandırılması ve kontrol serumlarının ilavesi (Şap Enstitüsü 2009b).

2.16.4. Virusun Dilusyonu

O1 Manisa ve A22 Irak serotipleri için gerekli immunoabsorbans özelliğe sahip NUNC maxisorb mikropleyt sayısı belirlendi. ELISA pleytlerinin sol alt köşesine numara ve serotipleri yazıldı. Tip spesifik tavşan anti-serumlarının 1/5 000 optimal dilusyonu ile hazırlanan kaplama solüsyonundan pleytin her bir gözüne 50 µl hacimde ilave edilerek pleytin tüm gözleri kaplandı. Kaplanan pleytler +4°C'de bir gece inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrası pleytler kontrol edilerek her pleyt PBS yıkama sıvısı ile 3 defa yıkanarak, kurutuldu.

Yıkayıp kurutma işlemi yapılan pleytlerin tüm gözlerine çok kanallı pipet yardımıyla 50 µl PBS-Tween kondu. Her bir virus numunesinden tek kanallı pipetle iki göz olmak kaydıyla 50 µl, A 1-2; A 3-4 şeklinde sırasıyla kondu. Böylece virus numunelerinin 1/2 dilusyonları yapılmış oldu. Çok kanallı pipet ile pipetleme yapılarak karıştırma işleminden sonra A sırasındaki 1/2'lik virus dilusyonlarından 50 µl, B sırasındaki 50 µl PBS-Tween bulunan gözlere aktarıldı. A sırasından B sırasına aktarma işleminde olduğu gibi pipetleme yaparak ve her defasında 50 µl virus, PBS-Tween karışımı bir alt sıraya aktararak bu işlem H sırasına kadar devam ettirildi. Böylece virus numunesinin 1/2 den başlayarak log2 tabanına göre 1/256'ya kadar katlamalı dilusyonu yapılmış oldu.

2.16.5. Virus (Antijen) İlavesi

Sulandırması yapılan test ve kontrol serumlarının içinde bulunan antikörlerin, antikor-antijen kompleksi oluşturabilmeleri için U tabanlı taşıyıcı pleytlerin kontrol

gözleri dahil tüm gözlerine PBS-tween ile sulandırılmış 50 µl virus ilave edildi. Daha önce 1/16 oranında sulandırılmış olan test ve kontrol serumları üzerine eşit miktarda virus ilave edilince 1/32 başlangıç final dilusyonu sağlanmış oldu. Daha sonra U tabanlı taşıyıcı pleytlerin üzeri pleyt bandı ile kapatıldı. +4°C'de shaker ile çalkalanarak bir gece nötralizasyon işlemi için inkubasyona bırakıldı.

2.16.6. İmmunoabsorbans ELISA Pleytlerinin Yıkama

Kaplama işlemi için +4°C'de inkubasyona bırakılan düz tabanlı immunoabsorbans ELISA pleytler inkubatörden çıkartılarak pleyt tabanlarında kuruma olup olmadığı kontrol edilerek, ELISA pleyt yıkama cihazıyla her pleyt PBS yıkama sıvısı ile 3 defa yıkandı. Yıkama esnasında her göze en az 300 µl yıkama sıvısının dolmuş olduğuna dikkat edildi. Yıkanan pleytler gözlerinde solüsyon kalmamasına dikkat edilerek, kurutuldu.

2.16.7. Antijen-Antikor Kompleksi Bulunan U tabanlı Taşıyıcı Pleyt İçeriğinin ELISA İmmunoabsorbans Test Pleytlere Aktarılması

Bir gece boyunca +4°C'de nötralizasyona bırakılan U tabanlı taşıyıcı pleytler inkubatörden çıkartılarak çok kanallı pipet ile U tabanlı pleytlerde bulunan test serumu-virus karışımından 50 µl içerik, yıkanıp kurutulan ELISA pleytlerinin eşdeğer gözlerine aktarıldı. Aktarma işlemi dilusyon basamağının tersi istikametinde yani düşük sulandırmalardan yoğununa doğru yapıldı. U tabanlı pleytlerdeki en düşük yoğunluktaki dilusyon basamağı sırasındaki D 1-10 sırasından, en az 8 defa pipetleme yapıldıktan sonra 50 µl alındı ve ELISA pleytinin aynı sırasına aktarıldı. A 1-10 sırasına kadar bir sonraki basamaktan her defasında pipetlenerek 50 µl solüsyon alınarak, eş gözlere aktarıldı. Test serumlarının aktarılması tamamlanınca, kontrol gözlerinin aktarılması yapıldı. U tabanlı pleytlerde bulunan kontrol gözleri içeriğinden 50 µl, ELISA pleytlerinin aynı eşdeğer gözlerine aktarıldı.

Tüm pleytler için aktarılma işlemi tamamlandıktan sonra, pleytlerin üzeri pleyt bandı ile kapatılıp, +37°C'de shakerlı etüvde 1 saat inkubasyona bırakıldı.

2.16.8. Tespit Edici Kobay Anti-Serumlarının İlavesi

İnkübasyona bırakılan pleytler etüvden çıkartılarak pleyt tabanlarında kuruma

olup olmadığı kontrol edildi. ELISA pleyt yıkama cihazıyla her pleyt, PBS yıkama sıvısı ile 3 defa yıkandı. Hazırlanan 100 ml bloklama solüsyonu içerisinde, kobay anti-serumlarının tip spesifik olarak O ve A serotipleri için ayrı ayrı 1/1 000 optimal dilusyonu yapıldı. Hazırlanan dilusyondan, pleytlerin her bir gözüne 50 µl hacminde ilave edildi. Pleytlerin üzeri pleyt bandı ile kapatılarak, pleytler +37°C’de rutubetli ortamı olan shakerlı etüvde 1 saat inkubasyona bırakıldı.

2.16.9. Konjugatın İlavesi

İnkubasyon periyodunun bitiminde ELISA pleyt yıkama cihazıyla her pleyt, PBS yıkama sıvısı ile 3 defa yıkandı. Hazırlanan 100 ml bloklama solüsyonunda konjugatın 1/2 000 optimal dilusyonu yapılarak pleytlerin her bir gözüne 50 µl hacminde ilave edildi. Konjugat tip spesifik olmadığından tüm pleytlere (O ve A serotipleri) aynı konjugat dilusyonu ilave edildi. Pleytlerin üzeri pleyt bandı ile kapatılarak, pleytler +37°C’de rutubetli ortamı olan shakerlı etüvde 1 saat inkubasyona bırakıldı.

2.16.10. Kromojen-Substratın İlavesi

İnkubasyon periyodunun bitiminde, ELISA pleyt yıkama cihazıyla, her pleyt PBS yıkama sıvısı ile 3 defa yıkandı. 100 ml OPD hazırlandı. OPD’yi aktive etmek için 1/2 000 optimal dilusyon oranında Hidrojen Peroksit (H₂O₂) OPD’ye ilave edildi. H₂O₂ ilave edilir edilmez pleytlerin tüm gözlerine 50 µl hacminde OPD ilave edilerek pleytlerin üzeri pleyt bandı ile kapatılıp, karanlık bir ortamda 15 dakika inkubasyona bırakıldı.

2.16.11. Reaksiyonun Durdurulması

İnkubasyon sonrası reaksiyonun durdurulması için sülfirik asit (1,25 M H₂SO₄) stoping solüsyonu olarak tüm gözlere 50 µl ilave edildi.

2.16.12. Pleytlerin Spektrofotometre ile Okunması

Pleytler, Softmax Pro-312ex programı (Molecular Devices 2006) kullanılarak spektrofotometre ile 492 nm dalga boyunda okundu ve optik dansiteleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar excel dosyası üzerinden veri dönüşüm sihirbazı kullanılarak

aritmetik sayı değerlerine dönüştürüldü. OD verilerinin aritmetik sayı değerleri ile test sonuçları değerlendirildi.

2.16.13. Sonuçların Değerlendirilmesi

Serumların titrelerinin hesaplanabilmesi için, test sonucunda elde edilen OD değerlerinin % inhibisyon değerleri hesaplandı.

% İnhibisyon değeri hesaplanması için; “ % İnhibisyon Değeri = 100 - (Test Serumları OD / Ortalama Antijen Kontrol OD) x 100 ” formülü kullanıldı. Ortalama antijen kontrol OD değeri ise antijen kontrol gözlerindeki (G/H 11-12) OD değerlerinin toplanıp, dörde bölünmesi ile hesaplandı. OD değerlerinden % inhibisyon değerleri hesaplandıktan sonra, serum titreleri belirlendi. % 50 ve üzeri inhibisyon veren değerler pozitif olarak kabul edildi (Hamblin ve ark 1986a).

Çizelge 2.1. LPB ELISA testi sonucu elde edilen bir pleytteki serumların OD değerleri.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,1011	0,0536	0,0943	0,0492	0,3082	0,1574	0,0571	0,0534	0,6249	0,6465	0,0555	0,0587
B	0,0731	0,0508	0,496	0,0824	0,6829	0,428	0,1204	0,0525	0,8163	0,9098	0,055	0,0562
C	0,0678	0,0631	0,8766	0,4188	0,8938	1,0258	0,5149	0,1537	0,928	0,9666	0,454	0,5103
D	0,141	0,2397	0,9646	0,883	1,1486	0,9385	0,7981	0,5712	0,9832	0,9789	0,4848	0,43
E	0,0662	0,0562	0,0574	0,0555	0,0523	0,0658	0,9167	0,8573	0,966	0,9643	1,0907	1,1289
F	0,0812	0,0706	0,0496	0,0468	0,091	0,0528	1,0526	1,0744	1,0677	1,0822	1,131	1,1966
G	0,3129	0,4772	0,0604	0,0795	0,5074	0,1603	1,1247	1,1692	1,1109	1,3062	1,16	1,2323
H	0,8976	0,9228	0,1766	0,2536	0,8367	0,7246	0,9816	0,8617	1,0161	0,9196	0,852	1,3325

- A-B, 11-12 : Kuvvetli Pozitif Kontrol Serumu
- C-D 11-12 : Zayıf Pozitif Kontrol serumu
- E-F 11-12 : Negatif Serum
- G-H 11-12 : Antijen Kontrol gözlerini ifade etmektedir.

Çizelge 2.2. LPB ELISA testi sonucu elde edilen bir pleytteki serumların OD değerlerinin, % inhibisyon değerleri.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
91	95	92	96	73	86	95	95	45	43	95	95
94	96	57	93	40	63	89	95	29	20	95	95
94	94	23	63	22	10	55	87	19	16	60	55
88	79	16	23	0	18	30	50	14	14	58	62
94	95	95	95	95	94	20	25	16	16	5	1
93	94	96	96	92	95	8	6	7	5	1	-5
73	58	95	93	56	86	2	-2	3	-14	-1	-8
22	19	85	78	27	37	14	25	11	20	26	-16

2.17. Solid Faz Kompetitif ELISA (SPC ELISA)

Test, Mackay ve ark (2001) ile OIE (2009) tarafından hazırlanan SPC ELISA yöntemine göre yapıldı. Bu yöntemde tavşan antiserumları (Trapping antiserum) ile kaplanmış, katı ortamda absorbans özelliği olan Nunc ELISA pleytlerine, şap virusu antijeni absorbe ettirilerek şap virusu antijeninin, tavşan antiserumları tarafından pleyte tutunması sağlandı. Bir sonraki aşamada, test serumları ve kobay antiserumları (tespit edici antikor) sahip oldukları antikorların antijene bağlanmaları için yarışmalı olarak aynı anda ilave edildi. Test serumlarında bulunan şap virusuna spesifik antikorların affinitesine göre bağlanma şekillendi. Test serumu içerisinde şap virusuna spesifik antikor bulunmadığı durumlarda, virus reseptörlerine tespit edici antikorlar bağlandı. Tespit edici antikorların bağlanıp bağlanmamasına göre test serumları içerisinde antikor varlığı ve var olan antikorların titreleri tespit edildi. Enzimle işaretli antikor olan konjugat ile virus reseptörlerine bağlanan tespit edici serumlar belirlendi. Kromojen-substrat oluşan bu reaksiyonun renk oluşumu ile ortaya çıkarılması sağlandı. Konjugat ve kromojen-substrat arasındaki reaksiyon H_2SO_4 ilave edilerek durduruldu. Pleytler spektrofotometrede okunarak sonuçlar değerlendirildi.

2.17.1. Immunoabsorbans Test Pleytlerinin Kaplanması

Serumlar O ve A serotipleri için ayrı ayrı çalışılacağından gerekli immunoabsorbans özelliğe sahip NUNC maxisorb mikroyeşil sayısı belirlendi. ELISA pleytlerinin sol alt köşesine numara ve serotipleri yazıldı. Hazırlanan kaplama solüsyonunun içerisinde 1/7 000 optimal dilüsyonda her bir serotip için tip spesifik olarak O1 Manisa ve A22 Irak tavşan anti-serumu ilave edildi. Tavşan anti-serumu ilave edilen kaplama solüsyonu, uygun çok kanallı pipet yardımıyla tip spesifik olarak, her bir pleytin tüm gözlerine (her bir göz için 50 µl hacimde) aktarıldı. Pleytlerin üzeri pleyt bandı ile kapatıldı. Pleytler tavşan anti-serumlarında bulunan antikorların pleyte absorbe olması için +4°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

2.17.2. İmmunoabsorbans ELISA Pleytlerinin Yıkılması

Kaplama işlemi için +4°C'de inkübasyona bırakılan düz tabanlı

immunoabsorbans ELISA pleytler, inkubatörden çıkartılarak pleyt tabanlarında kuruma olup olmadığı kontrol edildi. ELISA pleyt yıkama cihazıyla, her pleyt PBS yıkama sıvısı ile 3 defa yıkandı. Yıkama esnasında her göze en az 300 µl yıkama sıvısının dolmuş olduğuna dikkat edildi. Yıkanan pleytler gözlerinde solüsyon kalmamasına dikkat edilerek kurutuldu.

2.17.3. Virusların İlavesi

Virus numunesinin 1/2'den başlayarak log₂ tabanına göre 1/256'ya kadar PBS-Tween ile katlamalı dilusyonu yapıldı. Dilusyonu yapılan virusdan pleytin kontrol gözleri dahil tüm gözlerine, 50 µl miktarda eklendi. Virus ilavesi tamamlandıktan sonra pleytlerin üzeri pleyt bandı ile kapatılarak, +37°C'de rutubetli ortamı olan shakerlı etüvde 1 saat inkubasyona bırakıldı.

2.17.4. Test Serumları ve Kontrol Serumlarının İlavesi

İnkubasyon sonrası yıkanıp kurutulmuş pleytin A 1-10 ve E 1-10 gözlerine 60 µl, B/D 1-10 ve F/H gözlerine 50 µl bloklama solüsyonu eklendi. Her bir test serum numunesinden tek kanallı pipetle iki göz olmak kaydıyla 40 µl, A 1-2; A 3-4 A 9-10 şeklinde sırasıyla kondu. Çok kanallı pipetle, A 1-10 gözlerinde 8 defa pipetleme yapıldıktan sonra 50 µl alındı ve ikinci sıraya (B 1-10 gözlerine) aktarıldı. Her bir defasında bir alt sıraya olmak kaydıyla bu aktarma işlemine 4 dilüsyon tekniğinde, D sırasına kadar devam edildi. D sırasında alınan 50 µl atılarak serumun 4 basamaklı log₂ tabanına göre katlamalı dilusyonu yapılmış oldu.

Sıradaki test serum numunelerinden, 40 µl alınarak pleytin her 2 gözüne bir test serumu olacak şekilde (E 1-2; E 3-4....E 9-10) konarak, test serumlarının 4 dilüsyon tekniğinde dilusyonu yapılarak tüm test serumlarının 1:2,5 başlangıç dilüsyonu yapıldı.

A/B/C/D/E/F 11-12 kontrol serumu gözlerine 60 µl, G/H 11-12 antijen kontrol gözüne ise 50 µl bloklama solüsyonu eklendi. Kuvvetli Pozitif serum A/B 11-12; Zayıf Pozitif Serum C/D 11-12 ve Negatif Kontrol serumu ise E/F 11-12 no'lu pleyt gözlerine 40 µl eklendi. Böylece kontrol serumlarının 1:2,5 başlangıç dilüsyonu yapıldı.

2.17.5. Yarışmacı Kobay Anti-serumlarının İlavesi

Bloklama solüsyonu içerisinde 1/1 000 dilusyonunda hazırlanan kobay anti-serumları pleytlerin tüm gözlerine, 50 µl hacminde ilave edildi. Kobay anti-serumu ilavesinden sonra, test serumlarının final dilusyonu 1/5 oldu. Daha sonra pleytlerin üzeri pleyt bandı ile kapatılarak, +37°C'de rutubetli ortamı olan shakerlı etüvde 1 saat inkubasyona bırakıldı.

2.17.6. Konjugat İlavesi

İnkubasyon periyodunun bitiminde pleytler yıkanarak, kurutuldu. Sığır serumu ile 1/1 oranında bloklanan konjugat, bloklama solüsyonu içerisinde 1/1 000 oranında dilüe edildi. Konjugat tip spesifik olmadığı için pleytin tüm gözlerine hazırlanan konjugattan 50 µl hacminde ilave edildi. Pleytlerin üzeri pleyt bandı ile kapatılarak +37°C'de rutubetli ortamı olan shakerlı etüvde 1 saat inkubasyona bırakıldı.

2.17.7. Kromojen-Substrat İlavesi

Kromojen-substrat aşaması için hazırlanmış OPD'yi aktive etmek için 1/2500 optimal dilusyon oranında Hidrojen Peroksit (H_2O_2), OPD'ye ilave edildi. H_2O_2 ilave edilmez pleytlerin tüm gözlerine 50 µl hacminde OPD ilave edilerek, pleytlerin üzeri pleyt bandı ile kapatılıp, karanlık bir ortamda 15 dakika inkubasyona bırakıldı.

2.17.8. Reaksiyonun Durdurulması

İnkubasyon sonrası reaksiyonun durdurulması için sülfirik asit (1,25 M H_2SO_4) stoping solüsyon olarak tüm gözlere 50 µl ilave edildi.

2.17.9. Pleytlerin Spektrofotometre ile Okunması

Pleytler, Softmax Pro-312ex programı (Molecular Devices 2006) kullanılarak spektrofotometre ile 492 nm dalga boyunda okundu ve optik dansiteleri (OD) belirlendi. Elde edilen sonuçlar excel dosyası üzerinden veri dönüşüm sihirbazı kullanılarak aritmetik sayı değerlerine dönüştürüldü. OD verilerinin aritmetik sayı değerleri ile test sonuçları değerlendirildi.

2.17.10. Sonuçların Değerlendirilmesi

Serumların titrelerinin hesaplanabilmesi için, test sonucunda elde edilen OD değerlerinin % inhibisyon değerleri hesaplandı.

% İnhibisyon değeri hesaplanması için; “ % İnhibisyon Değeri= 100 - (Test Serumları OD / Ortalama Antijen Kontrol OD) x 100 ” formülü kullanıldı. Ortalama antijen kontrol OD değeri ise antijen kontrol gözlerindeki (G/H 11-12,) OD değerlerinin toplanıp, dörde bölünmesi ile hesaplandı.

OD değerlerinden % inhibisyon değerleri hesaplandıktan sonra, serum titreleri belirlendi. % 50 ve üzeri inhibisyon veren değerler pozitif olarak kabul edildi (Mackay ve ark 2001, OIE 2009).

Çizelge 2.3. SPC ELISA testi sonucu elde edilen bir pleyttteki serumların OD değerleri.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,1291	0,1234	0,0949	0,1098	0,7866	0,6899	0,1129	0,1284	0,097	0,1091	0,0893	0,0875
B	0,1981	0,1269	0,1422	0,1394	1,1032	1,0613	0,1791	0,2105	0,163	0,1494	0,101	0,0898
C	0,2214	0,2348	0,2347	0,373	1,1546	1,154	0,3555	0,4616	0,2805	0,2592	0,3912	0,4643
D	0,4307	0,4911	0,5707	0,7521	1,1625	1,1455	0,6959	0,8215	0,4382	0,4626	0,4419	0,3557
E	0,8584	0,8693	0,8639	0,7731	0,8605	0,8837	0,0954	0,1019	0,1281	0,115	0,6853	0,5554
F	0,9915	1,152	1,0447	1,3131	1,1144	1,0935	0,0938	0,1107	0,1128	0,1648	0,6388	0,5329
G	1,281	1,4292	1,4031	1,4035	1,2956	1,2388	0,1414	0,1279	0,2265	0,1423	0,9017	0,8311
H	1,5209	1,2888	1,2594	1,1947	1,1543	1,1864	0,1505	0,1616	0,2103	0,1736	0,6451	0,8119

- A-B, 11-12 : Kuvvetli Pozitif Kontrol Serumu
- C-D 11-12 : Zayıf Pozitif Kontrol serumu
- E-F 11-12 : Negatif Serum
- G-H 11-12 : Antijen Kontrol gözlerini ifade etmektedir.

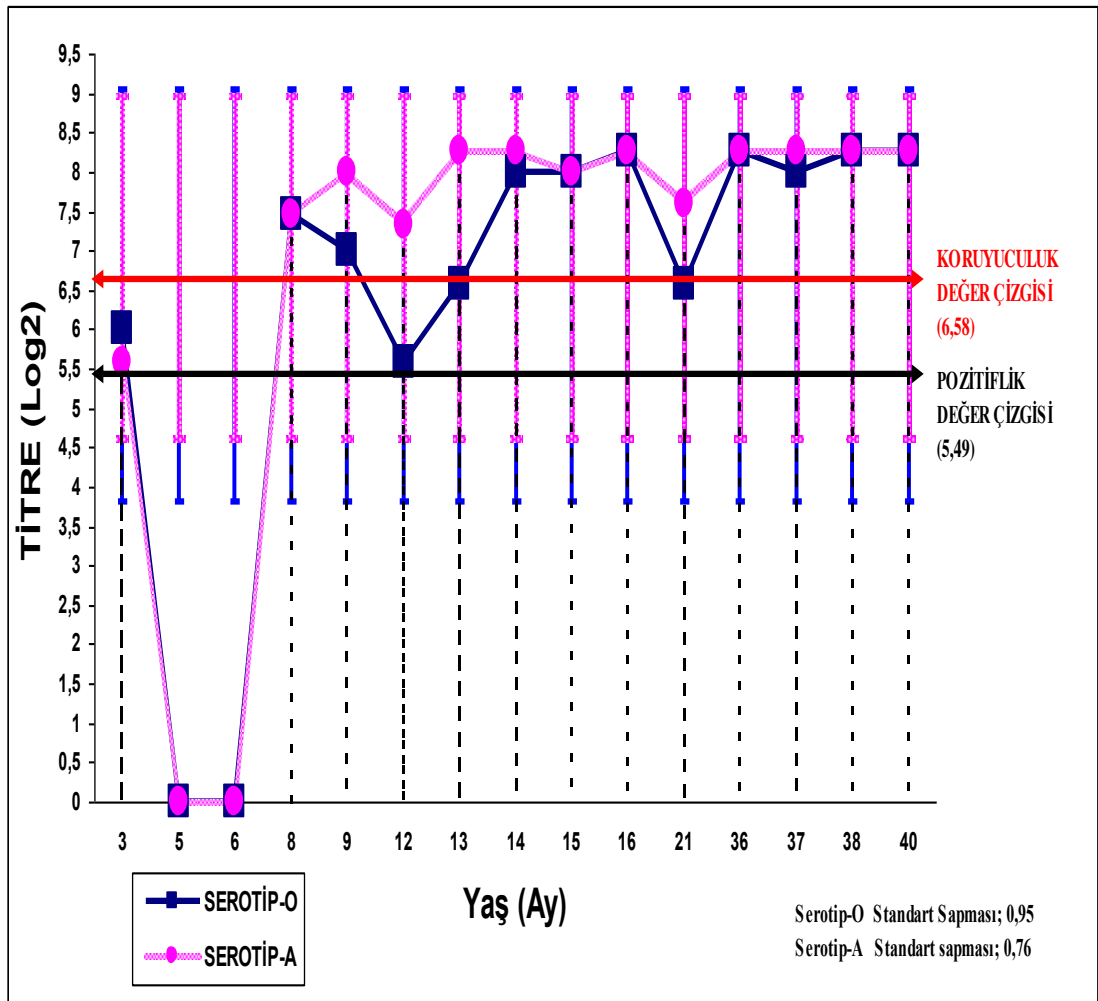
Çizelge 2.4. SPC ELISA testi sonucu elde edilen bir pleyttteki serumların OD değerlerinin, % inhibisyon değerleri.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
84	85	88	86	1	13	86	84	88	86	89	89
75	84	82	83	-38	-33	78	74	80	81	87	89
72	71	71	53	-45	-45	55	42	65	67	51	42
46	38	28	6	-46	-44	13	-3	45	42	45	55
-8	-9	-8	3	-8	-11	88	87	84	86	14	30
-24	-44	-31	-65	-40	-37	88	86	86	79	20	33
-61	-79	-76	-76	-62	-55	82	84	72	82	-13	-4
-91	-62	-58	-50	-45	-49	81	80	74	78	19	-2

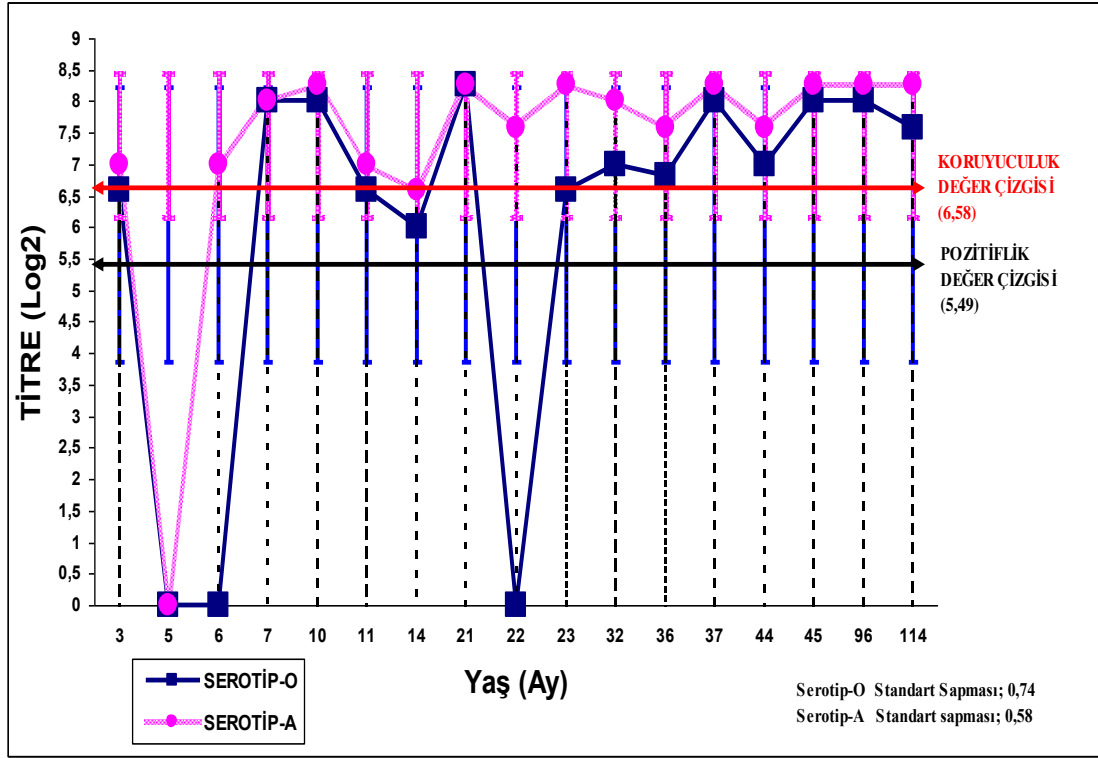
3. BULGULAR

3.1. Likit Faz Bloking ELISA Testi Sonuçları

Proje kapsamında toplanan kan serumlarında şap virusunun O ve A serotiplerine karşı gelişen antikor miktarlarının, LPB ELISA yöntemi ile elde edilen test sonuçları aşağıdaki grafiklerde gösterildi. Testte; pozitiflik titresi 45 (log2 tabanında 5,49) koruyuculuk titresi 96 (log2 tabanında 6,58) olarak belirlendi (Hamblin ve ark 1986a, Şap Enstitüsü 2009b).



Şekil 3.1. Ordu İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

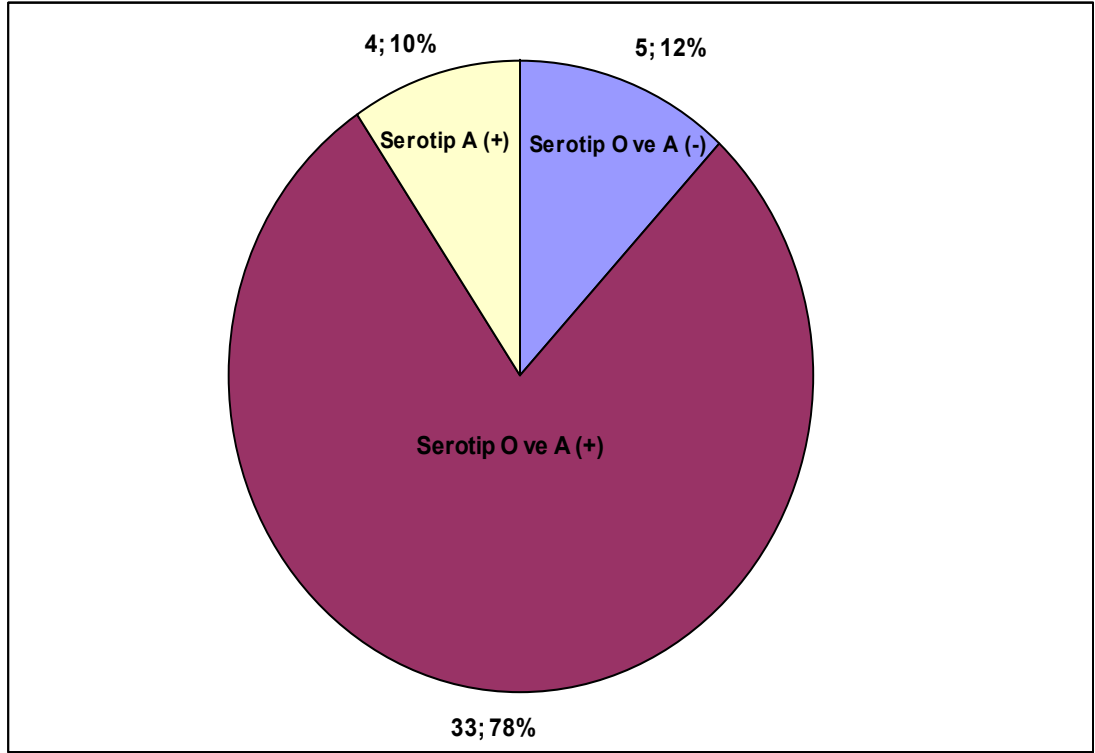


Şekil 3.2. Ordu İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

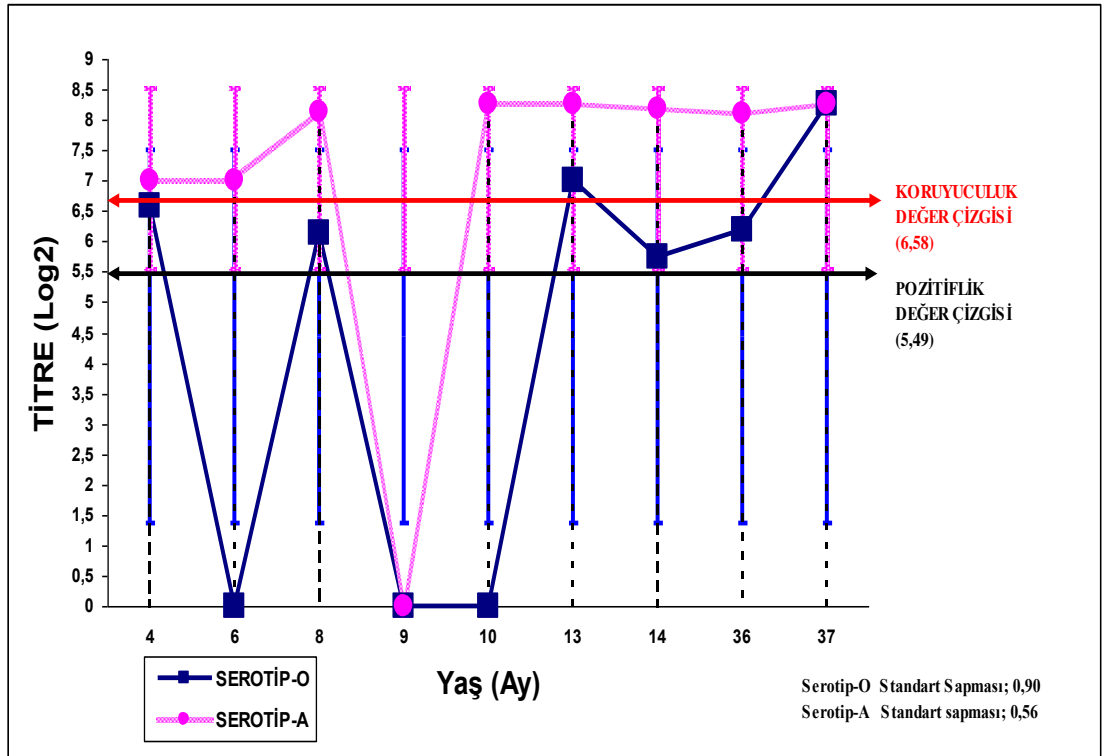
Ordu İlindeki küçük aile tipi 6 adet işletmeden elde edilen toplam 42 adet büyükbaş kan serumunun LPB ELISA ile incelenmesi sonucu şap hastalığına karşı yapılan aşılardan sonra 5 kan serumunun şap virusu O ve A serotiplerine karşı negatif, 4 kan serumunun serotip A yönünden, 33 kan serumunun ise hem serotip O hem de serotip A yönünden pozitif olduğu tespit edildi. 42 adet kan serumunun; 4'ünün serotip A, 33'ünün ise serotip O ve A yönünden koruyuculuk düzeyinde antikor titresine sahip olduğu belirlendi. (Çizelge 3.1, Şekil 3.3)

Çizelge 3.1. Ordu İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi.

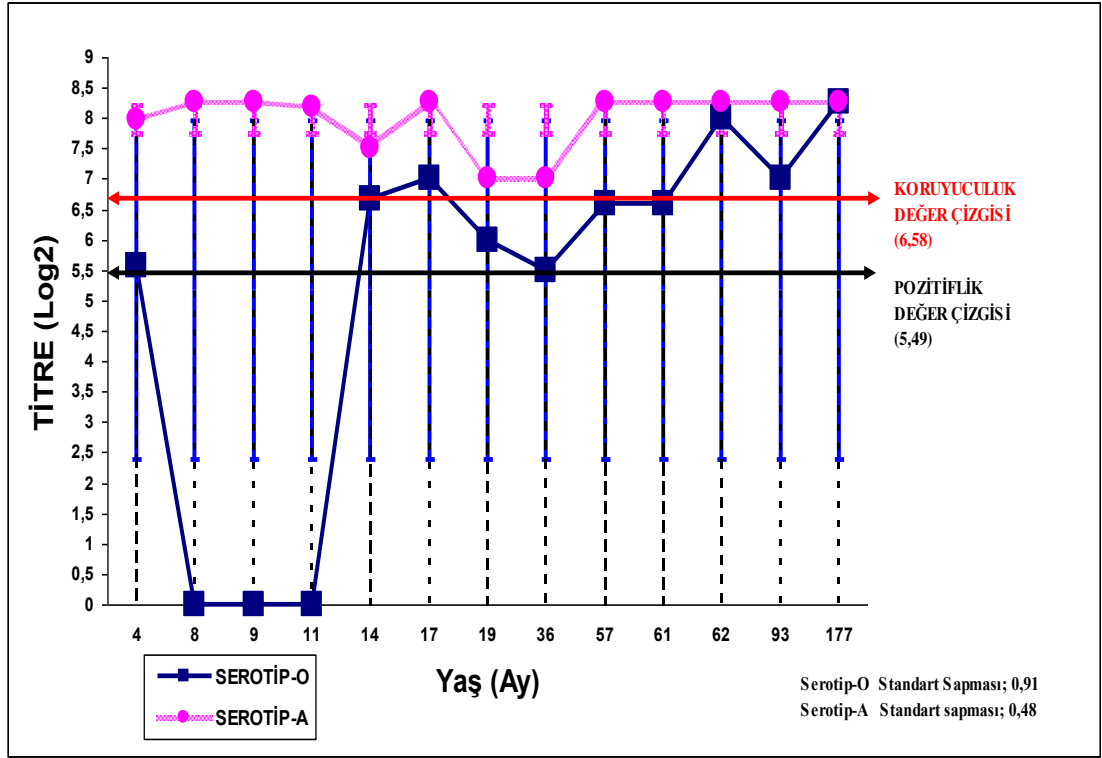
Cinsiyet	Serum Sayısı	Negatif Serum Sayısı	Serotip O (+) Serum Sayısı	Serotip A (+) Serum Sayısı	Serotip O ve A (+) Serum Sayısı	Serotip O Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip A Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip O ve A Koruyucu Titreli Serum Sayısı
Dişi	21	2	-	3	16	-	3	16
Erkek	21	3	-	1	17	-	1	17



Şekil 3.3. Ordu İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılardan sonra Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı.



Şekil 3.4. Giresun İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

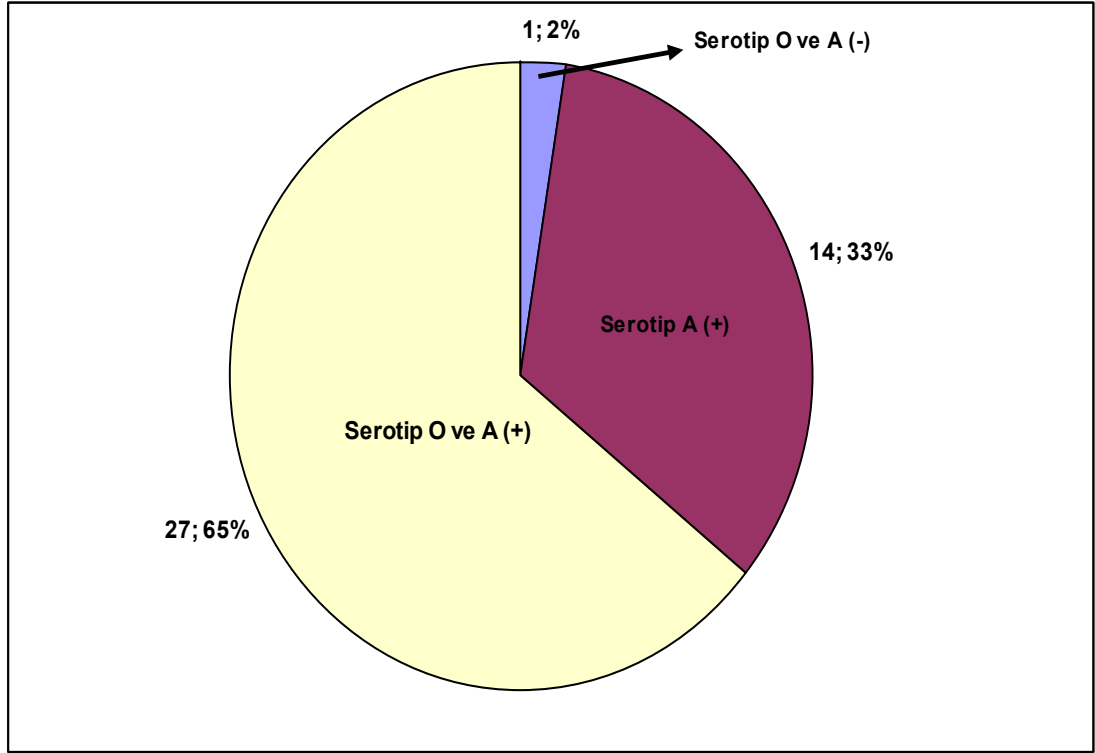


Şekil 3.5. Giresun İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

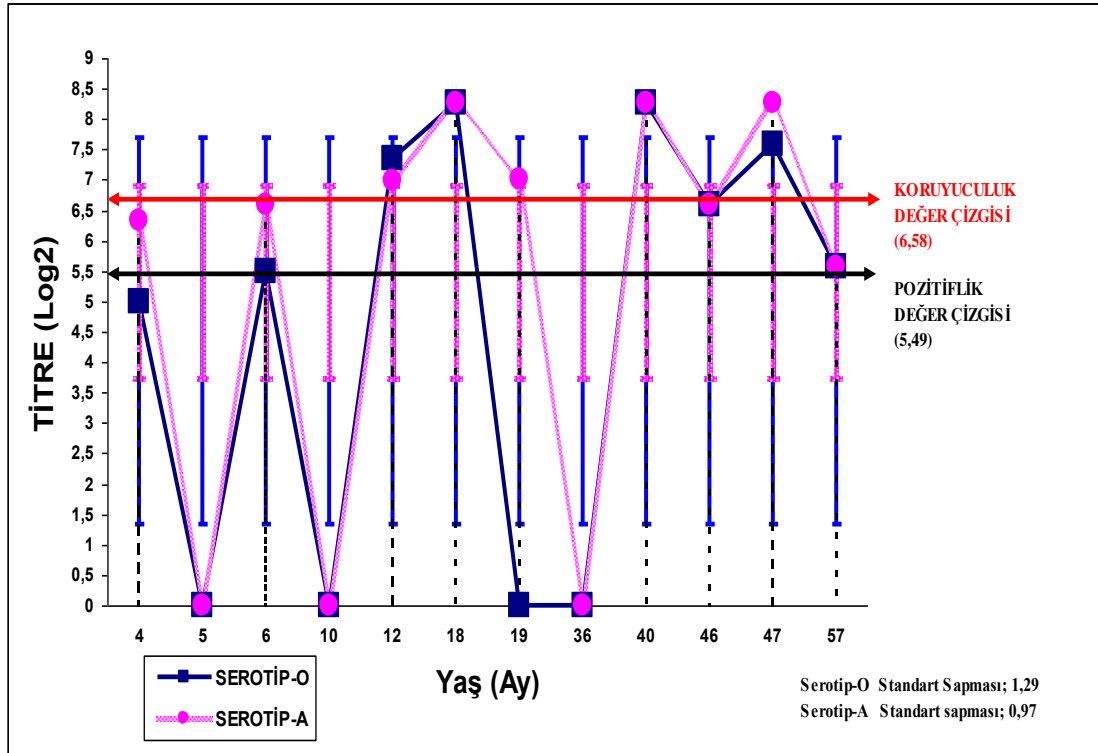
Giresun İlindeki küçük aile tipi 11 adet işletmeden elde edilen toplam 42 adet büyükbaş kan serumunun LPB ELISA ile incelenmesi sonucu şap hastalığına karşı yapılan aşılardan sonra 1 kan serumunun şap virusu O ve A serotiplerine karşı negatif, 14 kan serumunun serotip A yönünden, 27 kan serumunun ise hem serotip O hem de serotip A yönünden pozitif olduğu tespit edildi. 42 adet kan serumunun; 18'inin serotip A, 23'ünün ise serotip O ve A yönünden koruyuculuk düzeyinde antikor titresine sahip olduğu belirlendi. (Çizelge 3.2, Şekil 3.6)

Çizelge 3.2. Giresun İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi.

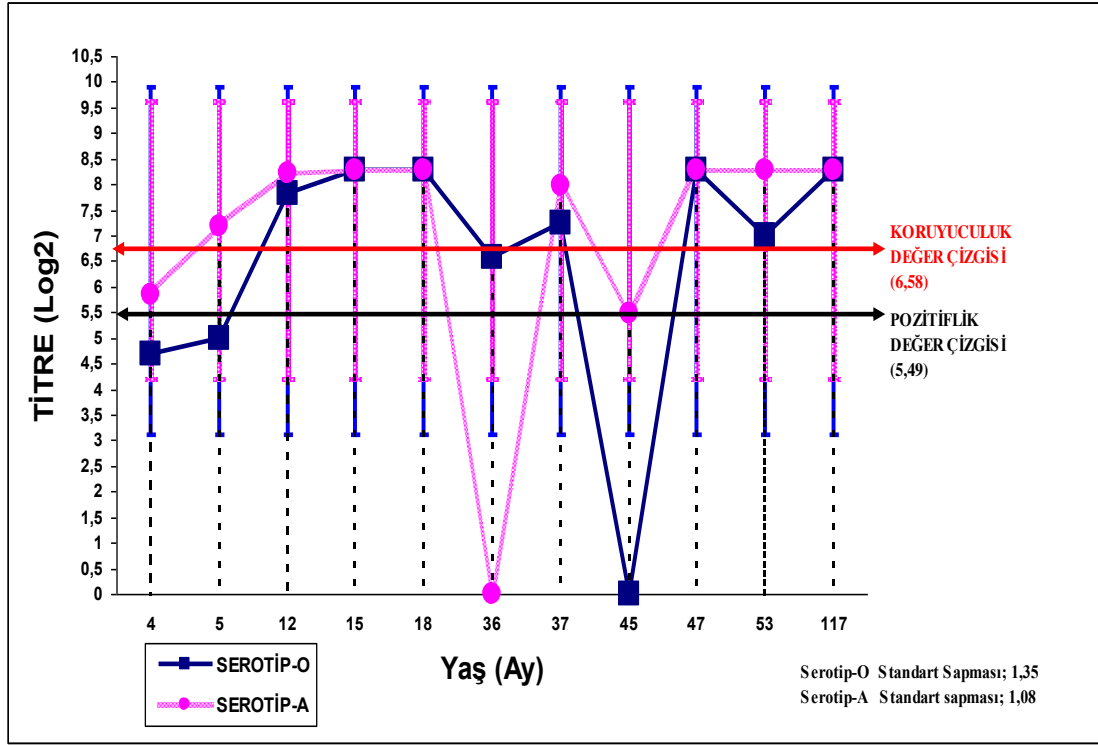
Cinsiyet	Serum Sayısı	Negatif Serum Sayısı	Serotip O (+) Serum Sayısı	Serotip A (+) Serum Sayısı	Serotip O ve A (+) Serum Sayısı	Serotip O Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip A Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip O ve A Koruyucu Titreli Serum Sayısı
Dişi	21	-	-	7	14	-	9	12
Erkek	21	1	-	7	13	-	9	11



Şekil 3.6. Giresun İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılardan sonra Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı.



Şekil 3.7. Trabzon İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

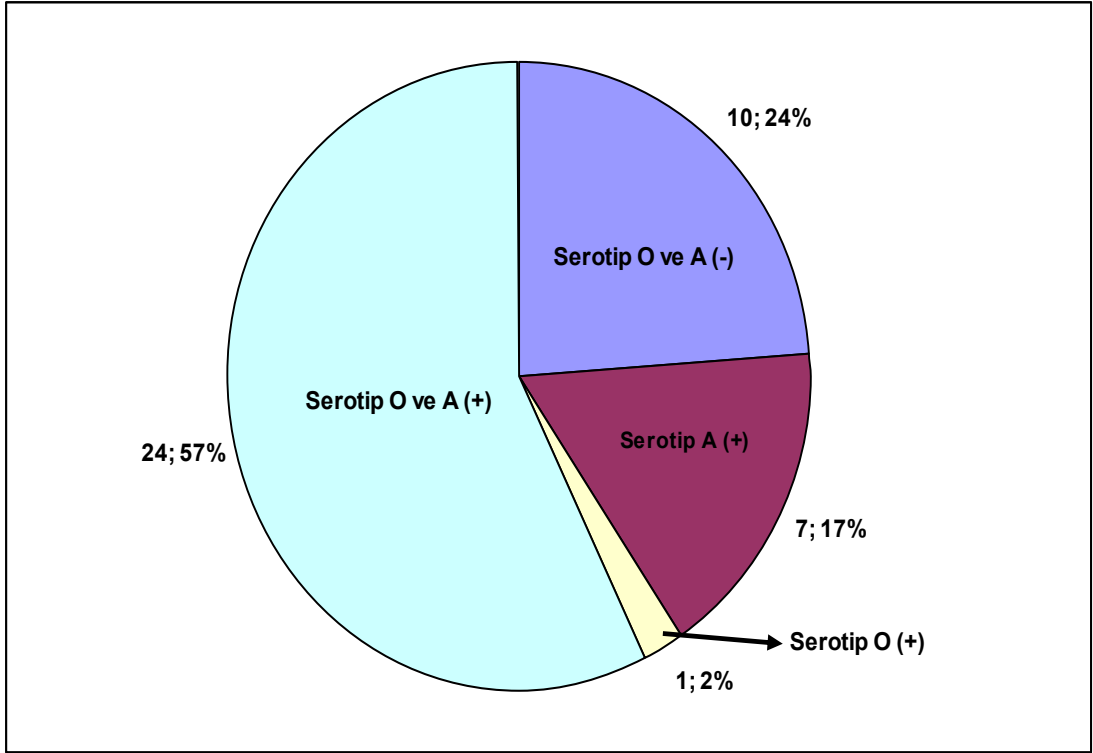


Şekil 3.8. Trabzon İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

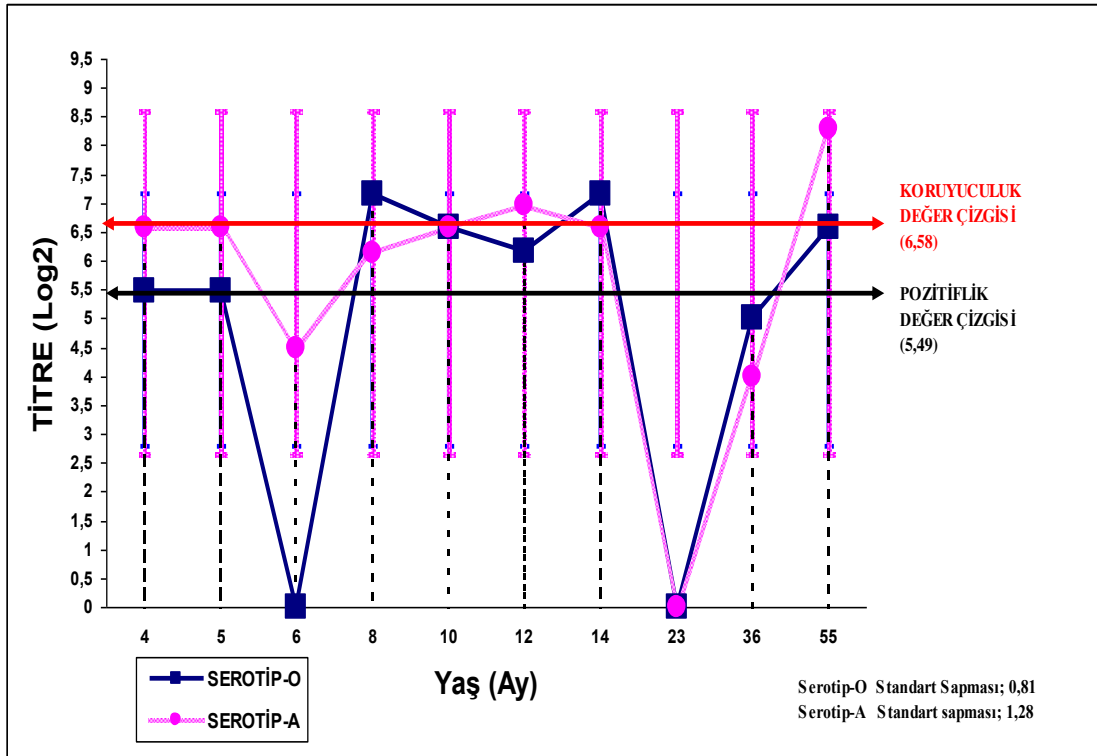
Trabzon İlindeki küçük aile tipi 27 adet işletmeden elde edilen toplam 42 adet büyükbaş kan serumunun LPB ELISA ile incelenmesi sonucu şap hastalığına karşı yapılan aşılardan sonra 10 kan serumunun şap virusu O ve A serotiplerine karşı negatif, 1 kan serumu serotip O, 7 kan serumu serotip A yönünden ve 24 kan serumunun ise hem serotip O hem de serotip A yönünden pozitif olduğu tespit edildi. 42 adet kan serumunun; 1'inin serotip O, 10'unun serotip A, 20'sinin ise serotip O ve A yönünden koruyuculuk düzeyinde antikor titresine sahip olduğu belirlendi. (Çizelge 3.3, Şekil 3.9)

Çizelge 3.3. Trabzon İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi.

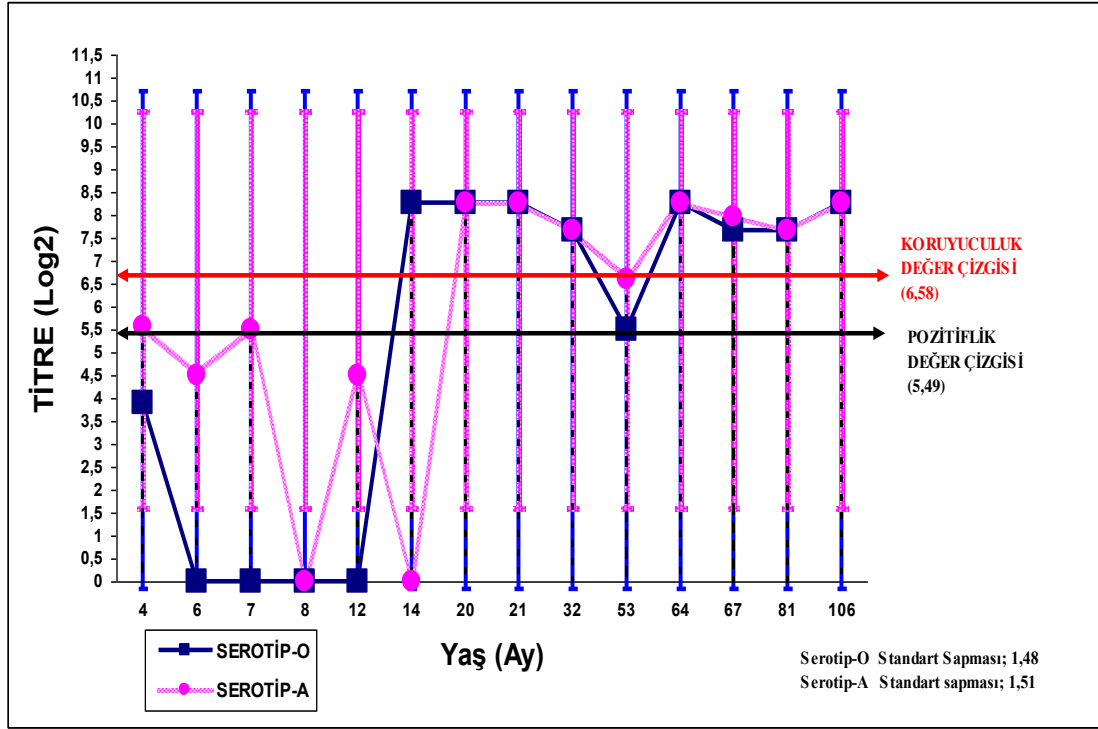
Cinsiyet	Serum Sayısı	Negatif Serum Sayısı	Serotip O (+) Serum Sayısı	Serotip A (+) Serum Sayısı	Serotip O ve A (+) Serum Sayısı	Serotip O Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip A Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip O ve A Koruyucu Titreli Serum Sayısı
Dişi	21	2	1	4	14	1	6	11
Erkek	21	8	-	3	10	-	4	9



Şekil 3.9. Trabzon İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılamadan sonra Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı.



Şekil 3.10. Rize İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

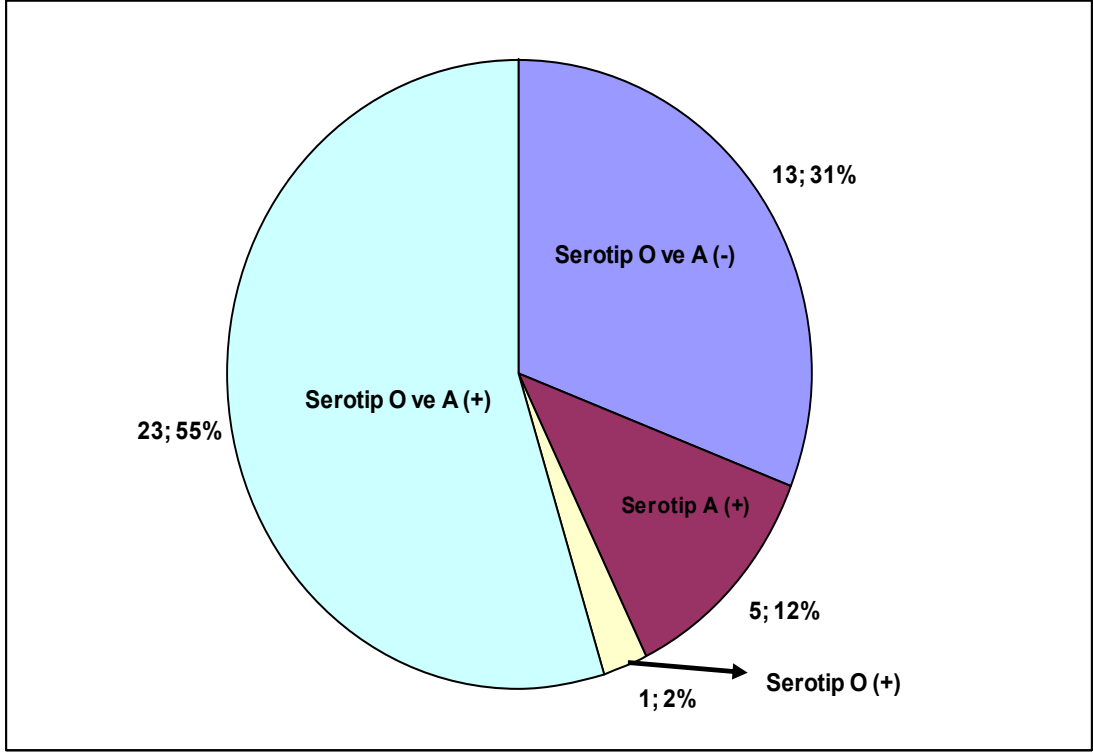


Şekil 3.11. Rize İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

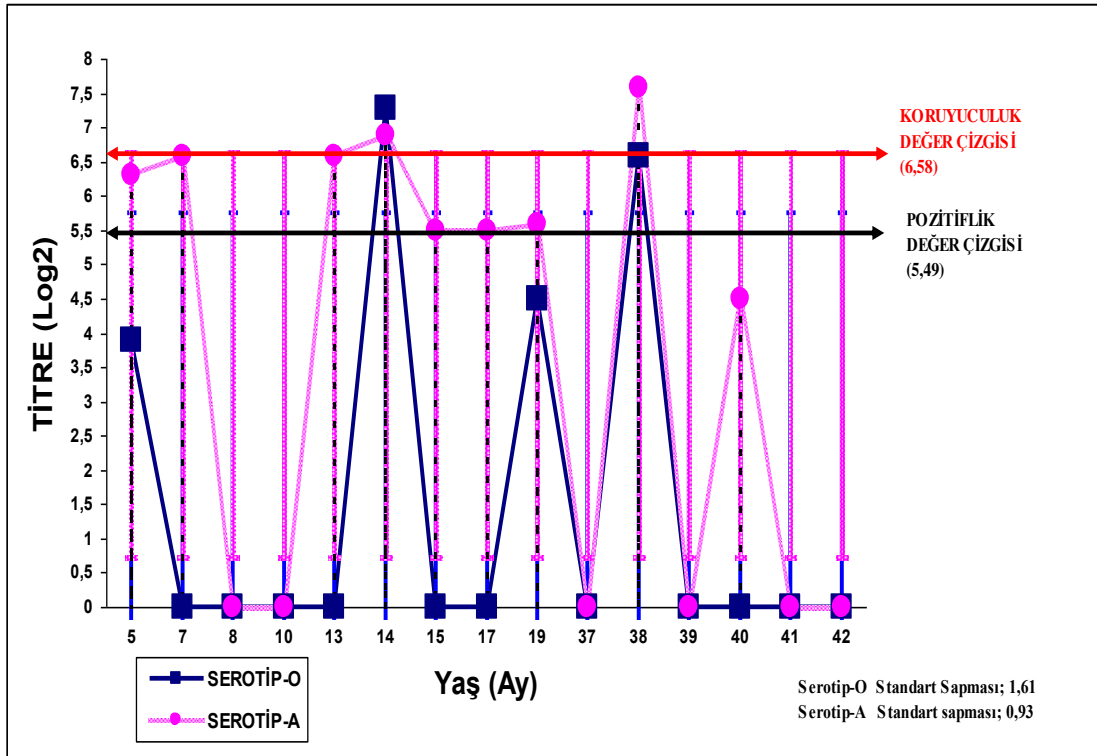
Rize İlindeki küçük aile tipi 13 adet işletmeden elde edilen toplam 42 adet büyükbaş kan serumunun LPB ELISA ile incelenmesi sonucu şap hastalığına karşı yapılan aşılardan sonra 13 kan serumunun şap virusu O ve A serotiplerine karşı negatif, 1 kan serumunun serotip O, 5 kan serumunun serotip A yönünden ve 23 kan serumunun ise hem serotip O hem de serotip A yönünden pozitif olduğu tespit edildi. 42 adet kan serumunun 2'sinin serotip O, 4'ünün serotip A, 18'inin ise serotip O ve A yönünden koruyuculuk düzeyinde antikor titresine sahip olduğu belirlendi. (Çizelge 3.4, Şekil 3.12)

Çizelge 3.4. Rize İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi.

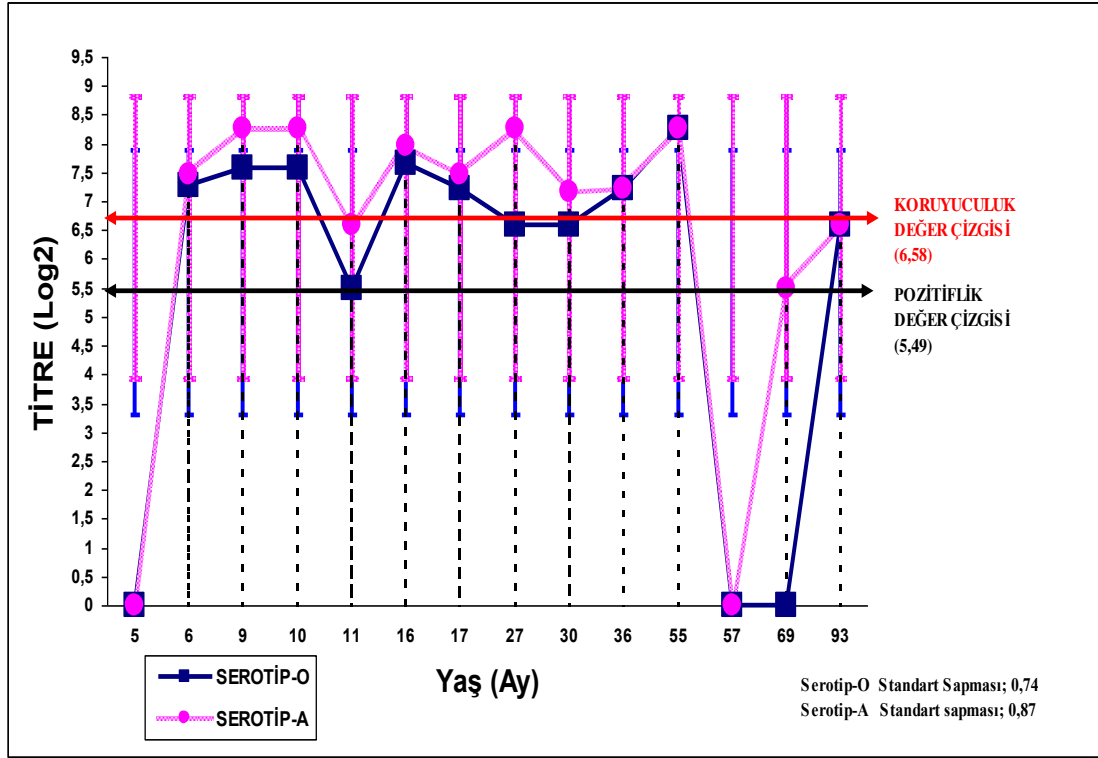
Cinsiyet	Serum Sayısı	Negatif Serum Sayısı	Serotip O (+) Serum Sayısı	Serotip A (+) Serum Sayısı	Serotip O ve A (+) Serum Sayısı	Serotip O Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip A Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip O ve A Koruyucu Titreli Serum Sayısı
Dişi	21	4	1	4	12	1	2	10
Erkek	21	9	-	1	11	1	2	8



Şekil 3.12. Rize ilindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılamadan sonra Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı.



Şekil 3.13. Artvin ilindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

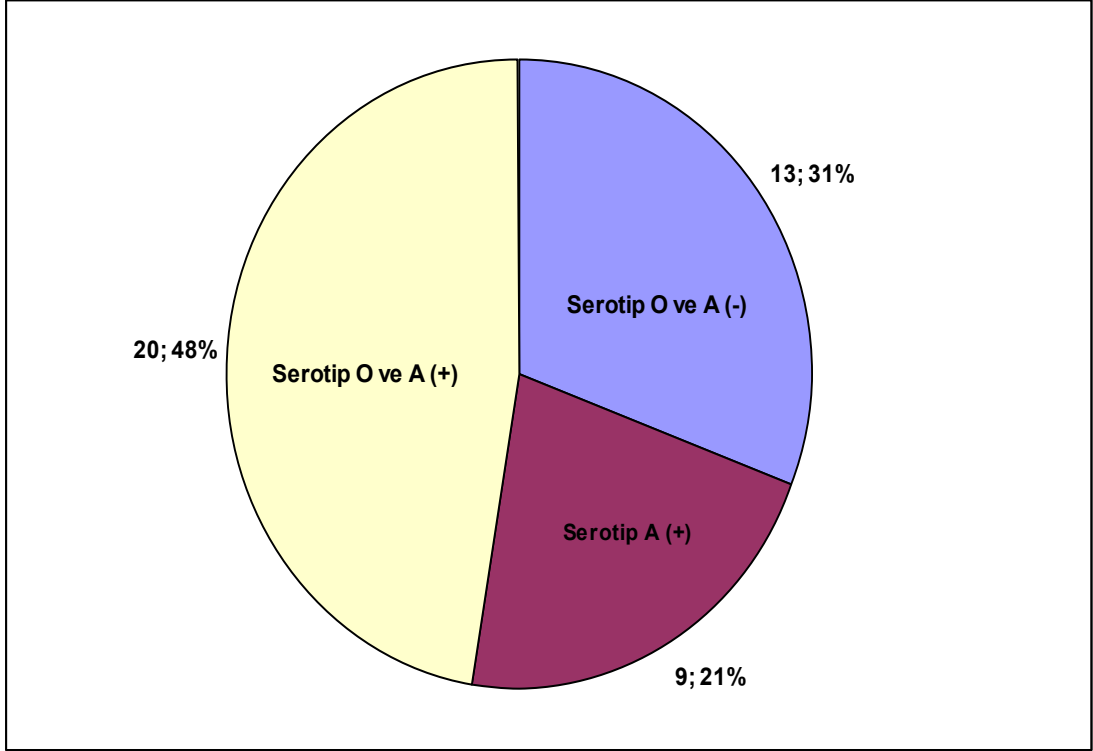


Şekil 3.14. Artvin İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

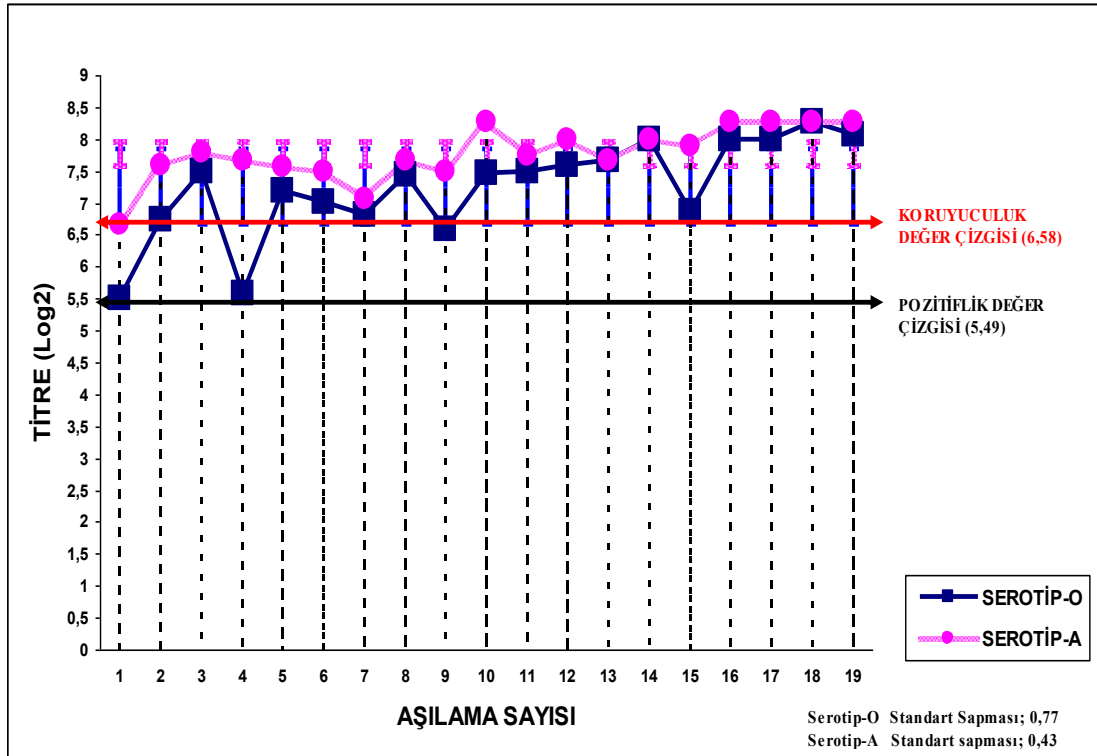
Artvin İlindeki küçük aile tipi 14 adet işletmeden elde edilen toplam 42 adet büyükbaş kan serumunun LPB ELISA ile incelenmesi sonucu şap hastalığına karşı yapılan aşılardan sonra 13 kan serumunun şap virusu O ve A serotiplerine karşı negatif, 9 kan serumunun serotip A yönünden ve 20 kan serumunun ise hem serotip O hem de serotip A yönünden pozitif olduğu tespit edildi. 42 adet kan serumunun 6'sının serotip A, 15'inin ise serotip O ve A yönünden koruyuculuk düzeyinde antikor titresine sahip olduğu belirlendi. (Çizelge 3.5, Şekil 3.15)

Çizelge 3.5. Artvin İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi.

Cinsiyet	Serum Sayısı	Negatif Serum Sayısı	Serotip O (+) Serum Sayısı	Serotip A (+) Serum Sayısı	Serotip O ve A (+) Serum Sayısı	Serotip O Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip A Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip O ve A Koruyucu Titreli Serum Sayısı
Dişi	21	3	-	2	16	-	2	13
Erkek	21	10	-	7	4	-	4	2



Şekil 3.15. Artvin İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılardan sonra Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikör miktarlarının yüzdesel dağılımı.

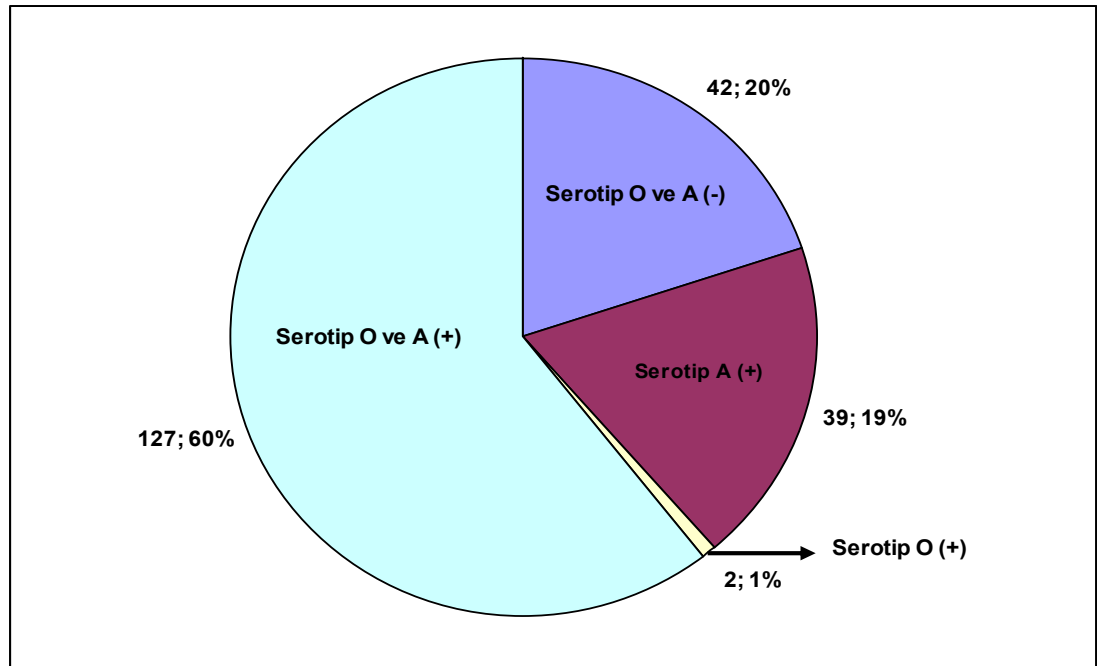


Şekil 3.16. Doğu Karadeniz Bölgesindeki büyükbaş ruminantların O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikör miktarlarının aşılama sayısına bağlı değişimi.

Doğu Karadeniz Bölgesindeki 5 ilde yer alan toplam 71 küçük aile tipi işletmeden elde edilen 210 büyükbaş ruminant kan serumunun LPB ELISA ile incelenmesi sonucu 42 kan serumunun şap virusu O ve A serotiplerine karşı negatif, 2 kan serumunun serotip O, 39 kan serumunun serotip A yönünden ve 127 kan serumunun ise hem serotip O hem de serotip A yönünden pozitif olduğu tespit edildi. 210 adet kan serumunun 3'ünün serotip O, 42'sinin serotip A, 109'unun ise serotip O ve A yönünden koruyuculuk düzeyinde antikor titresine sahip olduğu belirlendi. (Çizelge 3.6, Şekil 3.17)

Çizelge 3.6. Doğu Karadeniz Bölgesindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi.

Cinsiyet	Serum Sayısı	Negatif Serum Sayısı	Serotip O (+) Serum Sayısı	Serotip A (+) Serum Sayısı	Serotip O ve A (+) Serum Sayısı	Serotip O Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip A Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip O ve A Koruyucu Titreli Serum Sayısı
Dişi	105	11	2	20	72	3	22	62
Erkek	105	31	-	19	55	-	20	47

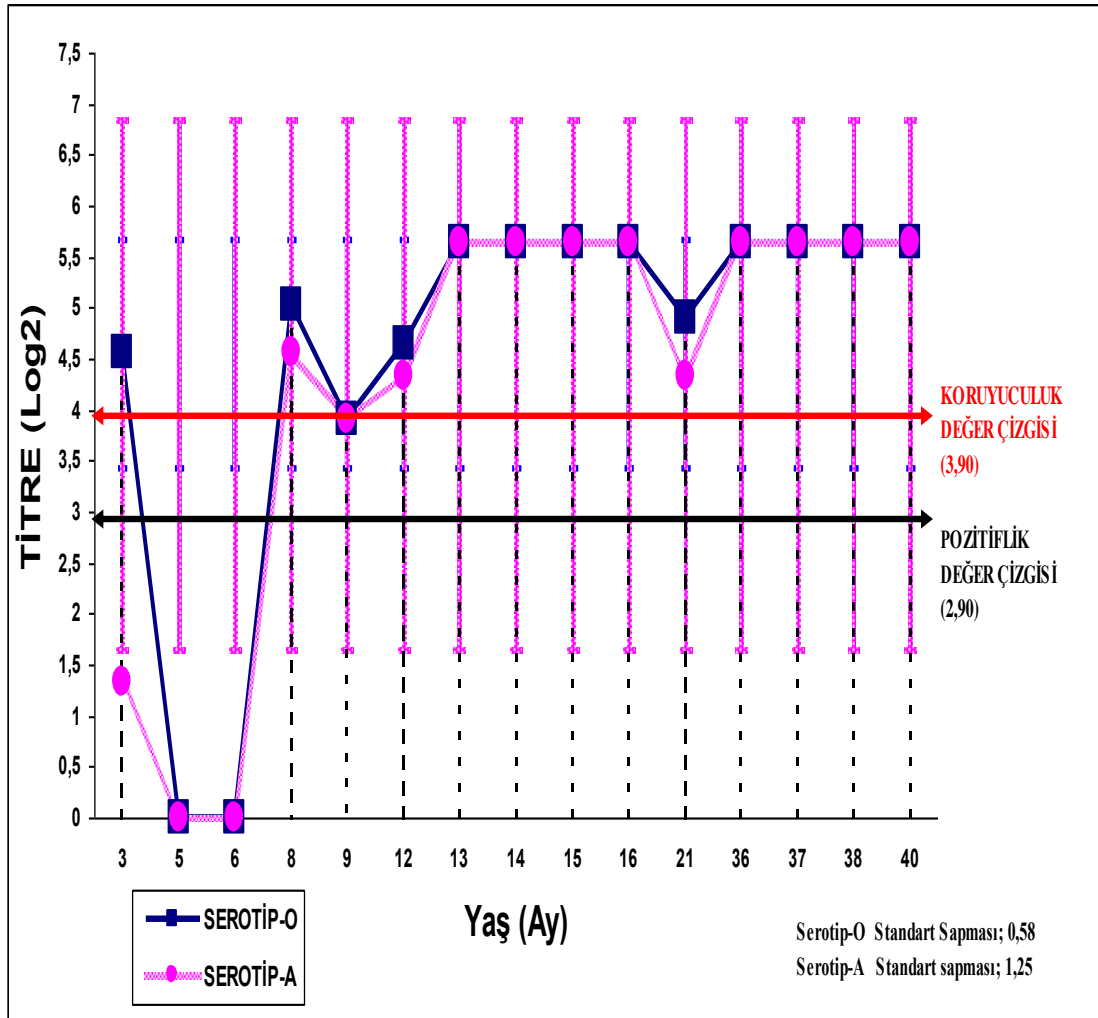


Şekil 3.17. Doğu Karadeniz Bölgesindeki büyükbaş ruminantların Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı.

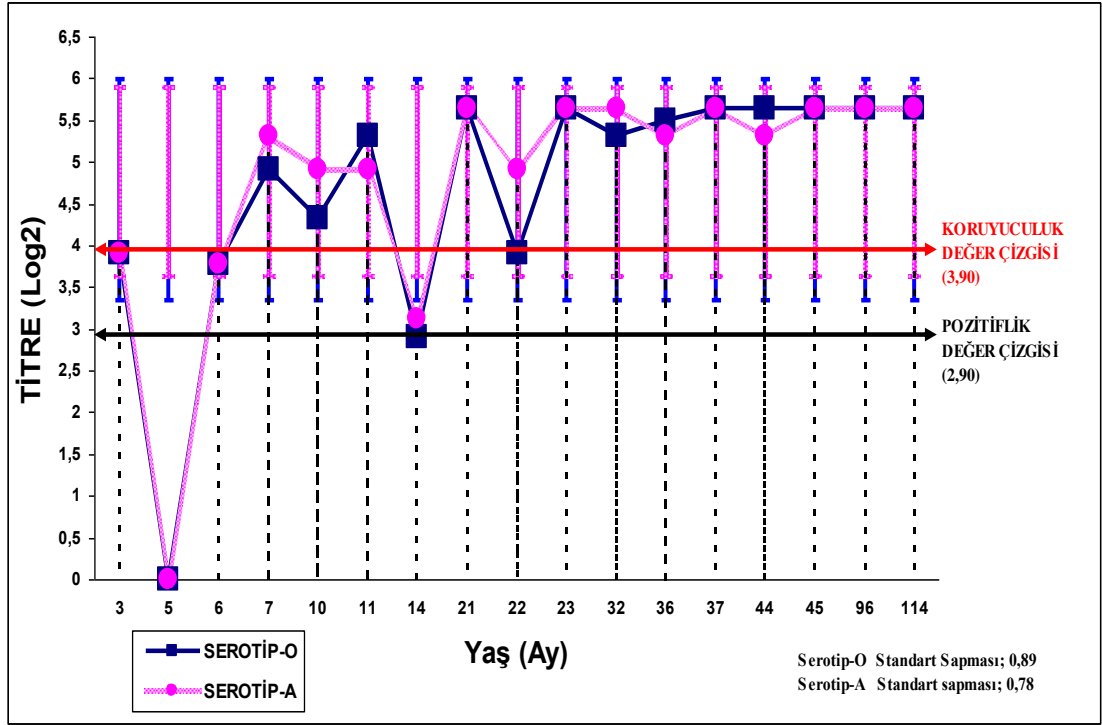
3.2. Solid Faz Kompetitif ELISA Testi Sonuçları

Proje kapsamında toplanan kan serumlarında şap virusunun O ve A serotiplerine karşı gelişen antikor miktarlarının, SPC ELISA yöntemi ile elde edilen test sonuçları aşağıdaki grafiklerde gösterildi.

Testte pozitiflik titresi 7,5 (log2 tabanında 2,90), koruyuculuk titresi 15 (log2 tabanında 3,90) olarak belirlendi (Mackay ve ark 2001, Şap Enstitüsü 2009c).



Şekil 3.18. Ordu İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

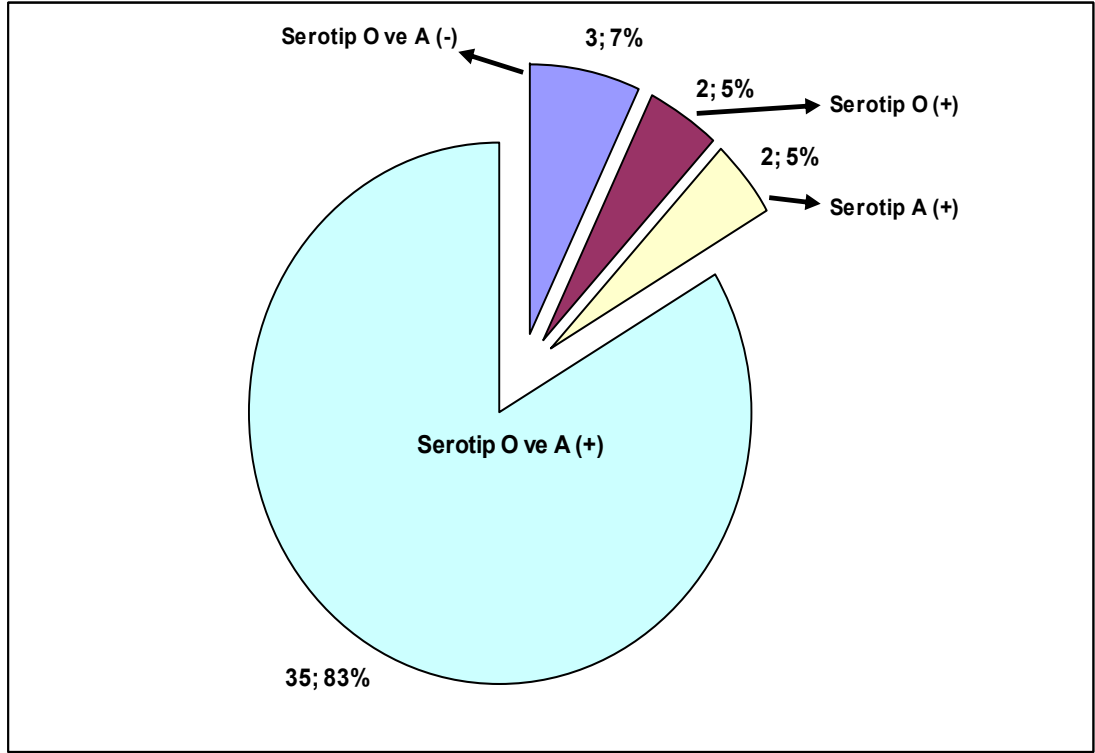


Şekil 3.19. Ordu İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

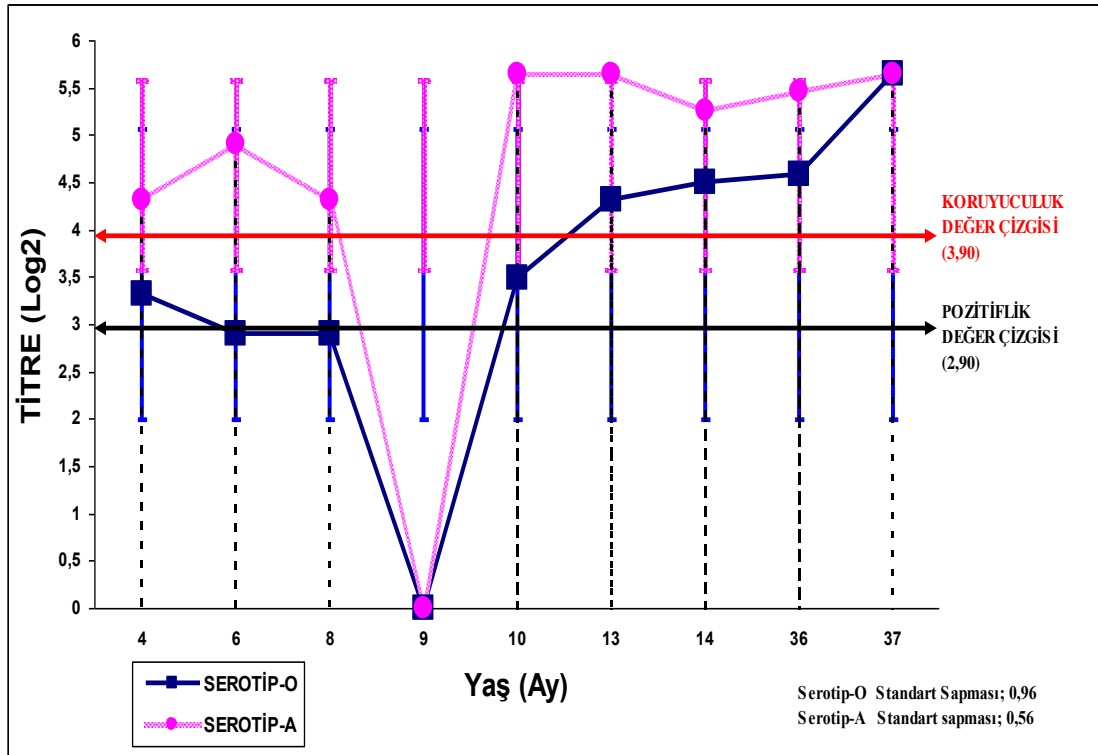
Ordu İlindeki küçük aile tipi 6 adet işletmeden elde edilen toplam 42 adet büyükbaş kan serumunun SPC ELISA ile incelenmesi sonucu şap hastalığına karşı yapılan aşılardan sonra 3 kan serumunun şap virusu O ve A serotiplerine karşı negatif, 2 kan serumunun serotip O, 2 kan serumunun serotip A yönünden ve 35 kan serumunun ise hem serotip O hem de serotip A yönünden pozitif olduğu tespit edildi. 42 adet kan serumunun 2'sinin serotip O, 32'sinin ise serotip O ve A yönünden koruyuculuk düzeyinde antikor titresine sahip olduğu belirlendi. (Çizelge 3.7, Şekil 3.20)

Çizelge 3.7. Ordu İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi.

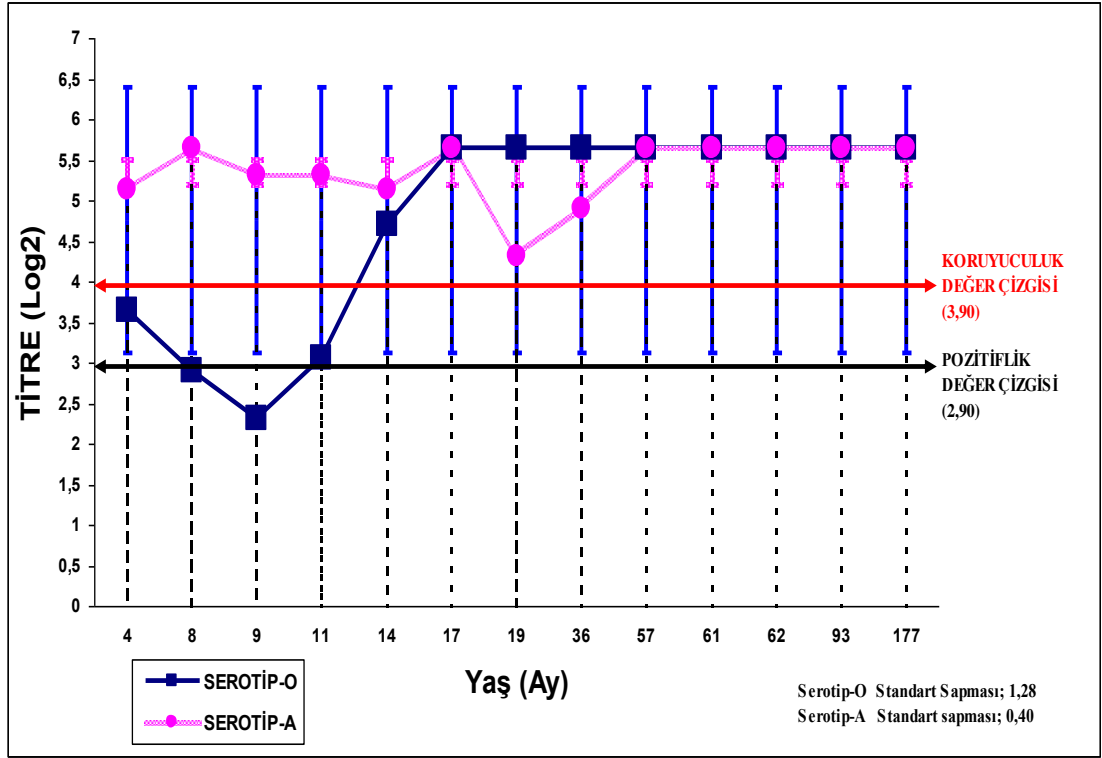
Cinsiyet	Serum Sayısı	Negatif Serum Sayısı	Serotip O (+) Serum Sayısı	Serotip A (+) Serum Sayısı	Serotip O ve A (+) Serum Sayısı	Serotip O Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip A Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip O ve A Koruyucu Titreli Serum Sayısı
Dişi	21	1	-	1	19	-	-	17
Erkek	21	2	2	1	16	2	-	15



Şekil 3.20. Ordu İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılamadan sonra Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikör miktarlarının yüzdesel dağılımı.



Şekil 3.21. Giresun İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikör miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

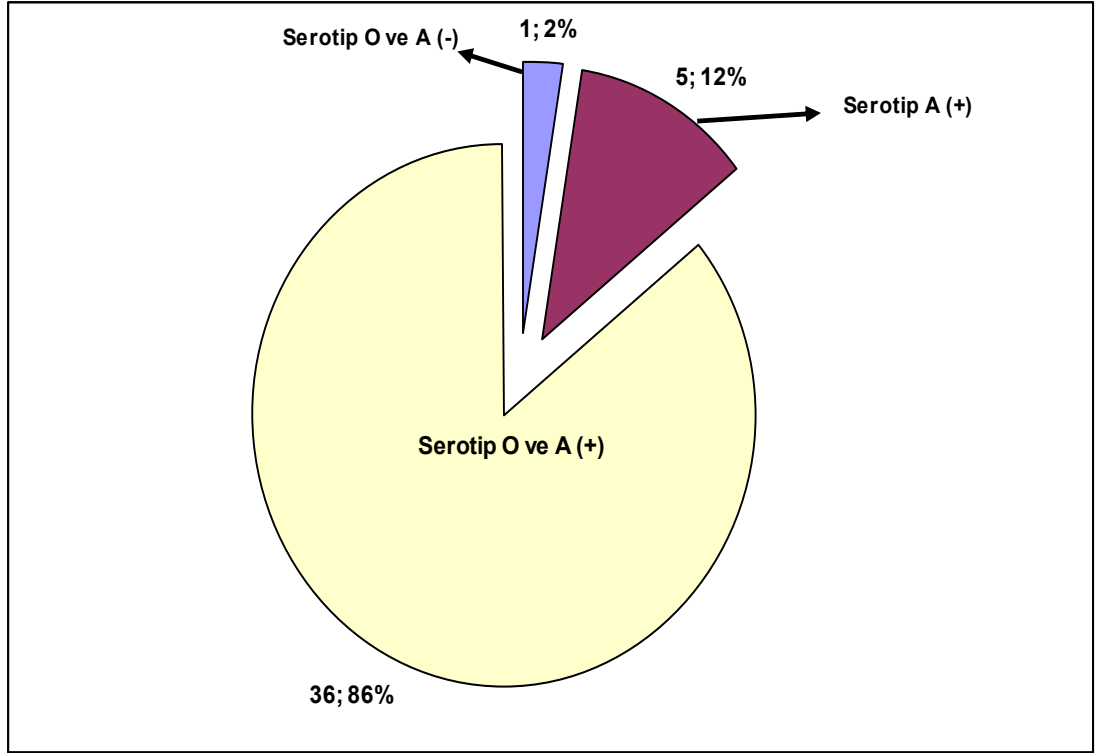


Şekil 3.22. Giresun İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

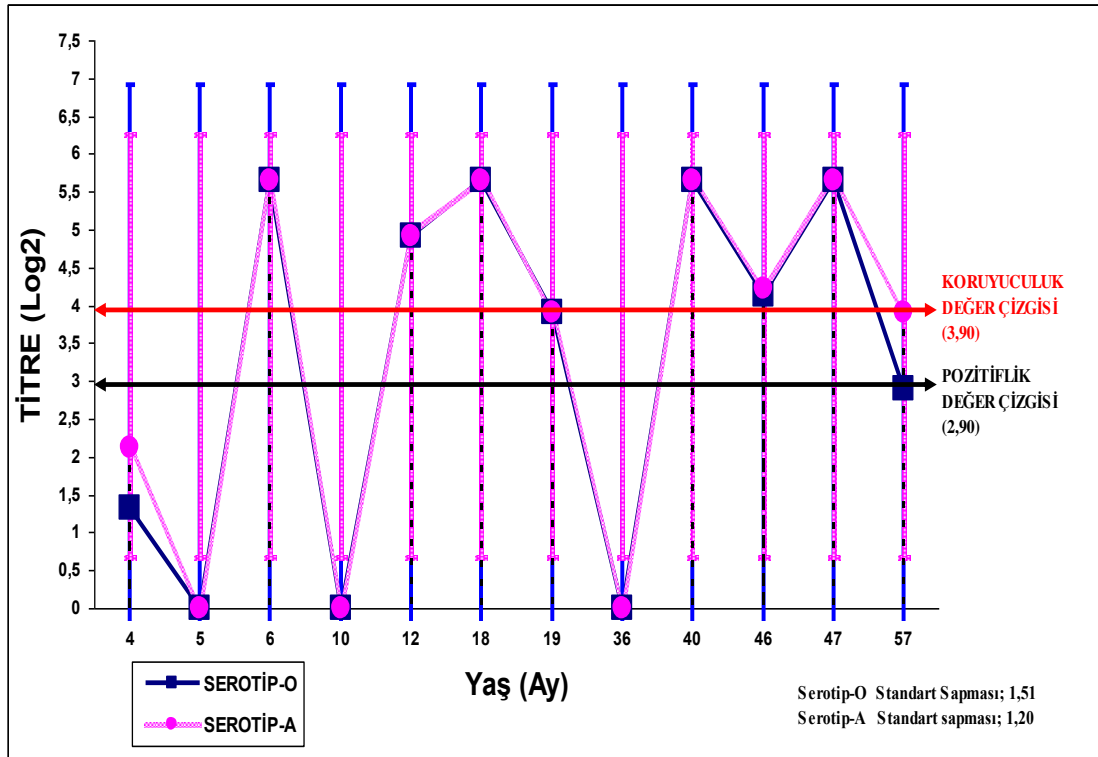
Giresun İlindeki küçük aile tipi 11 adet işletmeden elde edilen toplam 42 adet büyükbaş kan serumlarının SPC ELISA ile incelenmesi sonucu şap hastalığına karşı yapılan aşılardan sonra 1 kan serumunun şap virusu O ve A serotiplerine karşı negatif, 5 kan serumunun serotip A yönünden ve 36 kan serumunun ise hem serotip O hem de serotip A yönünden pozitif olduğu tespit edildi. 42 adet kan serumunun 16'sının serotip A, 25'inin ise serotip O ve A yönünden koruyuculuk düzeyinde antikor titresine sahip olduğu belirlendi. (Çizelge 3.8, Şekil 3.23)

Çizelge 3.8. Giresun İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi.

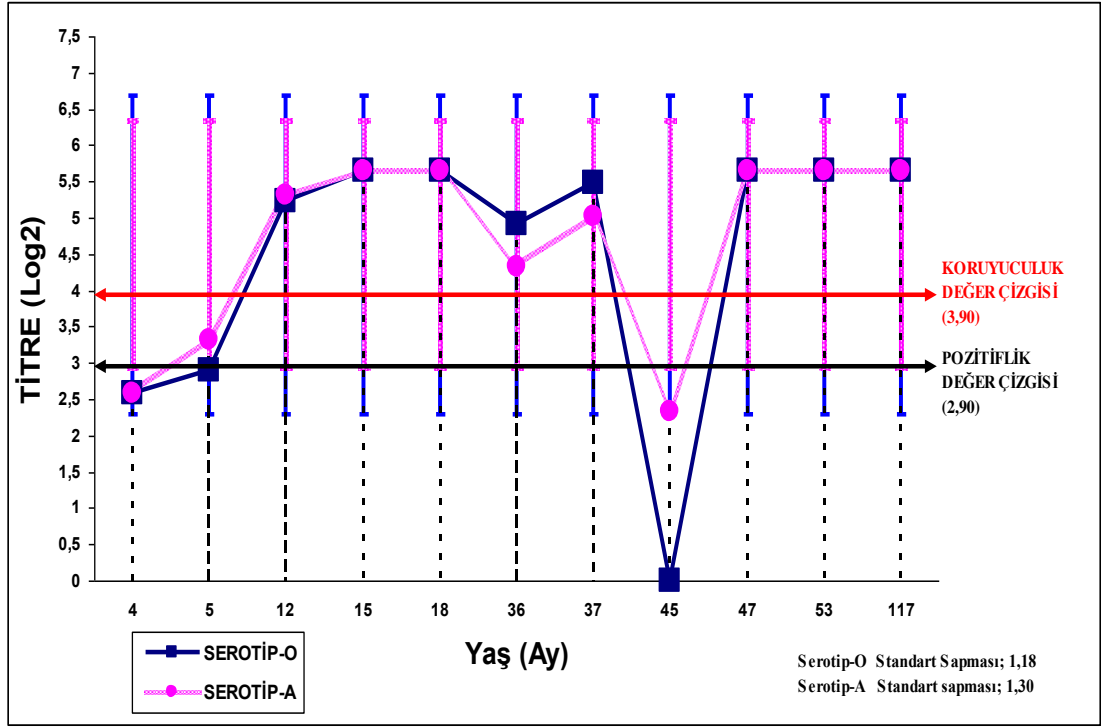
Cinsiyet	Serum Sayısı	Negatif Serum Sayısı	Serotip O (+) Serum Sayısı	Serotip A (+) Serum Sayısı	Serotip O ve A (+) Serum Sayısı	Serotip O Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip A Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip O ve A Koruyucu Titreli Serum Sayısı
Dişi	21	-	-	2	19	-	7	14
Erkek	21	1	-	3	17	-	9	11



Şekil 3.23. Giresun İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılamadan sonra Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı.



Şekil 3.24. Trabzon İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

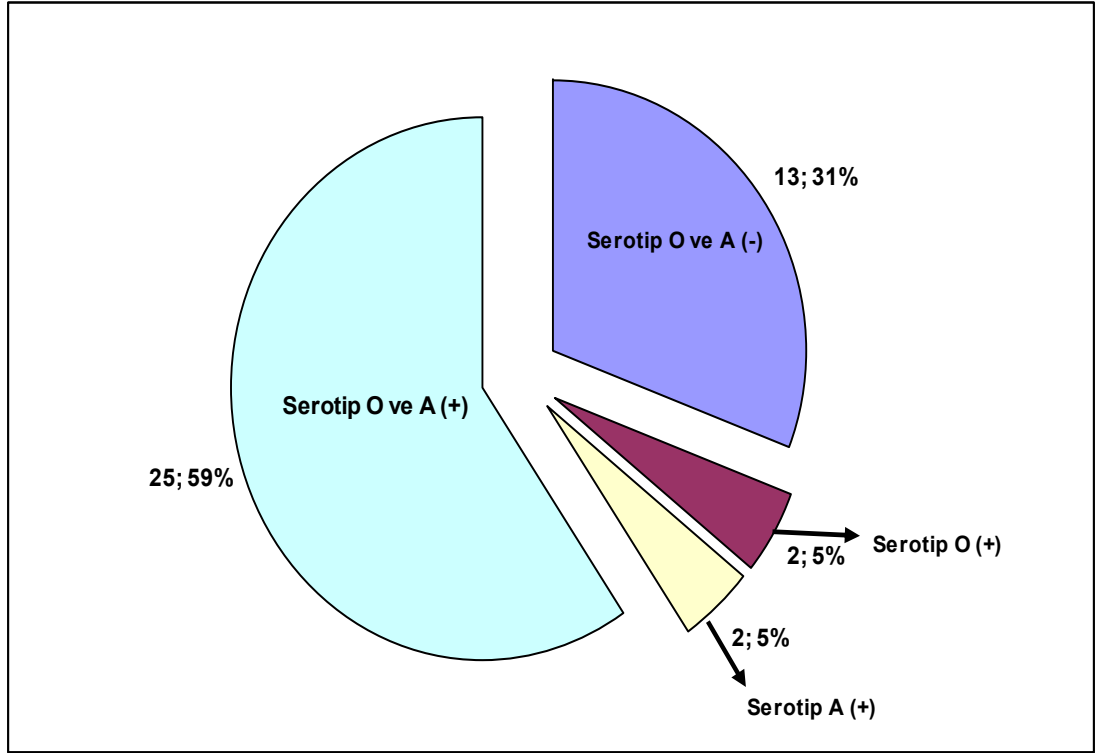


Şekil 3.25. Trabzon İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

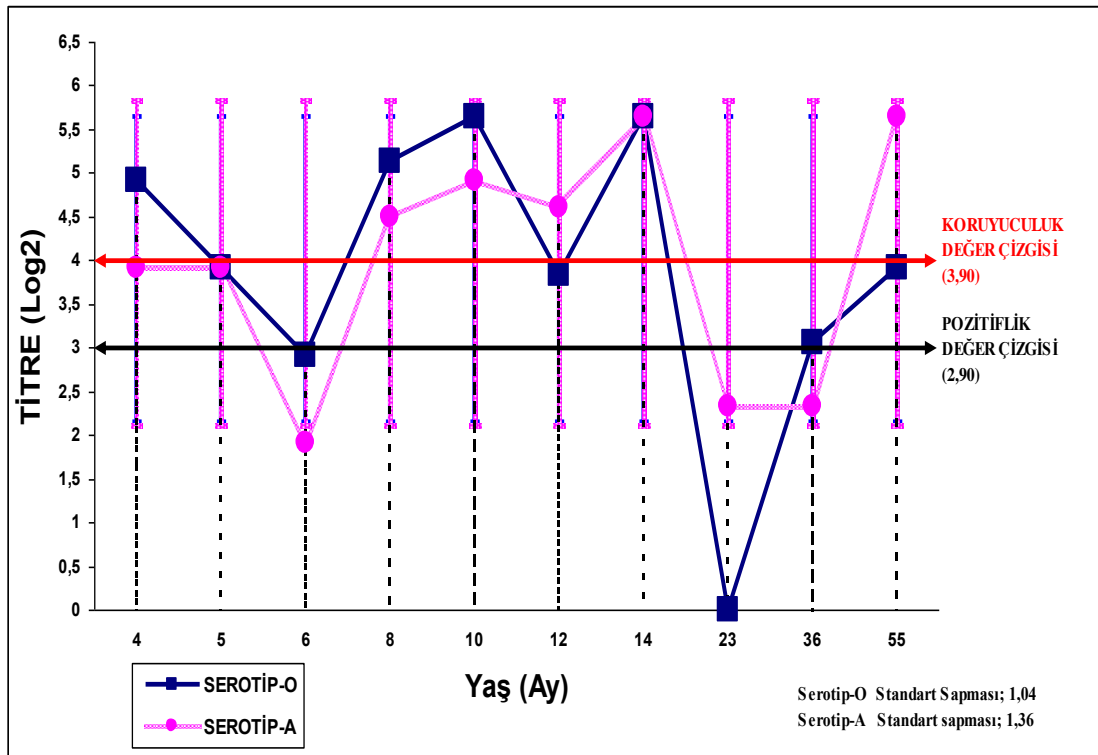
Trabzon İlindeki küçük aile tipi 27 adet işletmeden elde edilen toplam 42 adet büyükbaş kan serumlarının SPC ELISA ile incelenmesi sonucu şap hastalığına karşı yapılan aşılardan sonra 13 kan serumunun şap virusu O ve A serotiplerine karşı negatif, 2 kan serumunun serotip O, 2 kan serumunun serotip A yönünden ve 25 kan serumunun ise hem serotip O hem de serotip A yönünden pozitif olduğu tespit edildi. 42 adet kan serumunun 25'inin serotip O ve A yönünden koruyuculuk düzeyinde antikor titresine sahip olduğu belirlendi. (Çizelge 3.9, Şekil 3.26)

Çizelge 3.9. Trabzon İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi.

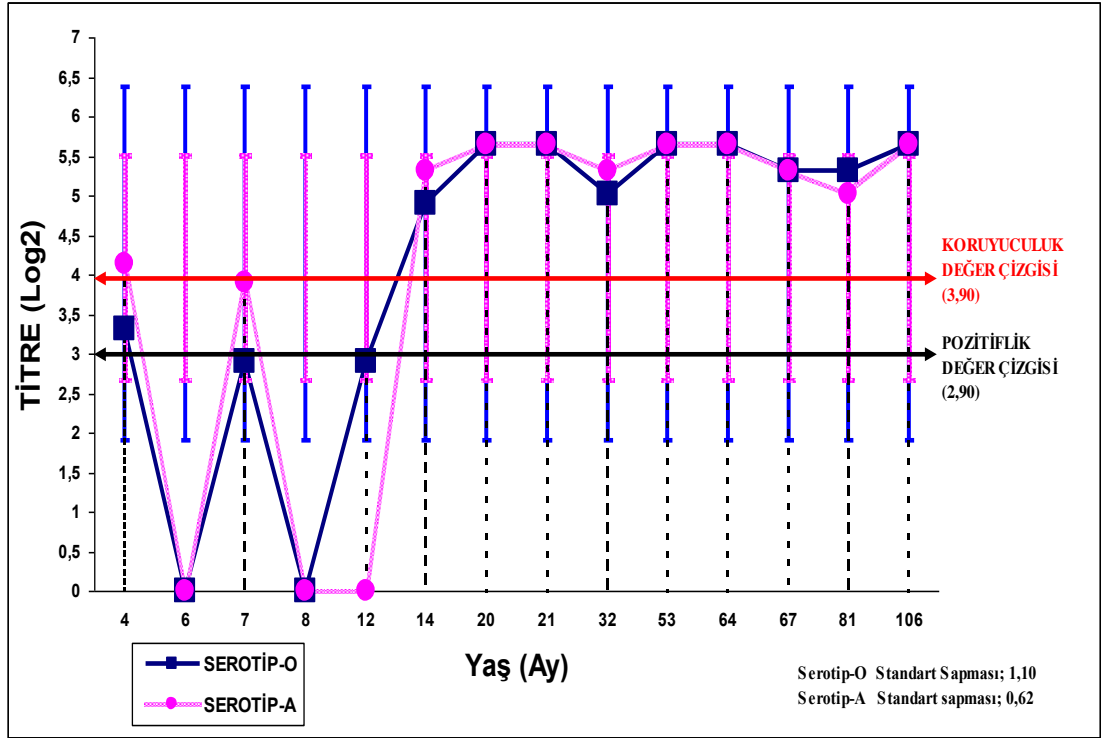
Cinsiyet	Serum Sayısı	Negatif Serum Sayısı	Serotip O (+) Serum Sayısı	Serotip A (+) Serum Sayısı	Serotip O ve A (+) Serum Sayısı	Serotip O Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip A Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip O ve A Koruyucu Titreli Serum Sayısı
Dişi	21	5	1	-	15	-	-	15
Erkek	21	8	1	2	10	-	-	10



Şekil 3.26. Trabzon İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılamadan sonra Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı.



Şekil 3.27. Rize İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

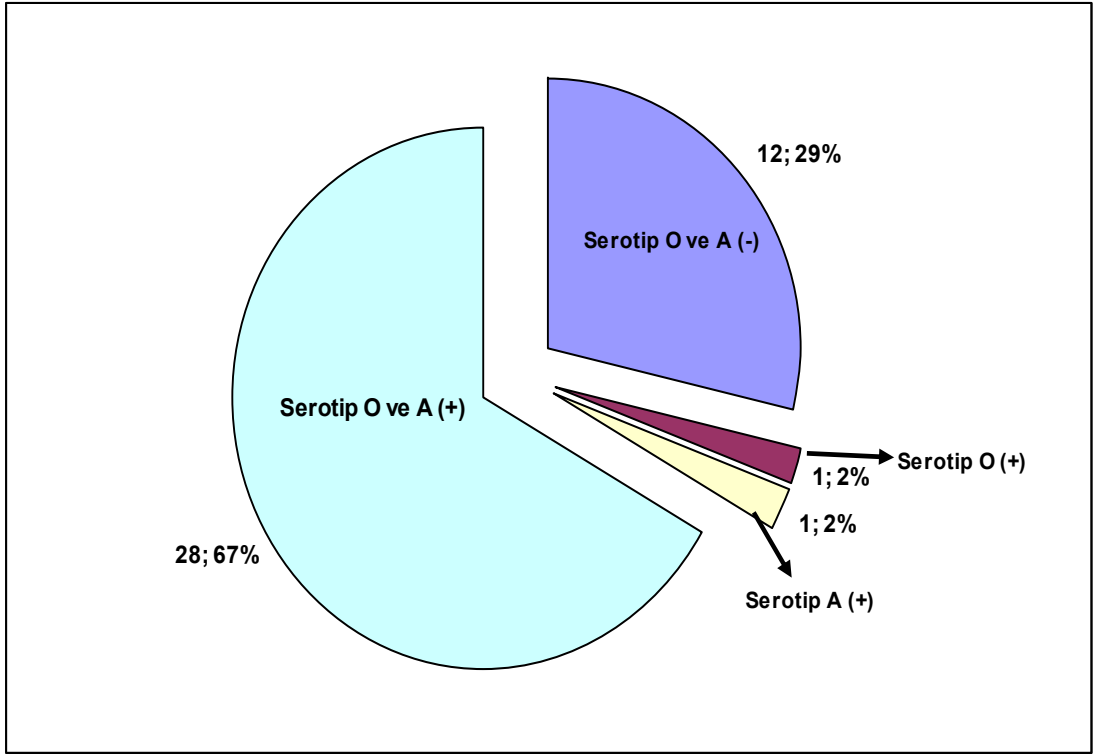


Şekil 3.28. Rize İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

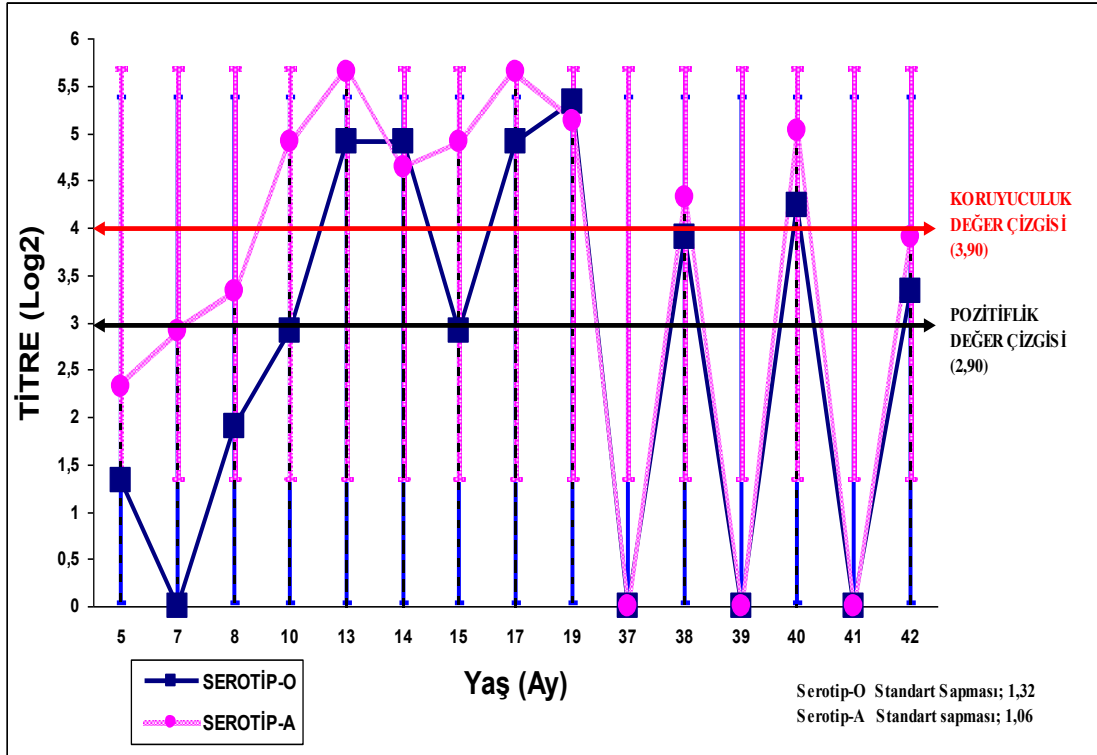
Rize İlindeki küçük aile tipi 13 adet işletmeden elde edilen toplam 42 adet büyükbaş kan serumlarının SPC ELISA ile incelenmesi sonucu şap hastalığına karşı yapılan aşılardan sonra 12 kan serumunun şap virusu O ve A serotiplerine karşı negatif, 1 kan serumunun serotip O, 1 kan serumunun serotip A yönünden ve 28 kan serumunun ise hem serotip O hem de serotip A yönünden pozitif olduğu tespit edildi. 42 adet kan serumunun 2'sinin serotip O, 3'ünün serotip A ve 23'ünün ise serotip O ve A yönünden koruyuculuk düzeyinde antikor titresine sahip olduğu belirlendi. (Çizelge 3.10, Şekil 3.29)

Çizelge 3.10. Rize İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi.

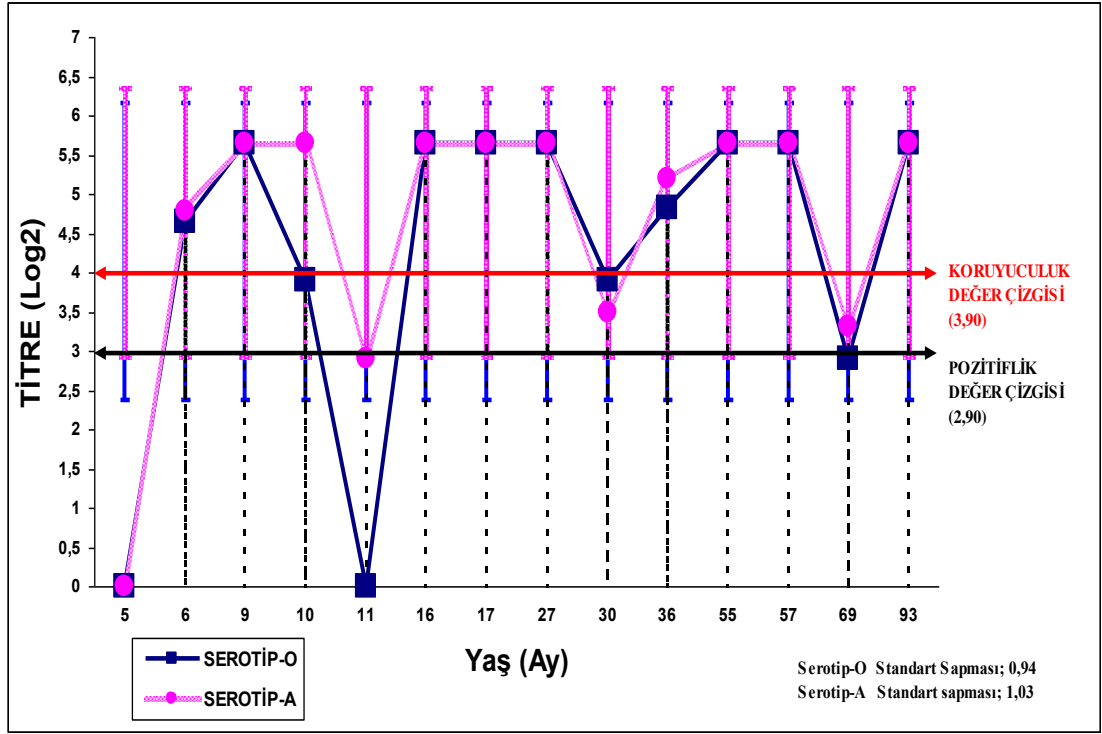
Cinsiyet	Serum Sayısı	Negatif Serum Sayısı	Serotip O (+) Serum Sayısı	Serotip A (+) Serum Sayısı	Serotip O ve A (+) Serum Sayısı	Serotip O Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip A Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip O ve A Koruyucu Titreli Serum Sayısı
Dişi	21	4	1	-	16	1	2	13
Erkek	21	8	-	1	12	1	1	10



Şekil 3.29. Rize İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılamadan sonra Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı.



Şekil 3.30. Artvin İlindeki büyükbaş erkek ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

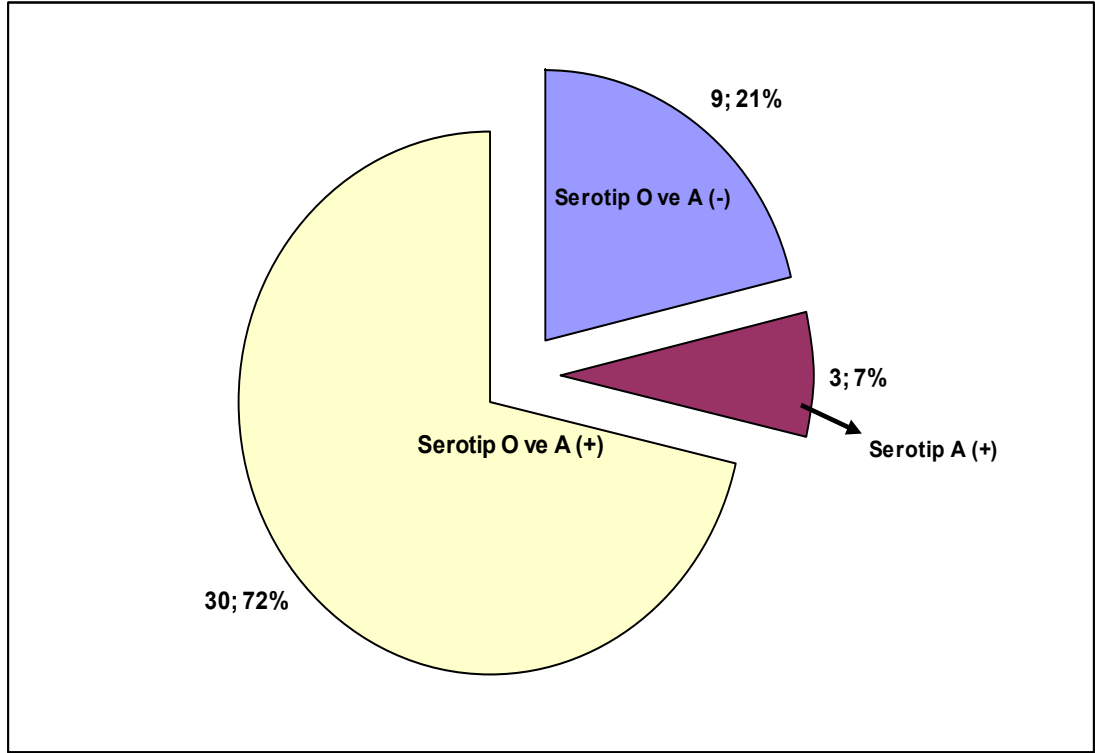


Şekil 3.31. Artvin İlindeki büyükbaş dişi ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının yaşa bağlı değişimi.

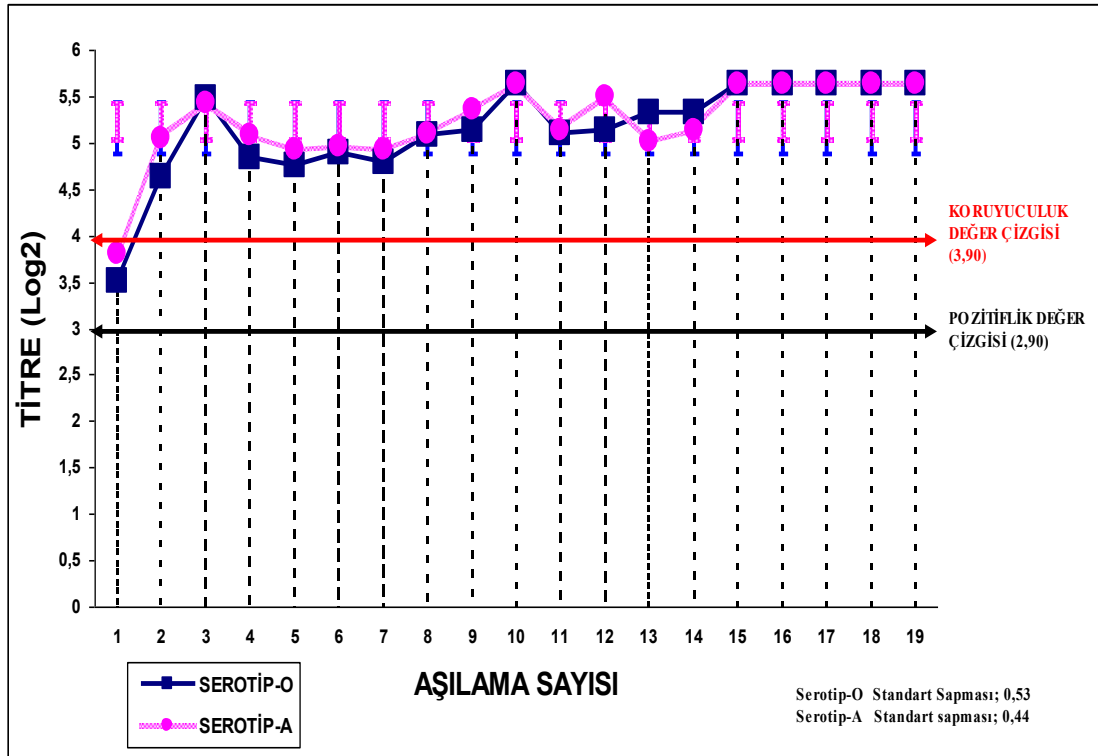
Artvin İlindeki küçük aile tipi 14 adet işletmeden elde edilen toplam 42 adet büyükbaş kan serumlarının SPC ELISA ile incelenmesi sonucu şap hastalığına karşı yapılan aşılardan sonra 9 kan serumunun şap virusu O ve A serotiplerine karşı negatif, 3 kan serumunun serotip A yönünden ve 30 kan serumunun ise hem serotip O hem de serotip A yönünden pozitif olduğu tespit edildi. 42 adet kan serumunun 1'i serotip O, 8'i serotip A ve 20'si ise serotip O ve A yönünden koruyuculuk düzeyinde antikor titresine sahip olduğu belirlendi. (Çizelge 3.11, Şekil 3.32)

Çizelge 3.11. Artvin İlindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi.

Cinsiyet	Serum Sayısı	Negatif Serum Sayısı	Serotip O (+) Serum Sayısı	Serotip A (+) Serum Sayısı	Serotip O ve A (+) Serum Sayısı	Serotip O Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip A Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip O ve A Koruyucu Titreli Serum Sayısı
Dişi	21	3	-	2	16	1	1	13
Erkek	21	6	-	1	14	-	7	7



Şekil 3.32. Artvin İlindeki büyükbaş ruminantların Şap hastalığına karşı yapılan aşılamadan sonra Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikör miktarlarının yüzdesel dağılımı.

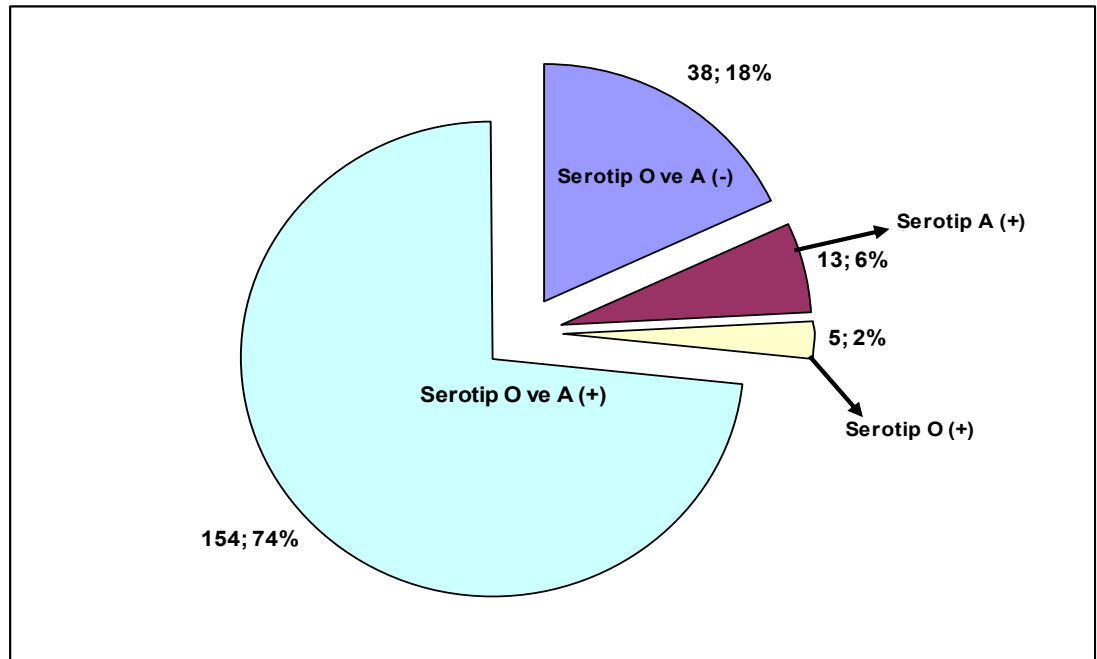


Şekil 3.33. Doğu Karadeniz Bölgesindeki büyükbaş ruminantların O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikör miktarlarının aşılama sayısına bağlı değişimi.

Doğu Karadeniz Bölgesindeki 5 ilde yer alan toplam 71 küçük aile tipi işletmeden elde edilen 210 büyükbaş ruminant kan serumunun SPC ELISA ile incelenmesi sonucu 38 kan serumunun şap virusu O ve A serotiplerine karşı negatif, 5 kan serumunun serotip O, 13 kan serumunun serotip A yönünden ve 154 kan serumunun ise hem serotip O hem de serotip A yönünden pozitif olduğu tespit edildi. 210 adet kan serumunun 5'inin serotip O, 27'sinin serotip A ve 125'inin ise serotip O ve A yönünden koruyuculuk düzeyinde antikor titresine sahip olduğu belirlendi. (Çizelge 3.12, Şekil 3.34)

Çizelge 3.12. Doğu Karadeniz Bölgesindeki büyükbaş ruminantlardan elde edilen kan serumlarındaki, Şap virusu O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarının cinsiyete bağlı değişimi.

Cinsiyet	Serum Sayısı	Negatif Serum Sayısı	Serotip O (+) Serum Sayısı	Serotip A (+) Serum Sayısı	Serotip O ve A (+) Serum Sayısı	Serotip O Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip A Koruyucu Titreli Serum Sayısı	Serotip O ve A Koruyucu Titreli Serum Sayısı
Dişi	105	13	2	5	85	2	10	72
Erkek	105	25	3	8	69	3	17	53



Şekil 3.34. Doğu Karadeniz Bölgesindeki büyükbaş ruminantların Şap virusu O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarının yüzdesel dağılımı.

Ayrıca araştırmada, LPB ELISA ve SPC ELISA yöntemiyle şap virusunun O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor titrelerinin aşılama sayısına bağlı değişimi incelendi. (Çizelge 3.13, Çizelge 3.14)

Çizelge 3.13. Aşılama sayısına bağlı antikor titresi değişiminin LPB ELISA ile incelenmesi.

Serotip O		Serotip A	
Aşılama Sayısı	Antikor Titresi	Aşılama Sayısı	Antikor Titresi
1	45	1	102
2	108	2	194
3	181	3	221
4	48	4	203
5	145	5	190
6	130	6	179

Çizelge 3.14. Aşılama sayısına bağlı antikor titresi değişiminin SPC ELISA ile incelenmesi.

Serotip O		Serotip A	
Aşılama Sayısı	Antikor Titresi	Aşılama Sayısı	Antikor Titresi
1	11	1	14
2	25	2	33
3	45	3	43
4	29	4	34
5	27	5	31
6	30	6	31

3.3. LPB ELISA ve SPC ELISA Test Sonuçlarının Karşılaştırılması

şap virusunun O ve A serotiplerine karşı aşılı hayvanlardan elde edilen kan serumlarındaki antikor miktarlarının belirlenmesinde kullanılan LPB ELISA ve SPC ELISA sonuçları aşağıdaki çizelgelerde gösterildi. (Çizelge 3.15, Çizelge 3.16)

Çizelge 3.15. şap virusu O serotipine karşı oluşan antikor miktarlarının belirlenmesinde kullanılan LPB ELISA ve SPC ELISA testlerinin karşılaştırılması.

Test	İncelenen	Pozitif	%
	Serum Sayısı	Serum Sayısı	
LPB ELISA	210	129	61,4
SPC ELISA	210	159	75,7

Çizelge 3.16. Şap virusu A serotipine karşı oluşan antikor miktarlarının belirlenmesinde kullanılan LPB ELISA ve SPC ELISA testlerinin karşılaştırılması.

Test	İncelenen Serum Sayısı	Pozitif Serum Sayısı	%
LPB ELISA	210	166	79
SPC ELISA	210	167	79,5

3.4. İnfeksiyöz Bovine Rhinotracheitis (IBR), Bovine Viral Diyare (BVD) ve Sığır Löykozunun, Şap Hastalığı Antikor Oluşumu Üzerine Etkileri

Doğu Karadeniz Bölgesinde büyükbaş ruminantlarda görülen BVD, IBR ve löykoz viral hastalıklarının, şap hastalığına karşı gelişen antikorlar üzerine olan etkilerini araştırmak için toplanan 210 adet büyükbaş kan serumu, Pourquier Institut firması tarafından geliştirilen IBR, BVD Antikor, Bovine Löykoz ELISA Kitleri ve BVD Antikor testi sonucu negatif çıkan 104 adet kan serumları ise Idexx laboratuvarları tarafından geliştirilen BVD Antijen ELISA kiti ile analiz edildi. Proje kapsamında kan serumu elde edilen hayvanların IBR, BVD ve Bovine Löykoz hastalıklarına karşı aşılanmadığı tespit edildi. (Çizelge 3.17, Çizelge 3.18)

Çizelge 3.17. Kan serumlarının IBR, BVD Antikor, BVD Antijen ve Löykoz Testleri sonuçları.

Test	İncelenen Serum Sayısı	(+) Serum Sayısı	(-) Serum Sayısı
IBR	210	104	106
BVD Antikor	210	106	104
BVD Antijen	104	2	102
Löykoz	210	1	209

Çizelge 3.18. IBR, BVD Antikor, BVD Antijen ve Löykoz Testleri sonuçları pozitif çıkan serumların Şap virusu Serotip O ve Serotip A yönünden incelenmesi.

Test	İncelenen Serum Sayısı	Şap Virus Serotip O (+) Serum Sayısı	Şap Virus Serotip O Koruyucu Titreye Sahip Serum Sayısı	Şap Virus Serotip A (+) Serum Sayısı	Şap Virus Serotip A Koruyucu Titreye Sahip Serum Sayısı
IBR	104	85	77	88	83
BVD Antikor	106	83	70	90	86
BVD Antijen	2	2	2	2	2
Löykoz	1	1	1	1	1

IBR tespit edilen 104 kan serumunun % 81,7'sinin şap virusu O ve A serotiplerine karşı pozitif ve % 74'ünün koruyucu düzeyde antikor titresine sahip olduğu belirlenmiştir.

BVD antikor tespit edilen 106 kan serumunun % 78,3'ünün şap virusu O ve A serotiplerine karşı pozitif ve % 66'sının koruyucu düzeyde antikor titresine sahip olduğu tespit edilmiştir.

BVD antikor testi sonucu negatif tespit edilen 104 kan serumunun, BVD antijen testi ile incelenmesi sonucunda 2 kan serumunun, BVD antijen yönünden pozitif olduğu belirlenmiştir. Bu 2 örnekten tekrar numune alma imkanı olmadığı için bu kan örneklerinin alındığı hayvanların, BVD yönünden persiste enfekte olabileceği düşünülmektedir. BVD antijen tespit edilen 2 kan serumunun serotip O ve A yönünden hem pozitif hemde koruyucu düzeyde antikor titresine sahip olduğu belirlenmiştir.

Löykoz tespit edilen 1 kan serumunun serotip O ve A yönünden hem pozitif hemde koruyucu düzeyde antikor titresine sahip olduğu tespit edilmiştir.

4. TARTIŞMA

Şap virusu sığır, koyun, keçi domuz gibi çift tırnaklı çiftlik ve yabani hayvanlar arasında oldukça bulaşıcı bir hastalığa neden olan etiyolojik bir ajandır (Huang ve ark 2009). Hastalığın bulaşma derecesinin yüksek olması, çiftlik hayvanları arasında çok önemli miktarda ekonomik kayıplara neden olabilmektedir (Aggarwal ve Barnett 2002).

İhracat ve ithalatı söz konusu hayvanların kontrolünde, şap hastalığına duyarlı vakaların saptanmasında, enfeksiyon yokluğunun doğrulanmasında ve aşılamanın etkisini göstermek amacıyla serolojik testlerden faydalanılmaktadır. Serolojik testler, viral yapısal proteinlere karşı oluşan antikorların belirlendiği testler ve viral yapısal olmayan proteinlere karşı oluşan antikorların belirlendiği testler olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Yapısal proteinlere karşı oluşan antikorların belirlenmesinde kullanılan testler virus nötralizasyon, LPB ELISA ve SPC ELISA testleridir. Antikorların belirlenmesinde kullanılan LPB ELISA ve SPC ELISA testleri, virus nötralizasyon testine göre daha hızlı sonuç vermeleri ve hücre kültürlerine ihtiyaç duymamaları ile ön plana çıkmaktadır Yapısal olmayan proteinlere karşı oluşan antikorların belirlenmesi için kullanılan serolojik testler, enfeksiyonun geçmişte mi yoksa yakın zamanda mı gerçekleştiğini, antikorların aşılama mı yoksa enfeksiyon sonucu mu geliştiğini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (Go'mez ve ark 2006).

Bu çalışmada, Doğu Karadeniz Bölgesinde büyükbaş ruminantların aşılamaya bağlı olarak şap hastalığına karşı sahip oldukları antikor miktarlarını belirlemek için 5 ildeki, 71 aile tipi küçük işletmeden toplam 210 adet büyükbaş hayvandan kan serumu toplandı. Toplanan serumlar yaş (0-11 ay, 12-35 ay, 36-36 ay üstü) ve cinsiyete (dişi-erkek) göre sınıflandırıldı. Sınıflandırılmanın amacı yaş ve cinsiyetin, şap hastalığına karşı yapılan aşılama ile gelişen antikor miktarına etkisini belirlemekdi.

Bölgede Şap Enstitüsü Müdürlüğü tarafından üretilen, yağ adjuvantlı bivalan aşı ile şap virusunun O ve A serotiplerine karşı bir aşılama programı yürütülmektedir. Kan serumu toplanan hayvanlar, şap hastalığına karşı düzenli olarak aşılanan hayvanlardı. Araştırmada kullanılan kan serumları, aşılanmış ve aşılanma zamanı üzerinden 21-30 gün geçmiş hayvanlardan elde edildi. Kan serumlarındaki

şap virusunun O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor miktarları, LPB ELISA ve SPC ELISA testleri ile araştırıldı. Antikor miktarını belirlemede LPB ELISA ve SPC ELISA'nın kullanılmasının nedeni, bu iki serolojik testi karşılaştırmakdı. LPB ELISA ve SPC ELISA kullanılarak yapılan çalışmalarda her iki testin de paralel sonuçlar verdiği bildirilmektedir.

Mackay ve ark (2001) enfeksiyonun görüldüğü veya aşılanmış sığırlardan elde ettikleri serumları LPB ELISA ve SPC ELISA yöntemleri ile inceleyerek şap virusunun O, A ve C serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarını araştırmışlar ve 2 testin sensitivite ve spesifitelerini karşılaştırmışlardır. Araştırmada kullanılan referans serumları (O serotipi için 57 adet, A serotipi için 78 ve C serotipi için 58 adet) hem LPB ELISA hem de SPC ELISA yöntemleriyle pozitif olarak tespit etmişler, LPB ELISA ve SPC ELISA testlerinin sensitivite % 100 olarak belirlemişlerdir. Enfeksiyonun görüldüğü veya aşılanmış hayvanlardan elde ettikleri 65 adet serumun O serotipine karşı incelenmesi sonucu LPB ELISA ile 64 (sensitivite % 98,4) SPC ELISA ile ise 63'ünü (sensitivite % 96,9) pozitif olarak tespit etmişlerdir. A serotipine karşı inceledikleri 24 serumun, 22'si LPB ELISA ile pozitif (sensitivite % 91,7) sonuç verirken, SPC ELISA'da 24'ü pozitif (sensitivite % 100) sonuç vermiştir. C serotipine karşı inceledikleri 24 serumun 24'ü hem LPB ELISA hem de SPC ELISA testinde pozitif sonuç vermiş ve iki testin sensitivitesinin % 100 olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca iki testin spesifitelerini araştırmak için 85 adet sığırdan aldıkları kan serum örneklerini şap virusu O1 BFS 1860 ve A22 IRQ 24/64 serotipleri yönünden incelemişlerdir. O1 BFS 1860 serotipi antikoru için yapılan LPB ELISA testinde 85 adet serumun 73'ünü pozitif, 12'sini negatif olarak tespit etmişler ve testin spesifitesi % 14,1 SPC ELISA testinde ise 85 adet serumun 3'ünü pozitif, 82'sini negatif olarak tespit etmişler ve testin spesifitesini % 96,4 olarak bildirmişlerdir. A22 IRQ 24/64 serotipi antikoru için yapılan LPB ELISA testinde ise 85 adet serumun 48'ini pozitif, 37'sini negatif olarak tespit etmişler ve testin spesifitesi % 43,5; SPC ELISA testinde ise 85 adet serumun 4'ünü pozitif, 81'ini negatif olarak tespit etmişler ve testin spesifitesini % 95,2 olarak belirlemişlerdir.

Niedbalski (2004) yaptığı bir çalışmada, LPB ELISA ve SPC ELISA testlerinin sensitivite ve spesifisitelelerini karşılaştırmıştır. Hastalıktan ari,

aşılammış, virus nötralizasyon testi ile negatif olduğu teyit edilmiş 680 adet negatif sığır serumunun şap virusu O serotipi yönünden LPB ELISA testi ile incelemesi sonucu 627 adet örneği negatif olarak tespit etmiş ve testin spesifitesini, % 92,2 olarak belirlemiştir. 428 adet hastalıktan arı, aşılammış negatif sığır serumlarının serotip O yönünden SPC ELISA testi ile incelemesi sonucu 424 adet serumu negatif olarak tespit etmiş ve testin spesifitesini % 99,1 olarak belirlemiştir. Ayrıca trivalan aşı ile aşılammış sığırlardan elde ettiği 221 adet serumun, 219 adetini (sensitivite % 99,1) LPB ELISA ve 181 adet serumun, 180 adetini (sensitivite % 99,4) SPC ELISA ile serotip O yönünden pozitif olarak tespit etmiştir (Niedbalski 2004).

Smitsaart ve ark (1998) tarafından yapılan bir çalışmada Arjantin'de hastalık görülmeyen ve aşılammış saf sığır ırklarından elde ettikleri 130 adet kan serumunu şap virusunun O, A ve C serotiplerine karşı oluşan antikor miktarları yönünden, LPB ELISA yöntemi ile incelemişler ve LPB ELISA yönteminin spesifitesini % 99 olarak tespit etmişlerdir.

Paiba ve ark (2004) 1 418 adet sığır serumunu SPC ELISA testi ile şap virusu O serotipi yönünden incelemişler ve testin spesifitesini % 99,44 olarak tespit etmişlerdir.

Brocchi ve ark (2004) uluslararası serosürveyans çalışmaları ile negatif olduğu tespit edilen ve rastgele seçilen 993 adet sığır serumunu SPC ELISA testi ile şap virusunun Asia-1 serotipi yönünden incelemişlerdir. SPC ELISA testinde, % 70 inhibisyon değeri altındaki değerler negatif olarak kabul edilmiş ve 983 adet serumun, 975 adeti negatif olarak değerlendirilmiş ve testin spesifitesinin, % 99,18 olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları bir diğer çalışmada İsrail'den, 4 ile 46 aylık yaşlar arasında, 1 ile 4 kez arasında değişen sayılarda trivalan aşı ile aşılammış 436 adet sığırdan ve maternal antikor almış fakat aşılammış, 2 ile 3 aylık yaşlardaki 30 buzağıdan ve Dünya Referans Laboratuvarı, Almanya, Hollanda, Rusya ve Pirbright Referans Laboratuvarlarında deneysel olarak Asia-1 serotipi ile enfekte edilmiş veya aşı potens çalışmalarında kullanılan 200 sığırdan elde ettikleri toplam 666 seropozitif sığır serumunun, Asia-1 serotipi yönünden SPC ELISA ile incelemeleri sonucunda testin sensitivitesini % 99,7 olarak tespit etmişlerdir (Brocchi ve ark 2004).

Bu çalışmada aşıllı hayvanlardan elde edilen 210 adet serumda, LPB ELISA ile O ve A serotiplerine karşı antikor düzeyleri sırasıyla % 61,4 ve % 79 olarak belirlendi. Serotip A'ya karşı gelişen antikor düzeyinin, serotip O'dan daha yüksek olduğu tespit edildi. Bu tespit SPC ELISA sonuçları ile doğrulandı. SPC ELISA testinde 210 adet serumun, % 61,90'unda serotip O, % 72,38'inde serotip A antikoruna tespit edildi. Elde edilen bu veriler, Habiela ve ark (2010) tarafından yapılan araştırma sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Habiela ve ark (2010) tarafından LPB ELISA yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada, 469 aşıllı sığırdan elde edilen kan serum örneklerindeki şap virusunun O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarları sırasıyla % 69,39 ve % 78,13 olarak belirlemişlerdir.

LPB ELISA ve SPC ELISA testleri, şap virusu serotiplerine karşı oluşan antikorları belirlemek ve enfeksiyon yokluğunun doğrulanması amacıyla çeşitli araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır.

Martinez ve ark (2000) 120 adet şap hastalığına karşı trivalan aşı ile aşılanmış, 120 adet enfekte ve 120 adet şap hastalığından ari sığırlardan elde ettikleri toplam 360 adet sığır serumunu, O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarını belirlemek için LPB ELISA ile incelemişlerdir. Bütün serumları 1/32 dilüsyon titresinde incelerken, pozitif serumları 1/10 dilüsyondan başlayarak 1/1250 dilüsyonuna kadar test etmişlerdir. Şap hastalığından ari hayvanlardan elde ettikleri 120 serumun, 108'ini O1 Cruzeiro 108 serotipi antikoruna yönünden negatif tespit etmişler ve testin spesifitesini % 90 olarak belirlemişlerdir. Şap hastalığı ile enfekte 120 hayvandan elde ettikleri serumların 114'ünü, trivalan aşı ile aşılanmış hayvanlardan elde edilen 120 serumun 115'ini, O1 Cruzeiro 108 serotipi antikoruna yönünden pozitif tespit etmişler, testlerin sensitivitesini sırasıyla % 95 ve % 96 olarak belirlemişlerdir. Şap hastalığından ari hayvanlardan elde ettikleri 120 serumun, 85'ini A24 Cruzeiro serotipi antikoruna yönünden negatif tespit etmişler ve testin spesifitesini % 71 olarak belirlemişlerdir. A24 Cruzeiro serotipi antikoruna yönünden inceledikleri, şap hastalığı ile enfekte 120 hayvandan elde ettikleri serumların 90'ını, trivalan aşı ile aşılanmış hayvanlardan elde edilen 120 serumun 99'unu pozitif olarak tespit etmişler ve testlerin sensitivitesini sırasıyla % 75 ve % 82 olarak bildirmişlerdir (Martinez ve ark 2000).

Psikal ve ark (1995) tarafından yapılan bir çalışmada, 50 sığırdan elde edilen kan serum örneklerindeki şap virusunun O, A ve C serotiplerine karşı oluşan antikor miktarları LPB ELISA yöntemiyle incelenmiştir. 50 serum örneğinin 20 adetini ticari inaktif trivalan aşısı ile aşılanmış hayvanlardan, 30 tanesini ise 1 yıldan fazla süredir aşılanmayan hayvanlardan elde etmişlerdir. Toplanan örnekleri 2 laboratuvara daha göndererek LPB ELISA testi ile antikor miktarlarını araştırmışlardır. Serumlarda A5, O1 ve C1 antiijenlerine karşı sırasıyla % 58, % 66 ve % 58 oranında antikor olduğunu tespit etmişlerdir. Elde edilen sonuçları, sığırlarda şap hastalığına karşı yapılan serolojik çalışmalardaki sonuçlarla karşılaştırmışlar ve şap virusunun 3 serotipinden en az birine karşı serum örneklerinde % 70 antikor olduğunu bildirmişlerdir. Şap virusunun 3 serotipine karşı antikor miktarlarını belirleyen LPB ELISA sonuçları, laboratuvarlar arasında % 96 oranında benzerlik göstermiş ve tip spesifitesi açısından farklılıkların % 10'u geçmediği gözlenmiştir.

Palanisamy ve ark (2000) 1995-1996 yılları arasında Malezya yarımadası sınırındaki 10 bölgeden topladıkları toplam 800 adet sığır serumunu 1/32 serum dilüsyonunda % 50 inhibisyon değerinde incelemişler ve örnekler arasından pozitif olarak tespit ettikleri serumları 1/64 ve 1/128'in 2 katlı dilüsyonlarını yaparak her bir serotip için sahip oldukları koruyuculuk düzeylerini belirlemişlerdir. Antikor titresinin 90 ve üzeri olduğu örnekleri, koruyucu değere sahip olarak değerlendirmişlerdir. Serum örneklerinin, LPB ELISA testi ile incelenmesi sonucunda serotip O'ya karşı % 51, serotip A'ya % 37,3 ve hem O hem de A serotiplerine karşı % 28,9 düzeyinde antikor titresinin bulunduğunu belirlemişlerdir.

Ko ve ark (2009) 2000 yılında, Güney Kore'deki salgından sonra 2 kez trivalan aşı ile aşılanmış 68 adet sığırdan elde ettikleri serumları Asia-1 serotipine karşı LPB ELISA testi ile incelemişler ve 2 adet örneğin negatif olduğunu tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada LPB ELISA'nın yanlış pozitiflik oranının % 4 olduğunu ve bu oranın aşısız hayvanlarda % 18'e kadar çıkabileceğini bildirmişlerdir.

Vergara ve ark (2000) aşılanmamış ve aşılanmış sığırlardan topladıkları kan serumu örneklerindeki, şap virusunun O, A ve C serotiplerine karşı oluşan antikor miktarlarını, LPB ELISA yöntemi ile araştırmışlardır. İlk grupta enfeksiyon görülmeyen ve aşılanmamış 120 adet sığırdan topladıkları kan serumlarını 1/32

serum dilüsyonunda incelemişler, O serotipine karşı 1 adet, A serotipine karşı 17 adet örneği pozitif olarak tespit etmişlerdir. İkinci grupta trivalan aşı ile aşılanmış hayvanlardan elde ettikleri 120 adet sığır serumunu, 1/10 dan başlayarak 1/1 250'ye kadar 5 katlı serum dilüsyonu yapılmışlar ve O serotipine karşı 84 adet, A serotipine karşı 26 adet ve C serotipine karşı 79 adet örneği pozitif olarak belirlemişlerdir.

Şap aşılmasına bağlı olarak antikor düzeyini belirlemek için yaptığımız bu çalışmada yaş grupları (0-11 ay, 12-35 ay, 36-36 ay üstü) arasında antikor düzeyleri sırasıyla, serotip O'ya karşı % 49,9, %76,7, % 77,8 ve serotip A'ya karşı % 68,5, % 87,8 ve % 81,35 olarak tespit edildi. Serotip A'ya karşı oluşan antikor düzeylerinin her yaş grubunda, serotip O antikor düzeylerinden daha yüksek olduğu belirlendi. Benzer bir çalışma Smitsaart ve ark (1998) tarafından da yapılmıştır.

Smitsaart ve ark (1998) Arjantin'de yaptıkları çalışmada, quadrivalent (O1C, A79, A87 and C85) yağ advuvantlı aşılardan sonraki 90'ıncı günde, Buenos Aires bölgesindeki 2 ayrı yerel bölgedeki sığırlardan 1994 ve 1995 yılları arasında serumlar toplanmış, bunlar yaşlarına göre gruplandırılmış (6-12 ay, 13-24 ay, 24 ay üstü) ve LPB ELISA yöntemi ile şap virusunun O ve A serotiplerine karşı oluşan antikor düzeyleri belirlenmiştir. 6-12 aylık hayvanların hiç veya 1 kez, 13-24 aylık hayvanların 2 veya 3 kez, 24 ay üstü hayvanların ise en az 4 kere aşılandığını varsaymışlardır. Araştırmada % 75'den düşük antikor miktarlarına sahip sürüler düşük immuniteli, % 75 - % 85 arası orta seviyeli ve % 85 üzeri yüksek seviyeli immuniteli sürüler olarak değerlendirilmiştir. İki yerel bölgeden yaşları 6 ile 12 ay arasında değişen 379 sığırdan elde ettikleri serumların O serotipi yönünden 56'sının orta seviyeli, 290'nın yüksek seviyeli, A serotipi yönünden ise 45'inin orta seviyeli, 313'ünün yüksek seviyeli immuniteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Yaşları 13 ile 24 ay arasında değişen 360 sığırdan elde ettikleri serumların O serotipi yönünden 24'ünün orta seviyeli, 336'sının yüksek seviyeli, A serotipi yönünden ise 21'inin orta seviyeli, 339'unun yüksek seviyeli immuniteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. 24 aylıktan büyük 398 sığırdan elde ettikleri serumların O serotipi yönünden 13'ünün orta seviyeli, 379'unun yüksek seviyeli, A serotipi yönünden ise 7'sinin orta seviyeli, 389'unun yüksek seviyeli immuniteye sahip olduğunu bildirmişlerdir (Smitsaart ve ark 1998).

Smitsaart ve ark (1998) tarafından yapılan bu çalışma da farklı yaş grupları

arasında şap virusunun A serotipine karşı oluşan antikor miktarının, O serotipine karşı oluşan antikor miktarından daha fazla olduğunu bildirmektedir.

Ayrıca yaptığımız bu çalışmada yaşla birlikte orantılı olarak şap virusunun O ve A serotiplerine karşı koruyucu düzeyde antikora sahip olma oranının arttığı gözlemlendi. 3-11 aylık hayvanların serotip O ve A'ya karşı koruyucu antikor düzeyi % 28,5 iken 12-35 aylık hayvanların % 68,5 ve 36 ay üstü yaşlardaki hayvanlarda % 71,4 olarak tespit edildi. Bu tespit, Sil ve Taimur (2000) tarafından yapılan çalışmada elde edilen sonuçlarla da desteklenmektedir.

Sil ve Taimur (2000) yaptıkları araştırmada, 3-18 aylık hayvanların şap hastalığına karşı duyarlılıklarını, LPB ELISA ile incelemişlerdir. 0-3 aylık buzağılarda şap hastalığına karşı korunma düzeyini % 26,35; 6-12 aylık düvelerde % 82,28 ve 12-18 aylık ineklerde % 83,94 olduğunu bildirmişlerdir.

Şap aşılmasına bağlı olarak gelişen antikor yanıtına, cinsiyetin etkinisini belirlemek için yaptığımız bu çalışmada, 105 adet dişi hayvandan elde edilen serumların, 68'i (% 64,7) serotip O ve A'ya karşı koruyucu düzeyde antikora sahip iken 105 adet erkek hayvandan elde edilen serumların, 51'inin (% 48,5) serotip O ve A'ya karşı koruyucu düzeyde antikora sahip olduğu belirlendi. İstatiksel açıdan şap virusu O ve A serotiplerine karşı koruyucu düzeyde antikora sahip dişi sayısı önemli bulundu. (Fisher'in kesin khi-kare testi; $P < 0,01$) Bu sonuç, Sil ve Taimur (2000) tarafından yapılan araştırmada şap hastalığına erkek hayvanların, dişi hayvanlardan daha duyarlı oldukları tespiti ile uyumludur.

Sil ve Taimur (2000) 1995-1999 yılları arasında Bangladeş'te şap hastalığı salgınları görülen bölgelerdeki 21 563 çift tırnaklı hayvan üzerinde LPB ELISA yöntemiyle yaptıkları çalışmada hayvanların % 49,16'sının (10 601/21 563) şap virusu ile enfekte olduğunu, enfekte hayvanlar arasında sığırların hastalığa en duyarlı olduğunu (% 96,43), sığırları bufalo (% 1,01), keçi (% 2,27) ve koyunların (% 0,27) takip ettiğini bildirmişlerdir. Sığırlar arasında da en duyarlı hayvanların sırasıyla buzağılar (% 35,69), boğalar (% 32,55) ve inekler (% 31,44) olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca yaptıkları çalışmada şap hastalığına yerli olmayan hayvan ırklarının (% 69,89), yerli ırklardan (% 30,11) daha duyarlı olduğunu belirlemişlerdir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma ile Doğu Karadeniz Bölgesindeki büyükbaş ruminantların şap aşılmasına bağlı olarak sahip oldukları antikor düzeyleri, OIE tarafından kabul edilmiş serolojik testler arasında yer alan LPB ELISA ve SPC ELISA testleri ile belirlenmiştir. Doğu Karadeniz Bölgesinde büyükbaş ruminantların şap virusunun O ve A serotiplerine karşı sahip oldukları antikor düzeyi % 65,7 olarak belirlenirken, koruyucu antikor düzeyi % 61,9 olarak tespit edilmiştir. Bu oranlar hastalıktan korunma ve mücadele için yeterli olmayıp, bölgede hastalıkla mücadele tedbirlerinin daha sıkı uygulanması gerektiği düşünülmektedir.

Bu bölgedeki aşılı hayvanlardan elde edilen 210 kan serumunun 121 (% 57,6)'inde serotip O'ya, 152 (% 72,3)'sinde serotip A'ya karşı koruyucu düzeyde antikor tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler aşılama hayvanlarda, şap virusunun O serotipine karşı oluşan antikor miktarının düşük olduğunu ve serotip A'ya göre daha kısa sürede azaldığını göstermektedir. Dolayısıyla şap virusunun O serotipine bağlı salgınların görüldüğü bölgelerde aşılama sıklıklarının yeniden düzenlenerek, O serotipine karşı yeterli düzeyde antikor miktarının gelişmesi sağlanarak hastalıkla mücadele edilebilir.

Aşılama sayısına bağlı olarak O ve A serotiplerine karşı gelişen antikor miktarlarının ilk üç aşılama ile arttığı, dördüncü aşılama sonrası düştüğü ve daha sonraki aşılama ile tekrar yükseldiği belirlenmiştir. İlk üç aşılama O ve A serotiplerine karşı aşılama ile daha kısa sürede antikor yanıtının oluştuğu ve oluşan antikor yanıtının giderek daha uzun süre devam ettiği, dördüncü aşılamanın antikor yanıtının kuvvetli bir şekilde devam ettiği zamanda uygulanmasıyla, aşı ile birlikte verilen antijenlerin mevcut antikor titrelerinin düşmesine neden olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca cinsiyetin, şap hastalığında etkisini araştırmak amacıyla yapılan bu çalışmada, dişi hayvanların serotip O ve A'ya karşı sahip oldukları koruyucu düzeydeki antikor miktarı % 64,7 iken, erkek hayvanlarda bu oran % 48,5 olarak belirlenmiştir. Dişi hayvanlarda, aşılama ile ilgili olarak şap hastalığına karşı daha kuvvetli bir antikor yanıtının geliştiği tespit edilmiştir.

Aşılı hayvanlardan elde ettiğimiz kan serumlarının, şap virusu serotiplerine karşı sahip oldukları antikor miktarlarını belirlemede kullanılan LPB ELISA ve SPC ELISA testleri karşılaştırıldığında 210 adet aşılı hayvandan elde ettiğimiz serumun, LPB ELISA ile 129'u (% 61,4) serotip O yönünden pozitif tespit edilmişken, SPC ELISA testi ile 159'u (% 75,7), serotip A yönünden ise LPB ELISA ile 166 (% 79), SPC ELISA testi ile de 167'si (% 79,5) pozitif olarak tespit edilmiştir.

Bu verilere ve daha önce yapılan araştırmalarda SPC ELISA'nın sensitivitesinin, LPB ELISA'dan yüksek olduğunun belirlenmesine dayanarak, şap hastalığına karşı aşılanmış hayvanlardan elde edilen serumların antikor miktarlarını belirlemede, SPC ELISA testinin daha duyarlı olduğu düşünülmektedir.

6. ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Doğu Karadeniz Bölgesinde Şap Aşısı Uygulanan Büyükbaş Ruminantların Serumlarındaki Antikor Miktarlarının Likit Faz Bloking ELISA ve Solid Faz Kompetitif ELISA ile Belirlenmesi

Murat ŞEVİK

Danışman

Prof.Dr. Feridun ÖZTÜRK

Viroloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2011

Bu çalışmada, yağ adjuvanlı bivalan aşısı (O1 Manisa, A22 Irak şap virusu suşlarını içeren) ile aşılan sığırlarda üretilen antikor miktarlarını belirlemek için likit faz bloking ELISA (LPB) ve solid faz kompetitif ELISA (SPC) kullanıldı. Aşılanmış sığırlar yaş (0-11 ay, 12-35 ay, 36 ay ve üstü) ve cinsiyete (dişi-erkek) göre 6 gruba sınıflandırıldı. Aşılamadan 3 hafta sonra tesadüfi olarak 210 adet kan serumu toplandı. Serumlar, Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki 71 adet farklı işletmeden elde edildi.

210 serumun 144 (% 68,5)'ünde serotip O, 167 (% 79,5)'sinde serotip A antikorları belirlendi. Serotip O'ya karşı 121 (% 57,6), serotip A'ya karşı 152 (% 72,3) hayvanda koruyucu düzeyde antikor tespit edildi. Serotip O'ya karşı koruyucu antikor düzeyi, yaş gruplarında (0-11 ay, 12-35 ay, 36 ay ve üstü) sırasıyla % 34,2, % 71,4 ve % 72,8 idi. Serotip A'ya karşı koruyucu antikor düzeyi, yaş gruplarında sırasıyla % 58,5, % 82,8 ve % 77,1 idi. 105 dişi serumun, serotip O'ya karşı 69 (% 65,7), serotip A'ya karşı 83 (% 79)'ünde koruyucu düzeyde antikor tespit edildi. 105 erkek serumun, serotip O'ya karşı 52 (% 49,5), serotip A'ya karşı 69 (% 65,7)'unda koruyucu düzeyde antikor tespit edildi. Erkek ve dişi hayvanlar arasındaki bu fark istatistiksel olarak önemli idi. ($P < 0.01$)

Sonuçlar, aşılama sayısı ile orantılı olarak antikor düzeyinin arttığını ve dişi hayvanların erkek hayvanlardan daha yüksek antikor seviyelerine sahip olduklarını ve O serotipi antikor düzeyinin, A serotipine göre daha kısa sürede azaldığını göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Şap Hastalığı; Sığır; Antikor; LPB ELISA; SPC ELISA

7. SUMMARY

Evaluation of Serum Antibody Profiles with Liquid-Phase Blocking ELISA and Solid-Phase Competition ELISA from FMD Vaccinated Cattles which are Located in East Black Sea Region

In this study liquid-phase blocking ELISA (LPB ELISA) and solid-phase competition ELISA (SPC ELISA) were used to measure antibodies produced in cattle vaccinated with oil-adjuvanted bivalent vaccine (containing O1 Manisa, A22 Irak FMDV strains). Vaccinated cattle were classified into six groups according to the age (0-11 months, 12-35 months, and older than 35 months) and sex (male-female). 210 blood serum samples were randomly collected 3 weeks after vaccination. They belonged to 71 different farms located in East Black Sea Region.

Serotype O antibody was detected in 144 (68,5%) and serotype A antibody in 167 (79,5%) of 210 sera. Antibodies above protection level against serotype O were detected in 121 (57,6%) animals and against serotype A in 152 (72,3%) animals. Levels of protected antibody against serotype O in each age group (0-11 months, 12-35 months, and older than 35 months) were 34,2%, 71,4% and 72,8% respectively. Levels of protected antibody against serotype A in each age group were 58,5%, 82,8% and 77,1% respectively. Protective level of antibody against to serotype O was detected in 69 (65,7%) and serotype A antibody in 83 (79%) of 105 female sera. Protective level of antibody against to serotype O antibody was detected in 52 (49,5%) and serotype A antibody in 69 (65,7%) of 105 male sera. This difference between female and male animals was statistically important ($P < 0.01$)

Results showed that antibody levels proportionally increased with number of vaccination and female animals have higher antibody levels than male animals, and levels of antibodies against serotype O decrease in a short time than serotype A.

Key words: Foot and Mouth Disease; Cattle; Antibody; LPB ELISA; SPC ELISA

8. KAYNAKLAR

1. Aftosa F. Foot and Mouth Disease. The center for Food Security & Public Health. 2007 [cited 2007 Semp 24] Available from URL: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/foot_and_mouth_disease.pdf
2. Aggarwal N, Barnett PV. Antigenic sites of foot and mouth disease virus (FMDV): an analysis of the specificities of anti FMDV antibodies after vaccination of naturally susceptible host species. *Journal of General Virology*. 2002;83: 775–782.
3. Alexandra de P, Gomes C. Surface plasmon resonance as a tool in the functional analysis of an immunodominant site in foot and mouth disease virus. *Barcelona, Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry Division of Experimental and Mathematical Sciences. University of Barcelona, Doktora tezi*. 2000: 27-44.
4. Alexandersen S, Zhang Z, Donaldson AI, Garland AJM. The Pathogenesis and Diagnosis of Foot and Mouth Disease. *J. Comp. Path.* 2003;129: 1-36.
5. Alonso A, Martins MA, Gomes MPD, Allende R, Söndahl MS. Foot and mouth disease virus typing by complement fixation and enzyme-linked immunosorbent assay using monovalent and polyvalent antisera. *Vet Diagn Invest*. 1992;4: 249-253.
6. Arnold ME, Paton DJ, Ryan E, Cox SJ, Wilesmith JW. Modelling studies to estimate the prevalence of foot and mouth disease carriers after reactive vaccination. *Proc. R. Soc. B*. 2008; 275: 107–115.
7. Ayelet G, Mahapatra M, Gelaye E, Egziabher BG, Rufeal T, Sahle M, Ferris NP, Wadsworth J, Hutchings GH, Knowles NJ. Genetic Characterization of Foot and Mouth Disease Viruses, Ethiopia, 1981–2007. *Emerging Infectious Diseases*. 2009;15: 1409-1417.
8. Barteling SJ. Development and performance of inactivated vaccines against foot and mouth disease. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 2002;21: 577-588.
9. Baxi MK, Baxi S, Clavijo A, Burton KM, Deregt D. Microarray based detection and typing of foot and mouth disease virus. *Elsevier Science B.V.* 2006;172: 473-481.
10. Beard C, Ward G, Rieder E, Chinsangaram J, Grubman MJ, Mason PW. Development of DNA vaccines for foot and mouth disease, evaluation of vaccines encoding replicating and non-replicating nucleic acids in swine. *Journal of Biotechnology*. 1999;73: 243–249.
11. Blancou J. History of the control of foot and mouth disease. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 2002;25: 283–296.
12. Brehm KE, Kumar N, Thulke HH, Haas B. High potency vaccines induce protection against heterologous challenge with foot and mouth disease virus. *Vaccine*. 2008;26: 1681-1687.
13. Brocchi E, Grazioli S, Yadin H, Simone F. Validation of a Solid Phase Competitive ELISA (SPBE) based on the use a single neutralising monoclonal antibody for the measurement of antibodies to FMDV type Asia 1. Report of Sess. Res. Gr. St. Tech. Committee of the European Commission for the Control of Foot and Mouth Diseas. 11-15 October 2004. Appendix 45, 288-297. Chania, Crete, Greece.
14. Cao Y, Lu Z, Liu Z, Xie Q. Comparison of Three ELISA Kits for the Differentiation of Foot and mouth Disease Virus-infected from Vaccinated Animals. *Virologica Sinica*. 2007;22: 74-79.
15. Center for Food Security and Public Health. Foot and Mouth Disease (FMD). [cited 2006 June 1] Available from URL: http://www.cfsph.iastate.edu/BRMForProducers/English/FADs/FMD_extension_factsheet.pdf

16. Center for Food Security and Public Health. The Plum Island Animal Disease Center (PIADC) [cited 2009]. Available from URL: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease-images.php?name=foot-and-mouth-disease&lang=en>
17. Che'nard G, Miedema K, Moonen P, Schrijver RS, Dekker A. A solid phase blocking ELISA for detection of type O foot and mouth disease virus antibodies suitable for mass serology. *Journal of Virological Methods*. 2003;107: 89-98.
18. Clavijo A, Kitching P. The Nature and Diagnosis of Foot and Mouth Disease. *National Centre for Foreign Animal Disease*. 2003;25: 81-88.
19. Clercq K. Foot and mouth disease virus detection based on a diagnostic method or an integrated quality controlled strategy. 2003 Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of EuFMD. Appendix 14. 2003;14: 97-101. Belçika.
20. Clercq K, Goris N, Barnett PV, MacKay DK. The Importance of Quality Assurance/Quality Control of Diagnostics to Increase the Confidence in Global Foot and Mouth Disease Control. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2008;55: 35-45.
21. Cunliffe HR. Observations on the duration of immunity in cattle after experimental infection with FMDV. *Cornell Vet*. 1964;54: 501-510.
22. Davies G. Foot and mouth disease. *Research in Veterinary Science*. 2002;73: 195-199.
23. De Diego MB, Brocchi E, Mackay D, De Simono F. The use of the non-structural polyprotein 3ABC of FMD virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Archives of Virology*. 1997;142: 2021-2033.
24. Domingo E, Baranowski E, Escarmis C, Sobrino F. Foot and mouth disease virus. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 2002;25: 297-308.
25. Donaldson AL, Alexandersen S. Predicting the spread of foot and mouth disease by airborne virus. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*. 2002;21: 569-575.
26. Foot and mouth Disease Distribution Maps. OIE 2011. [cited 2011]. Available from URL: http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_status_map.
27. Gómez MI, O'Seaghda M, Magargee M, Foster TJ, Prince AS. Staphylococcus aureus protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. *J Biol Chem. The Journal Of Biological Chemistry*. 2006;281: 20190-20196.
28. Grubman MJ, Baxt B. Foot and Mouth Disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 2004;17: 465-493.
29. Habiela M, Alamin MAG, Raouf YA, Ali YH. Epizootiological study of foot and mouth disease in the Sudan: the situation after two decades. *Veterinarski Arhiv*. 2010;80: 11-26.
30. Hamblin C, Barnett ITR, Crowther JR. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot and mouth disease virus I. Development and method of ELISA *Journal of Immunological Methods*. 1986a;93: 115-121.
31. Hamblin C, Barnett ITR, Crowther JR. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot and mouth disease virus II. Application *Journal of Immunological Methods*. 1986b;93: 123-129.
32. Huang X, Li Y, Zheng C. A novel single-cell quantitative real-time RT-PCR method for quantifying foot and mouth disease viral RNA. *Journal of Virological Methods*. 2009;155: 150-156.

33. Hunter P. Vaccination as a means of control of foot and mouth disease in sub-saharan Africa. *Vaccine*. 1998;16: 261-264.
34. Hyslop NSTG. Transmission of the virus of foot and mouth disease between animals and man. *World Health Org.* 1973;49: 577-585.
35. Iyer AV, Ghosh S, Singh SN, Deshmukh RA. Evaluation of three 'ready to formulate' oil adjuvants for foot and mouth disease vaccine production. *Vaccine* 2001;19: 1097–1105.
36. Jackson AL, O'Neill H, Maree F, Blignaut B, Carrillo C, Rodriguez L, Haydon DT. Mosaic structure of foot and mouth disease virus genomes. *Journal of General Virology*. 2007;88: 487-492.
37. Kitching P. Foot and mouth disease: current world situation. *Vaccine*. 1999;17: 1772-1774.
38. Klein J. Understanding the molecular epidemiology of foot and mouth disease virus. Elsevier Science B.V. 2009;9: 153-161.
39. Knowles NJ, Nazem Shirazi MH, Wadsworth J, Swabey KG, Stirling JM, Statham RJ, Li Y, Hutchings GH, Ferris NP, Parlak U, ÖZYÖRÜK F, Sumption KJ, King DP, Paton DJ. Recent Spread of a New Strain (A-Iran-05) of Foot and Mouth Disease Virus Type A in the Middle East. *Blackwell Verlag GmbH, Transboundary and Emerging Diseases*. 2009;56: 157-169.
40. Ko YJ, Jeoung HY, Lee HS, Chang BS, Hong SM, Heo EJ, Lee KN, Joo HD, Kim SM, Park JH, Kweon CH. A recombinant protein-based ELISA for detecting antibodies to foot and mouth disease virus serotype Asia 1. *Journal of Virological Methods*. 2009;159: 112–118.
41. Leforben Y, Gerbier G, Review of the status of foot and mouth disease and approach to control/eradication in Europe and Central Asia. *Rev.Sci.Tech.Off.Int.Epiz.* 2002a;21: 477-492.
42. Leforben Y, Gerbier G, Rweyemamu M, Action of FAO in the control of foot and mouth disease. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 2002b;25: 373–382.
43. Mackay DKJ, Bulut AN, Rendle T, Davidson F, Ferris NP. A solid-phase competition ELISA for measuring antibody to foot and mouth disease virus. *Journal of Virological Methods*. 2001;97: 33–48.
44. Mahy BWJ. *Foot and Mouth Disease Virus*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 2005; 2-167.
45. Mann Ja, Sellers Rf, *Foot and Mouth Disease Virus In: Dinter Z, Morein B, ed. Virus Infections of Ruminants, Volume:3. AE Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV; 1990: 503-511.*
46. Martinez CS, Quintero M. The Use Of A Liquid Phase Blocking ELISA Kit For Detection of Antibodies Against Foot and Mouth Disease Virus In Colombia. [cited 2000]. Available from URL: <http://www-naweb.iaea.org/nafa/aph/public/sanchez-partb-1055.pdf>
47. Mason PW, Grubman MJ, Baxt B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV. Elsevier Science B.V. 2003;91: 9-32.
48. Morrell DJ, Mellor EJC, Rowlands DJ, Brown F. Surface Structure and RNA-Protein Interactions of Foot and Mouth Disease Virus. *J.Gen.Virol.* 1987;68: 1649-1658.
49. Mouchantat S, Haas B, Lutz W, Pohlmeier K, Frölich K. Absence of Antibodies to Foot and Mouth Disease Virus in Free-ranging Roe Deer from Selected Areas of Germany (2001–2002). *Journal of Wildlife Diseases*. 2005;41: 599–605.
50. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. *Veterinary Virology*. Third Edition, San Diego, California, 1999;521-527.

51. Nagendrakumar SB, Madhanmohan M, Rangarajan PN, Srinivasan VA. Genetic analysis of foot and mouth disease virus serotype A of Indian origin and detection of positive selection and recombination in leader protease and capsid coding regions. *J. Biosci.* 2009; 34: 85-101.
52. Nazlıoğlu M, Örün H. Türkiye’ de Şap Hastalığının Epidemiyolojisi, kontrolü ve Ekonomik zararları üzerine araştırmalar. Ankara: Ongun Kardeşler Matbaası; 1969. p. 15-53.
53. Niedbalski W. Comparison Of Different ELISA Methods For The Detection Of Antibodies Against Foot And Mouth Disease Virus (Fmdv) Type O. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 2004;48: 5-9.
54. Nordengrahn A, Gustafsdottir SM, Ebert K, Reid SM, King DP, Ferris NP, Brocchi E, Grazioli S, Landegren U, Mezra M. Evaluation of a novel proximity ligation assay for the sensitive and rapid detection of foot and mouth disease virus. *Veterinary Microbiology.* 2008;127: 227–236.
55. O’Donnell VK, Boyle DB, Sproat K, Fondevila NA, Forman A, Schudel AA, Smitsaart EN. Detection of antibodies against foot and mouth disease virus using a liquid phase blocking sandwich ELISA (LPBE) with a bioengineered 3D protein. *Vet Diagn Invest.* 1996;8: 143-150.
56. OIE Terrestrial Manual. Foot And Mouth Disease. Chapter 2.1.5. NB: Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE. 2009:1-29.
57. OIE. Recognition of the Foot and Mouth Disease Status of Members. Resolution No. 14. Paris. 2011:4-7
58. Paiba GA, Anderson J, Paton DJ, Soldan AW, Alexandersen S, Corteyn M, Wilsden G, Hamblin P, MacKay DKJ, Donaldson AI. Validation of a foot and mouth disease antibody screening solid phase competition ELISA (SPCE). *Journal of Virological Methods.* 2004;115: 145–158.
59. Paixão TA, Neta AVC, Paiva NO, Reis JR, Barbosa MS, Sera CV, Silva RR, Beckham TR, Martin BM, Clarke NP, Adams LG, Santos RL. Diagnosis of foot and mouth disease by real time reverse transcription polymerase chain reaction under field conditions in Brazil. *BioMed Central.* 2008;4: 53.
60. Palanisamy K, Daud ZM, Masran MSS. Immunity Status Of Foot And Mouth Disease In The Border Districts Of Peninsular Malaysia. [cited 2000]. Available from URL: <http://www.iaea.or.at/programmes/nafa/d3/public/td1150.pdf#page=91>
61. Parida S, Fleming L, Gibson D, Hamblin PA, Grazioli S, Brocchi E, Paton DJ. Bovine serum panel for evaluating foot and mouth disease virus nonstructural protein antibody tests. *J Vet Diagn Invest.* 2007;19: 539–544.
62. Psikal I, Zendulková D, Franz J, Lencuchová L, Ferris NP. Comparative between laboratory trials of the liquid phase blocking sandwich ELISA for the detection of antibodies to foot-and-mouth disease virus. *Vet Med (Praha).* 1995;40: 1-5.
63. Reid SM, Forsyth MA, Hutchings GH, Ferris NP. Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, enzyme linked immunosorbent assay and virus isolation for the routine diagnosis of foot and mouth disease. *Journal of Virological Methods.* 1998; 70: 213–217.
64. Reid SM, Grierson SS, Ferris NP, Hutchings GH. Evaluation of automated RT-PCR to accelerate the laboratory diagnosis of foot and mouth disease virus. *Journal of Virological Methods.* 2003;107: 129-139.
65. Re’mond M, Kaiser C, Lebreton F. Diagnosis and screening of foot and mouth disease. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases.* 2002;25: 309–32.
66. Rodriguez LL, Grubman MJ. Foot and mouth disease virus vaccines. *Vaccine.* 2009;27: 90–94.
67. Rodriguez-Torres JG. International Approach to Eradication and Surveillance for Foot and Mouth Disease in the Americas. New York, Academy of Sciences. 2001;916: 194-198.

68. Rueckert RR, Wimmer E. Systematic Nomenclature of Picornavirus Proteins. *Journal Of Virology*. 1984;50: 957-959.
69. Rweyemamu M, Roeder P, Mackay D, Sumption K, Brownlie J, Leforban Y, Valarcher JF, Knowles NJ, Saraiva V. Epidemiological Patterns of Foot and Mouth Disease Worldwide. *Transbound Emerg Dis*. 2008;55: 57-72.
70. Sáiz M, Núñez JI, Jimenez-Clavero MA, Baranowski E, Sobrino F. Foot and mouth disease virus: biology and prospects for disease control. *Elsevier Science B.V*. 2002;4: 1183-1192.
71. Saraiva V. Foot and Mouth Disease in the Americas Epidemiology and Ecologic Changes Affecting Distribution. *New York Academy of Sciences*. 2004;1026: 73-78.
72. Shaila MS. Eradication of foot and mouth disease: a foot in mouth proposition. *J. Biosci*. 2001;26: 125-133.
73. Sil BK, Taimur MJFA. ELISA Based Techniques For The Identification of Foot and Mouth Disease Virus and Vaccine Evaluation In Bangladesh. [cited 2000]. Available from URL: <http://www.iaea.org/programmes/.nafa/d3/public/TD1150.pdf#page=55>
74. Smitsaart EN, Zanelli M, Rivera I, Fondevila N, Compaired D, Maradei E, Bianchi T, O'Donnell V, Schudel AA. Assessment using ELISA of the herd immunity levels induced in cattle by foot and mouth disease oil vaccines. *Preventive Veterinary Medicine* 1998;33: 283-296.
75. Sobrino F, Sáiz M, Jiménez-Clavero MA, Núñez JI, Rosas MF, Baranowski E, Ley V. Foot and mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet. Res*. 2001;32: 1–30.
76. Sobrino F, Domingo E. Foot and mouth disease in Europe. *EMBO reports*. 2001; 2, 6, 459–461.
77. Sutmoller P, Barteling SS, Olascoaga RC, Sumption KJ. Control and eradication of foot and mouth disease. *Virus Research*. 2003; 91: 101-144.
78. Şap Enstitüsü Müdürlüğü. Türkiye’de Şap Hastalığı. [cited 2009a] Available from URL: <http://www.sap.gov.tr/page.php?ID=17>
79. Şap Enstitüsü Müdürlüğü. Likit Faz Bloking ELISA (LPB ELISA) ile Serumda Antikor Tayini Talimatı. Ankara. 2009b.
80. Şap Enstitüsü Müdürlüğü. Solid Faz Kompetitif ELISA (SPC ELISA) ile Antikor Tayini Talimatı. Ankara. 2009c.
81. Thomson GR. Overview of foot and mouth disease in southern Africa. *Rev Sci Tech*. 1995;14: 503-20.
82. Vergara NZ, Caballero PH, Gonzalez S, Orue M. Incorporation Of The ELISA Technique To Determine Antibody Levels Against Foot And Mouth Disease. [cited 2000]. Available from URL: <http://www.iaea.org/nafa/d3/public/vergara-partb-1055.pdf>
83. Verin BC, Arvesu RM. The Use Of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) For The Diagnosis And Monitoring of Foot and Mouth Disease In The Philippines. [cited 2000]. Available from: <http://www.iaea.or.at/programmes/.nafa/d3/public/TD1150.pdf#page=105>
84. Wikipedia. Foot and Mouth Disease. [cited 2010 June 24] Available from URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Foot-and-mouth_disease

Etik Kurul Raporu



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ
ETİK KURUL (SÜVFEK) KARARLARI



Toplantı Tarihi	27.11.2008	Toplantı Sayısı	2008/10	Karar Sayısı	2008/081
<p>Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Feridun ÖZTÜRK ve Veteriner Hekim Murat ŞEVİK tarafından sunulan "Doğu Karadeniz Bölgesinde Şap Aşısı Uygulanan Büyükbaş Ruminantların Serumlarındaki Antikor Miktarlarının Likit Faz Bloking ELİSA ve Solid Faz Kompetitif ELİSA ile Belirlenmesi" başlıklı tez projesi beş üyenin katılımı ile yeniden değerlendirildi.</p> <p>Araştırmada Doğu Karadeniz Bölgesindeki 5 ilden (Artvin, Rize, Trabzon, Giresun ve Ordu) şap aşısı uygulanan büyükbaş ruminant 0-12 ay, 13-36 ay, 36 ay üstü yaş gruplarına ve dişi/erkek cinsiyet gruplarına ayrılarak toplam 450 kan serum örneği toplanacağı; toplanan serum örneklerinin, Likit Faz Bloking ELISA ve Solid Faz Kompetitif ELISA ile inceleneceği; araştırma süresinin 18 ay süreceği ve araştırma sonunda hayvanların yaşamlarına devam edeceği bildirilmektedir.</p> <p>Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul Yönergesinin 12nci Maddesinde belirtilen "etik kurallara uygunluk esası" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.</p> <p>SÜVFEK Yönergesinde belirtilen "Araştırmacıların Sorumlulukları" ve "Hayvan Deneyleri ile İlgili Etik İlkeler" başlıkları altında yer alan kurallar saklı kalmak koşulu ile, projenin hazırlanmasında "Etik Kurul Yönergesi İlkelerine Uyulduğuna", ancak "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğin" 13-1/b-c ve 13-3 Maddesi gereği özel yetiştiricilerden temin edilecek 450 adet serum örneği alınacak büyükbaş ile ilgili olarak "işletme sahiplerinin 15 Kasım 2008 tarihli yazıları ile hayvanlarının araştırma kapsamında kullanımına izin verdikleri de dikkate alınarak ve projenin hayvan kullanım etiği açısından "Uygun" olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.</p>					
 Prof. Dr. Aşkın YAŞAR Başkan		 Prof. Dr. İsmail ŞEN Başkan Yardımcısı			
 Prof. Dr. Feyzullah GÜÇLÜ Üye		Katılmadı Prof. Dr. Sevim KARAASLAN Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi			
 Prof. Dr. Vahdettin ALTUNOK Üye		 Doç. Dr. H. Derya UMUCALILAR Üye		Katılmadı N. Dilek TOKUŞ Sivil Üye	

10. ÖZGEÇMİŞ

10.01.1979 yılında Afyonkarahisar İli, Sultandağı İlçesi'nde doğdu. İlk ve orta öğretimini Afyonkarahisar ve Konya illerinde tamamladı. 1997 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazanarak 2003 yılında mezun oldu. 2005 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalında doktora başladı. 1998 yılında veteriner sağlık teknisyeni olarak Kastamonu İl Tarım Müdürlüğünde çalışmaya başladı. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı bünyesinde Afyonkarahisar ve Artvin İl Müdürlüklerinde görev yaptı. Halen, Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğünde, veteriner hekim olarak çalışmaktadır.