

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**  
**MİK-2019-0002**

**CLOSTRIDIUM PERFRINGENS EPSILON TOKSOİD**  
**İÇEREN AŞILARDA MDCK HÜCRE HATLARINDA**  
**TOKSİSİTE ANALİZİ İLE POTENSİN BELİRLENMESİ**

**AHMET ARSLAN**  
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Göksel ERBAŞ**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
VTF - 17050 proje numarası ile desteklenmiştir

**AYDIN-2019**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Ahmet ARSLAN tarafından hazırlanan “*Clostridium perfringens* Epsilon Toksoid İçeren Aşılarında MDCK Hücre Hatlarında Toksikite Analizi ile Potensin Belirlenmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17/06/2019

Üye : Prof. Dr. Şükrü KIRKAN ADÜ .....

Üye : Prof. Dr. Mehmet AKAN AÜ .....

Üye : Prof. Dr. Serkan İKİZ İÜ-Cerrahpaşa .....

Üye : Prof. Dr. Cavit KUM ADÜ .....

Üye(T.D.) : Doç. Dr. Göksel ERBAŞ ADÜ .....

### ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün .....tarih ve .....sayılı oturumunda alınan .....nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cavit KUM  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamda; öncelikle danıőmanım Doç. Dr. Göksele ERBAŞ ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, deneysel ve laboratuvar çalıőmalarını yürüttüğüm Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğüne, laboratuvar faaliyetleri sırasında destek olan Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Bölümü çalıőanlarına ve hücre kültürü hazırlanmasında destek veren Viral Aşılar Kontrol Laboratuvarı personeline teőekkürü bir borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER

|   | Sayfa |
|---|-------|
| KABUL ONAY.....   | i     |
| TEŞEKKÜR.....   | ii    |
| İÇİNDEKİLER.....  | iii   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....   | v     |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....   | vii   |
| RESİMLER DİZİNİ.....  | viii  |
| TABLolar DİZİNİ.....  | ix    |
| ÖZET.....   | x     |
| ABSTRACT.....   | xi    |
| 1. GİRİŞ.....   | 1     |
| 2. GENEL BİLGİLER.....  | 7     |
| 2.1. <i>Clostridium</i> Genusu ve Klostridial Toksinler.....                                | 7     |
| 2.2. Enteropatojenik Enfeksiyonlarda <i>Clostridium perfringens</i> Toksinlerinin Rolü..... | 10    |
| 2.3. <i>Clostridium perfringens</i> Epsilon Toksin.....                                     | 11    |
| 2.3.1. Yapısal Özellikleri.....   | 11    |
| 2.3.2. Hüresel Etki Mekanizması.....  | 12    |
| 2.3.3. ETX'e Bağlı Genel Toksemi Tablosu.....   | 13    |
| 2.3.4 Epsilon Toksinin Hücre Hatları Üzerindeki Etkisi.....                                 | 14    |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....   | 15    |
| 3.1. Gereç.....   | 15    |
| 3.1.1. Aşılar.....  | 15    |
| 3.1.2. Hayvanlar.....   | 15    |
| 3.1.3. Standart Toksin ve Antitoksinler.....  | 15    |
| 3.1.3.1 Standart toksinin hazırlanması.....   | 15    |
| 3.1.3.2 Standart antitoksinin hazırlanması.....   | 16    |
| 3.1.4. MDCK Hücre Hatları.....  | 16    |
| 3.2. Yöntem.....  | 17    |
| 3.2.1. İmmunizasyon Prosesi ve Serum Örneklerinin Elde Edilmesi.....                        | 17    |
| 3.2.2. Fare Toksin Nötralizasyon Test Prosedürü.....  | 18    |
| 3.2.3. MDCK Hücre Kültüründe Toksin Nötralizasyon Yöntemi.....                              | 19    |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.3.1. Test reagentlerinin hazırlanması.....  | 19 |
| 3.2.3.2. Standart toksin, antitoksin ve bilinmeyen serum örneklerinin hazırlanması..... | 19 |
| 3.2.3.3. Testin yürütülmesi.....  | 20 |
| 3.3. İstatistiksel Analizler.....   | 22 |
| 4. BULGULAR.....  | 23 |
| 4.1. MDCK Hücre Analizi Bulguları.....  | 23 |
| 4.2. Mikroskopik Bulgular.....  | 25 |
| 4.3. Korelasyon ve Linear Regresyon Sonuçları.....                                      | 26 |
| 4.4 MDCK Hücre Analizi Optimizasyon Bulguları.....                                      | 28 |
| 5. TARTIŞMA.....  | 30 |
| 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....  | 37 |
| KAYNAKLAR.....  | 38 |
| EKLER.....  | 43 |
| Ek 1. Etik Kurul Raporu.....  | 43 |
| Ek 2. İstatistiksel Hesaplamalar.....   | 44 |
| Ek 3. MDCK Hücre Hattı Ürün Genel Bilgisi.....  | 45 |
| ÖZGEÇMİŞ.....   | 46 |

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b>3R</b>                | : Hayvan deneylerinin kaldırılması ( <i>refinement</i> ), azaltılması ( <i>reduction</i> ) ve değiştirilmesini ( <i>replacement</i> ) esas alan yaklaşım |
| <b>ATP</b>               | : Adenezin Tri Fosfat  |
| <b>Ca<sup>++</sup></b>   | : Kalsiyum iyonu   |
| <b>Cl<sup>-</sup></b>    | : Klor iyonu   |
| <b>CPA</b>               | : <i>Clostridium perfringens</i> alfa toksin   |
| <b>CPB</b>               | : <i>Clostridium perfringens</i> beta toksin   |
| <b>CPE</b>               | : <i>Clostridium perfringens</i> enterotoksin  |
| <b>CFR</b>               | : Amerika Birleşik Devletleri Federal Yönetmelikleri ( <i>Code of Federal Regulations</i> )  |
| <b>CoA</b>               | : Koenzim A  |
| <b>CVB</b>               | : ABD Veteriner Biyolojik Merkezi ( <i>The Center for Veterinary Biologics</i> )   |
| <b>ECVAM</b>             | : Avrupa Alternatif Metotların Validasyonu Merkezi ( <i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i> )                                  |
| <b>EDQM</b>              | : Avrupa İlaç Kalite ve Sağlık Hizmetleri Direktörlüğü ( <i>European Directorate for the Quality of Medicines</i> )                                      |
| <b>EDTA</b>              | : Etilendiamin tetraasetik asit  |
| <b>ELISA</b>             | : Antijen ya da antikor varlığının ölçümü ya da tespitine dayanan enzime bağlı immunosorbent analizi ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )        |
| <b>EP</b>                | : Avrupa Farmakope ( <i>European Pharmacopoeia</i> )   |
| <b>ETX</b>               | : <i>Clostridium perfringens</i> epsilon toksin  |
| <b>EMEM</b>              | : Eagle hücre kültürü vasatı ( <i>Eagles's Minimal Essential Medium</i> )  |
| <b>FBS</b>               | : Fötal Bovin Serum  |
| <b>İÜ</b>                | : İnternasyonal ünite  |
| <b>IXT</b>               | : <i>Clostridium perfringens</i> iota toksin   |
| <b>K<sup>+</sup></b>     | : Potasyum iyonu   |
| <b>L<sub>0</sub> Doz</b> | : Standart antitoksinin onda biri ile karıştırıldığında farelerde ölüme ya da hastalığa neden olmayan en büyük toksin miktarı                            |
| <b>L<sub>+</sub> Doz</b> | : Standart antitoksinin onda biri ile karıştırıldığında farelerin en az %80'inde ölüme neden olan en küçük toksin miktarı                                |

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>LD<sub>50</sub></b> | :Uygulandığı hayvanların % 50'sinde ölüme neden olan doz, Letal Doz 50   |
| <b>MDBK</b>            | : Madin Darby sığır böbrek epiteliyal hücre hattı ( <i>Madin Darby Bovine Kidney</i> )   |
| <b>MDCK</b>            | : Madin Darby köpek böbrek epiteliyal hücre hattı ( <i>Madin Darby Canine Kidney</i> )   |
| <b>Na<sup>+</sup></b>  | : Sodyum iyonu   |
| <b>NAD, NADH</b>       | : Nikotinamid adenin dinükleotid   |
| <b>NDV</b>             | : Newcastle hastalığı virüsü   |
| <b>NetB</b>            | : <i>Clostridium perfringens</i> nekrotik B benzeri toksin   |
| <b>OD</b>              | : Optik dansite  |
| <b>RPM</b>             | : Dakika başına dönme hızı ( <i>round per minute</i> )   |
| <b>R<sup>2</sup></b>   | : Regresyon katsayısı  |
| <b>SDS</b>             | : Sodyum dodesil sülfat  |
| <b>TNT</b>             | : Toksin Nötralizasyon Testi   |
| <b>USDA APHIS</b>      | : Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı, Hayvan ve Bitki Sağlığı Kontrol Merkezi ( <i>United States Department of Agriculture – Animal and Plant Health Inspection Service</i> ) |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Şekil 1.  | Klostidial toksinlerin etki mekanizmaları.....  | 8  |
| Şekil 2.  | <i>Clostridium perfringens</i> epsilon toksinin kristalize yapısı.....  | 12 |
| Şekil 3.  | <i>Clostridium perfringens</i> epsilon toksinin intraselüler etki mekanizması.....                                      | 12 |
| Şekil 4.  | <i>In vivo</i> (fare) ve <i>in vitro</i> (MDCK hücre kültürü) potens testi.....   | 18 |
| Şekil 5.  | MDCK hücre kültürü analizinde pleytin yerleşimi.....  | 21 |
| Şekil 6a. | MDCK hücre kültürü toksisite analizi ile bir pleytte alınan OD değerleri.....   | 23 |
| Şekil 6b. | MDCK hücre kültürü toksisite analizinde alınan OD değerleri üzerinden canlı ve ölü hücre sütunlarının belirlenmesi..... | 24 |
| Şekil 7.  | TNT ve MDCK sitotoksite analizleri arasındaki lineer regresyon eğrisi.....  | 28 |



## RESİMLER DİZİNİ

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Resim 1.</b> | MDCK hücre kültürü toksisite analizinde pleytin görünümü .....        | 25 |
| <b>Resim 2.</b> | Canlı MDCK hücre kültürünün mikroskopik görünümü .....                | 26 |
| <b>Resim 3.</b> | Toksin ile muamele edilen MDCK hücre kültüründeki mikroskopik görünüm | 26 |

## TABLULAR DİZİNİ

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Tablo 1.</b> | Patojenik <i>Clostridiumların</i> konakçıları ve neden olduğu hastalıklar .....                      | 9  |
| <b>Tablo 2.</b> | <i>Clostridium perfringens</i> alt tipleri ve salgılanan majör toksinler .....                       | 10 |
| <b>Tablo 3.</b> | TNT ve MDCK hücre kültürü toksisite analizi ile serum örneklerinde epsilon antitoksin düzeyleri..... | 27 |
| <b>Tablo 4.</b> | <i>İn vivo</i> ve <i>in vitro</i> analizler arasındaki korelasyon ve linear regresyon.....           | 28 |

## ÖZET

### CLOSTRIDIUM PERFRINGENS EPSILON TOKSOİD İÇEREN AŞILARDA MDCK HÜCRE HATLARINDA TOKSİSİTE ANALİZİ İLE POTENSİN BELİRLENMESİ

**Arslan A. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,  
Mikrobiyoloji Programı Doktora Tezi, Aydın, 2019.**

*Clostridium perfringens* tip B ve tip D tarafından salgılanan epsilon toksin başta koyun ve keçilerde, daha az olarak da sığırlarda enteroroksemiye neden olan ve bütün dünyada yaygın görülen bir enfeksiyondur. Hastalığın hızlı ve şiddetli seyretmesi nedeniyle mücadelede aşılama ön plana çıkmaktadır. Genellikle farklı klostridial komponentlerin bir araya gelmesiyle polivalan hazırlanmış bu grup aşılarda potens testleri, çok sayıda deney hayvanı kullanımını esas alan Toksin Nötralizasyon testi (TNT) ile yapılmaktadır. TNT'nin hayvan refahı ve metot doğrulama çalışmaları açısından dezavantajları olan bir test olması nedeniyle, uluslararası standartlarda revizyonlar yapılması da dahil, alternatif metotların geliştirilmesi ve uygulanması teşvik edilmektedir. Bu amaçla serolojik tabanlı farklı *in vitro* metotlar uygulanabilmekle birlikte, bu testlerde kullanılan antijen, antikor ve referans standartların saflaştırılması ve standardizasyonu halen önemli bir sorun olarak durmaktadır. Bu bakımdan hücre kültürü analizleri klostridial aşılarda potens testlerinde olası alternatifler içinde görülmektedir.

Bu gereklilikler göz önünde tutularak epsilon toksin içeren aşılarda immunize edilen tavşan serumlarında fare TNT ile Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) hücre kültürlerinde sitotoksitesite analizi ile antitoksin miktarları belirlenmiştir. İki metodun sonuçları arasında yüksek bir korelasyon ( $r=0.952$ ,  $p<0.01$ ,  $n=21$ , çift kuyruklu) ve iyi bir lineer ilişki ( $R^2=0.906$ ;  $Y=1.007*X + 0.994$ ) gözlenmiştir. Epsilon toksinle muamele edilen hücrelerde toksin konsantrasyonuna eşdeğer hücre ölümleri gerçekleşmiştir. Ayrıca hücre kültürü analizlerinde yalancı pozitif reaksiyon görülmemiştir. Bu sonuçlar *Clostridium perfringens* epsilon toksin içeren aşılarda potens testlerinde, *in vivo* fare TNT yerine, *in vitro* MDCK hücre hattı seronötralizasyon analizinin başarıyla kullanılabilceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Epsilon toksin, Klostridial aşı, MDCK hücre hattı, Potens, TNT.

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF POTENCY IN VACCINES CONTAINING CLOSTRIDIUM PERFRINGENS EPSILON TOXOID WITH A TOXICITY ANALYSIS IN MDCK CELL LINES

**Arslan A. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Department of Microbiology, PhD Thesis, Aydın, 2019**

Epsilon toxin generated by *Clostridium perfringens* types B and D is the cause of enterotoxemia disease which is widely seen around the world in sheep, goats and to a lesser extent cattle. As it has a fast and severe course, vaccination has priority in disease prevention. Potency testing of these polyvalent vaccines with different Clostridial components are carried out with Toxin Neutralisation Test (TNT) using a large number of laboratory animals. As TNT has disadvantages regarding animal welfare and method validation studies, development and application of alternative methods including revisions in international standards are recommended. Although various serology based *in vitro* tests may be used for this purpose, purification and standardization of antigen, antibody and reference standards used in these tests still remain an important problem. From this perspective, cell culture analyses are conferred to be among possible alternatives for the potency testing of Clostridial vaccines.

Taking these necessities into consideration, antitoxin amounts were determined with mouse TNT and cytotoxicity test in Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cell cultures in sera from rabbits immunized with vaccines containing epsilon toxoid. Both methods showed high correlation ( $r=0.952$ ,  $p<0.01$ ,  $n=21$ , double tailed) and a good linearity ( $R^2=0.906$ ;  $Y=1.007*X + 0.994$ ) between results. Cell deaths equivalent to toxin concentration were observed in the cells exposed to epsilon toxin. Also, there were no false positive reactions in cell culture analyses. These results show that *in vitro* MDCK cell line seroneutralization analysis can be successfully used instead of in-vivo Mouse TNT for the potency testing of vaccines containing *Clostridium perfringens* epsilon toxoid.

**Keywords:** Clostridial vaccine, Epsilon toxin, MDCK cell line, Potency, TNT.

# 1. GİRİŞ

*Clostridium* genusu insan ve hayvanlarda yaygın görülen, son derece patojenik, çomak şekilli, anaerob, endospor oluşturan Gram (+) bakterileri içerir. Toprak, su ve kanalizasyon atıkları başta olmak üzere doğada yaygın bir dağılım gösteren *Clostridialar*, insan ve hayvanların normal gastrointestinal florasında da bulunmakta, ayrıca önemli besin ve yara kontaminantlarından biri olarak kabul edilmektedir. Genusun tanımlanmış 200'ün üzerinde türü bulunmakta olup, bunlardan 14 dolayında türün hayvan sağlığında önemli patojenik etken olduğu bilinmektedir (Markey ve ark, 2013; Prescott, 2013; Lawson ve Rainey, 2016). Genusun üyelerinin bir kısmı dokularda lokal birikim ya da aktif invazyon yoluyla hastalık sürecinin başlatılmasından sorumlu iken, diğer bir grubu bakteriyel toksinler vasıtasıyla etki göstermektedir. Patojenik türlerin çoğu farklı memeli türlerinde değişen düzeyde etkiye sahip bir ya da daha fazla ekzotoksin üretmektedir. Toksinlerin absorpsiyonu sistemik intoksikasyon ile birlikte kardiyovasküler şok ve ölüme giden bir dizi enfeksiyona neden olmaktadır. Hastalığı oluşturmak için gereken toksin miktarları genellikle çok düşüktür, özellikle genç hayvanlarda akut ya da perakut seyirli, yüksek mortalite gösteren ve hızlı seyirli olması nedeniyle tedavisi güç enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır (Bonistalli, 2013; Markey ve ark, 2013).

*C. perfringens* genusun en toksik türlerinden biridir, farklı etki yollarına sahip 15'den fazla toksin tabiatında protein/enzim üretmektedir. Bunlardan 4 tanesi olan alfa, beta, epsilon ve iota toksinler türün majör toksinlerini oluşturmakta ve önemli virülans faktörleri olarak bilinmektedir. Bu toksinler hedef hücreler üzerinde ya hücre membranlarında yapısal değişiklikler ile permeabilitenin artması, iyon dengesizlikleri ve sıvı kaybının ortaya çıkması (alfa, beta ve epsilon toksinler) ya da aktin hücre iskeletinin tahrip etmesi (iota toksini) gibi farklı mekanizmalarla etki etmektedirler. Bunlardan *C. perfringens* tip B ve D tarafından üretilen epsilon toksin, botulismus ve tetanoz toksininden sonra en güçlü üçüncü klostridial toksin olup, başta koyun ve keçilerde olmak üzere, baskın olarak nörolojik bulgularla karakterize, hızlı seyirli ve ölümcül enterotoksemi enfeksiyonlarında rol oynar. Ani ölüm, yumuşak böbrek veya aşırı beslenme hastalığı da olarak bilinen bu enfeksiyon hayati organlarda (beyin, akciğer, kalp) ödem ve generalize bir toksemi tablosu ile karakterizedir. Epsilon toksin nötr bir prototoksin (32.9 kDA molekül ağırlığında) halinde sentezlenir, tripsin ve kimotripsin gibi proteazlar tarafından N ve C terminal peptid rezidülerinin proteolitik olarak uzaklaştırılmasıyla oldukça aktif ve prototoksininden yaklaşık 1000 kat daha toksik,

olgun bir protein haline dönüşür. Aktive olan toksin letal, dermonekrotik ve ödematöz etkilere sahiptir. Epsilon toksininin temel özelliği, vasküler permeabiliteyi arttırmasıdır. Damar endotel hücrelerine bağlanarak çeşitli organlarda ciddi vasküler hasar ve ödem oluşturur, kan-beyin bariyerini geçirebilir ve beyinde önemli patojenik değişiklikler meydana getirir (Stiles ve ark, 2013; Uzal ve ark, 2014a, Navarro ve ark, 2018).

Çiftlik hayvanlarının önemli hastalıkları arasında yer alan enterotoksemilerin, ülkemiz de dahil olmak üzere tüm dünyada et ve süt endüstrisinde ağır ekonomik kayıplar yanında postnatal yavru ölümlerine neden olduğu bilinmektedir. Mikroorganizmanın doğadaki yaygınlığı nedeniyle fiilen eradikasyonu mümkün olamamaktadır. Enfeksiyonun hızlı ve şiddetli seyretmesi, hastalıkla mücadelede terapötik uygulamalar yerine profilaktik tedbirlerin ön plana çıkmasına neden olmaktadır. Enfeksiyondan korunmada antikora bağlı immunité (humoral immunité) rol oynar ve bu yanıt serum antitoksin düzeyleri ile yakından ilişkilidir. Bu bakımdan hastalığın kontrolünde aşılamaya bağlı aktif immunizasyon önem kazanmaktadır. Hedef türlerin aşılmasında bakterin-toksoid karakterde inaktif veteriner biyolojik ürünler kullanılır. Genellikle doğumdan önce iki doz halinde inaktif bakterin toksoid aşı ile annelerin aşılması ya da doğumdan birkaç ay sonra yavrulara iki doz aşı uygulanması ve aşılamanın tam besiyeye geçmeden 2 hafta önce tamamlanması önerilmektedir (Lobato ve ark, 2010; Prescott, 2013). Uygulamada *C. perfringens* Tip B ve Tip D yanında diğer klostridial komponentleri de içerecek şekilde mültivalan karakterde hazırlanan klostridial aşuların üretim teknolojisi genel olarak; bir fermentasyon prosesi kullanılarak ilgili mikroorganizmanın sıvı bir kültürde logaritmik proliferasyonu ve toksin oluşumunun indüklenmesi, üreyen kültür ve toksin konsantrasyonunun arzu edilen düzeye ulaşmasını takiben santrifügasyon veya filtrasyonla hücre gövdelerinin uzaklaştırılması, süpernatanttaki toksinin toksoide dönüşümünü sağlayacak yöntemler ile (kimyasal olarak formaldehit kullanımı ya da fiziksel olarak ısı yardımıyla) inaktivasyonu ve final formülasyon esnasında aşının adjuvantla kombinasyonu prensibine dayanmaktadır (Baş ve Alp, 2005; Bonistalli, 2013, Sinitskaya ve ark, 2015). Bu bakımdan toksoidler hedef türlerde immunojenik etki yapan, ancak hastalık oluşturma yeteneğini kaybetmiş inaktif toksinlerdir. İmmunizasyon amacıyla kullanılan inaktif toksoidlerin; non-toksik (toksinin zararlı etkileri kaldırılmış), canlı mikroorganizma içermeyen (ileride çoğalma ve toksin üretimine neden olabilecek hücresel öğelerden yoksun) ve potent (aşılanmış bireylerde koruyucu immun yanıtı oluşturma yeteneğine sahip) olması beklenir (Bonistalli, 2013).

Konvansiyonel olarak enterotoksemi aşularının potens testi genellikle canlı hayvan modelleri kullanılarak test edilir. Bu amaçla tavşanların aşılması ile elde edilen serum

örneklerindeki serolojik yanıt, *in vivo* bir yöntem olan fare toksin nötralizasyon testi (TNT) ile ölçülür. TNT bu grup aşuların potensinin belirlenmesinde standart prosedürler içinde kabul edilmekte olup, immunize edilen hayvanlarda toksoide karşı oluşan fonksiyonel ve nötralize edici antikor düzeyinin, test hayvanlarına (farelere) uygulanan referans bir toksinin varlığında, gücü bilinen standart bir antitoksinle kıyaslanarak belirlenmesi prensibine dayanan hayvansal modellerdir (CFR, 2012; EP, 2018a). Toksinin test hayvanlarında yaptığı letal etkinin nötralizasyon derecesine bakılarak oluşan antitoksin düzeyi hesaplanabilmektedir. Testin dizaynı, çalışılan serum örneğinde, beklenen düzeyde antitoksin oluşup oluşmadığının değerlendirilmesi prensibine dayandığından, test geçer bir limit değer üzerine kurulur ve sonuçta bu limit değere eşdeğer, altında ya da üzerinde antikor bulunup bulunmadığına karar verilir. Çeşitli uluslararası monograflar (CFR, EP gibi) ya da yetkili otoriteler tarafından onaylanan aşı protokol dosyalarında klostridial komponentlerle ilgili birim hacim başına kabul edilebilir antitoksin düzeyleri tanımlanmış olup, bu düzeyler dikkate alınarak aşuların potensini belirlenmektedir. Ancak TNT doğası gereği çok sayıda deney hayvanı kullanımına ihtiyaç gösteren bir testtir. Tüm *in vivo* metotların uygulanması sırasında, metodun doğasından kaynaklanan çeşitli belirsizlik bileşenleri (canlının bireysel direnci, bakım besleme koşulları, hijyenik şartlar, çevresel faktörler, operatörün manipülasyon yeteneği gibi) yöntemlerin tekrarlanabilirliği ve validasyonlarını güçleştirmektedir. Özellikle uygulama yapılan hayvanların bireysel kondisyonuna bağlı test sonuçlarının değişkenlik göstermesi ya da geçersiz test sonuçlarının elde edilmesi olasıdır. Bu da testlerin tekrarlanmasına ve kullanılan hayvan sayılarının daha da artmasına neden olabilmektedir. Bu tür testlerin nihai sonuç olarak letalite ya da paraliz gibi şiddetli klinik bulgulara dayalı yürütülmesi, gelişmekte olan hayvan refahının iyileştirilmesi, hayvanlarda acı veren uygulamalardan kaçınılması ve testlerde kullanılan hayvan sayısının azaltılması yönündeki etik yaklaşımlara uygunluk göstermemektedir. Ayrıca zaman, maliyet ve işgücü açısından da dezavantajlara sahip yöntemler olduğu bilinmektedir. Her bir komponent için ayrı bir *in vivo* test gereksiniminin olması, polivalan bir aşıda potensinin ortaya konmasında kullanılan hayvan sayısını, iş yükünü ve test maliyetini daha da arttıracığı ortadadır (Ebert ve ark, 1999; Redhead ve ark, 2011; Romberg ve ark, 2012).

Söz konusu teknik zorluklar ve giderek artan biyoetik yaklaşımlar; aşuların potensinin belirlenmesinde deney hayvanı kullanımının sınırlandırıldığı alternatif yöntemlerin uygulanması anlayışının ortaya çıkması ve gelişmesinde önemli bir motivasyon sağlamıştır. Bu yaklaşım 3R konsepti (*refinement, reduction, replacement*) olarak bilinir, hayvansal prosedürlerin kaldırılması, hayvan sayılarının azaltılması ve hayvan modellerinin *in vitro* metotlarla yer

değiştirmesini kapsamaktadır (Halder, 2001; Erbaş, 2011; Kulpa-Eddy ve ark, 2011; Romberg ve ark, 2012). Gerek etik düşünceler, gerekse test sürelerinin ve maliyetlerinin azaltılması gibi gerekçelerle söz konusu konseptin uygulanması yönündeki yaklaşım, yetkili otoriteler ve endüstriyel uygulayıcılar düzeyinde yaygın kabul görmüş, alternatif metotların geliştirilmesi ve validasyonlarının cesaretlendirilmesi konusunda başta EDQM ve ECVAM olmak üzere çeşitli uluslararası dünya sağlık kuruluşlarının desteklediği çalıştay, sempozyum ve işbirliği çalışmaları yürütülmüş, yasal çerçeveyi düzenleyen değişiklikler yapılmış ve son 10-15 yılda EP, CFR ve USDA APHIS monograflarında bu çalışmaları esas alan çok sayıda düzenleme gerçekleştirilmiştir (Hill 2011; Lang ve ark, 2018). Veteriner sahada özellikle; kuduz, leptospira, şap, newcastle, erisipelas, klostridium, kanatlı ve balık aşılarının bu çerçevede yapılacak çalışmalar içinde öncelikli konular içerisinde değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Kulpa-Eddy ve ark, 2011; Romberg ve ark, 2012).

Araştırmacılar tarafından farklı aşuların potens testlerinde alternatif metotlar arasında; immunize edilmiş hayvanların serum örneklerinde monoklonal ya da poliklonal antikorlara dayalı ELISA metotları, aşıdaki hücresel ya da flagellar antijen miktarının ölçülmesi ve relatif potensin belirlenmesine yönelik immunokimyasal metotlar ile hücre kültürleri üzerinde yürütülen serolojik tabanlı toksisite testleri denenmiştir (Redhead ve ark, 2011; Romberg ve ark, 2012; Sinitskaya ve ark, 2015). Özellikle antikor tabanlı ELISA metotları; testlerde kullanılan hayvan sayısının azaltılması, referans metodun sonuçlarına benzer bir korelasyon göstermesi, güvenli tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesi, hızlı ve kolay uygulanabilmesi bakımından alternatif metotlar içinde önem kazanmıştır (Ebert 1999; Romberg ve ark, 2012, Arslan ve ark, 2016). Benzer olarak, hayvan kullanımını tamamen ortadan kaldıran biyolojik üründeki antijen miktarının ölçümü ve bunun referans bir ürünle karşılaştırılmasını esas alan alternatif metotlar ile de bir kısım aşılarda (başta kuduz ve NDV olmak üzere) geçerli sonuçlar alınmıştır. (Romberg ve ark, 2012; Aly ve ark 2018). Bununla birlikte, söz konusu metotlardaki mono/poliklonal antikorların hazırlanması, saflaştırılması ve standardizasyonu ile antijen elüsyon prosedürleri uygulamadaki önemli güçlükler olarak durmaktadır (Kulpa-Eddy ve ark, 2011; Stokes ve ark, 2011; Romberg ve ark, 2012). Ayrıca antikor maturasyonundaki eksiklikler ve düşük affiniteli antikorların antijenik epitoplara zayıf bağlanmasına bağlı problemler nedeniyle, antikor tabanlı testlerin sonuçlarında önemli sapmaların ortaya çıkması muhtemeldir (Crowther, 2009). Bu bakımdan toksinlerin hücre hatlarındaki sitotoksik etkisinin nötralizasyonu esasına dayanan hücre kültürlerindeki titrasyon metotları, TNT'ye benzerlik göstermesi yanında spesifik saflaştırılmış antikorlara ve antijen ayrıştırma prosedürlerine ihtiyaç duyulmaması nedeniyle alternatif yaklaşımlar içinde



öne çıkmaktadır. Bu yaklaşımla klostridial toksinlerin hücre kültürleri üzerindeki sitotoksik etkisini esas alan çeşitli araştırmalar yapılmış, nötralizasyon testlerinde farklı hücre kültürü tekniklerinin duyarlı ve spesifik bir şekilde kullanılabilceği yönünde sonuçlar alınmıştır (Borrmann ve ark, 2006; Souza Junior ve ark, 2010; Salvarani ve ark, 2013; Sinitskaya, 2015). Ancak standart bir metodolojisinin olmaması nedeniyle klostridial komponentlerinin potensinin değerlendirilmesine yönelik hücre tabanlı nötralizasyon testleri in-house (işletme içi) prosedürler olarak geliştirilmekte ve TNT'ye göre korelasyon ve doğruluğu gösterilerek uygulanır duruma getirilmektedir.

*C. perfringens* epsilon toksinin (ETX) hücre hatlarındaki sitotoksitesi üzerinde yapılan çalışmalarda çeşitli hücre kültürleri arasından MDCK epitelial hücre hatlarının bu toksine en duyarlı olduğu gösterilmiştir. Toksinin hücre içine girmeksizin spesifik olarak MDCK hücre yüzeyindeki kendine özgü reseptörlere bağlandığı, tomurcuk şeklinde büyük bir membran kompleksinin şekillenmesi ve membranlarda por oluşumu ile hücre membranlarında hasara neden olduğu, bunun neticesinde intraselüler  $K^+$  iyonları hücre dışına çıkarken,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  ve  $Ca^{+2}$  iyonlarının ise hücre içine girişi sonucu polarize olan hücrelerde mitotik aktivitenin durması ve hücre döngüsünün bozulması ile hücre nekrozunun ortaya çıktığı tanımlanmaktadır. Özellikle MDCK hücre hatlarında epsilon toksine bağlı sitotoksik etkilerin çok hızlı geliştiği bildirilmiştir (Petit ve ark, 1997; Borrmann ve ark, 2001; Soler-Jover ve ark, 2004; Uzal ve ark, 2014a). Bu bakımdan *C. perfringens* içeren aşuların potens testlerinde epsilon toksinin MDCK hücre hatlarındaki sitotoksik etkisini esas alan ve bu etki sonucunda geride canlı kalan hücrelerin boyanma yeteneklerine göre toksisite düzeyinin ve serum antitoksin miktarlarının ölçümüne dayanan alternatif modeller üzerinde durulmaktadır (Borrmann ve ark, 2006; Souza Junior ve ark; 2010; Salvarani ve ark, 2013).

Referans metotlar olan hayvansal modeller yerine hücre hattı toksisite analizleri ile epsilon toksoid içeren klostridial aşuların potensinin belirlenmesine yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunması yanında, bu metotların in house prosedürler olarak uygulandığı dikkate alındığında metotların standardizasyonunun sağlanması ve geçerliliğinin gösterimine yönelik farklı araştırmalara gereksinim olduğu ortadadır. Ayrıca Avrupa Farmakope gibi uluslararası monograflarda, bu gibi alternatif metotların referans metoda göre korelasyonun gösterilmesi ve bir örnek sonuçlar alınabildiğinin doğrulanması neticesinde uygulamaya aktarılması gerekliliği üzerinde önemle durulmaktadır. Bu ihtiyaç dikkate alınarak, söz konusu bilimsel veriler ışığında; başta koyun ve keçilerde enterotoksemiye karşı profilaktik olarak yaygın kullanımı bulunan epsilon toksoid içeren inaktif klostridial aşuların potens testlerinde, deney hayvanlarında letaliteye dayanan testlerin kaldırılması ve bu testlerde kullanılan deneme

hayvanı sayılarının azaltılması ile diğer antikor tabanlı ELISA metotlarındaki saflaştırılmış mono/poliklonal antikor ihtiyacının giderilmesi yönündeki hedefler doğrultusunda planlanan bu araştırmada; TNT'ye alternatif olarak, MDCK hücre hatlarında sitotoksik etkiye dayalı nötralizasyon testinin uygulanması, sonuçların referans metotla karşılaştırılması ve korelasyonunun değerlendirilmesi ile enteroroksemi aşılarının potens testlerinde 3R prensiplerine uygun yeni metodolojinin uygulanabilirliğinin tartışılması amaçlanmıştır.

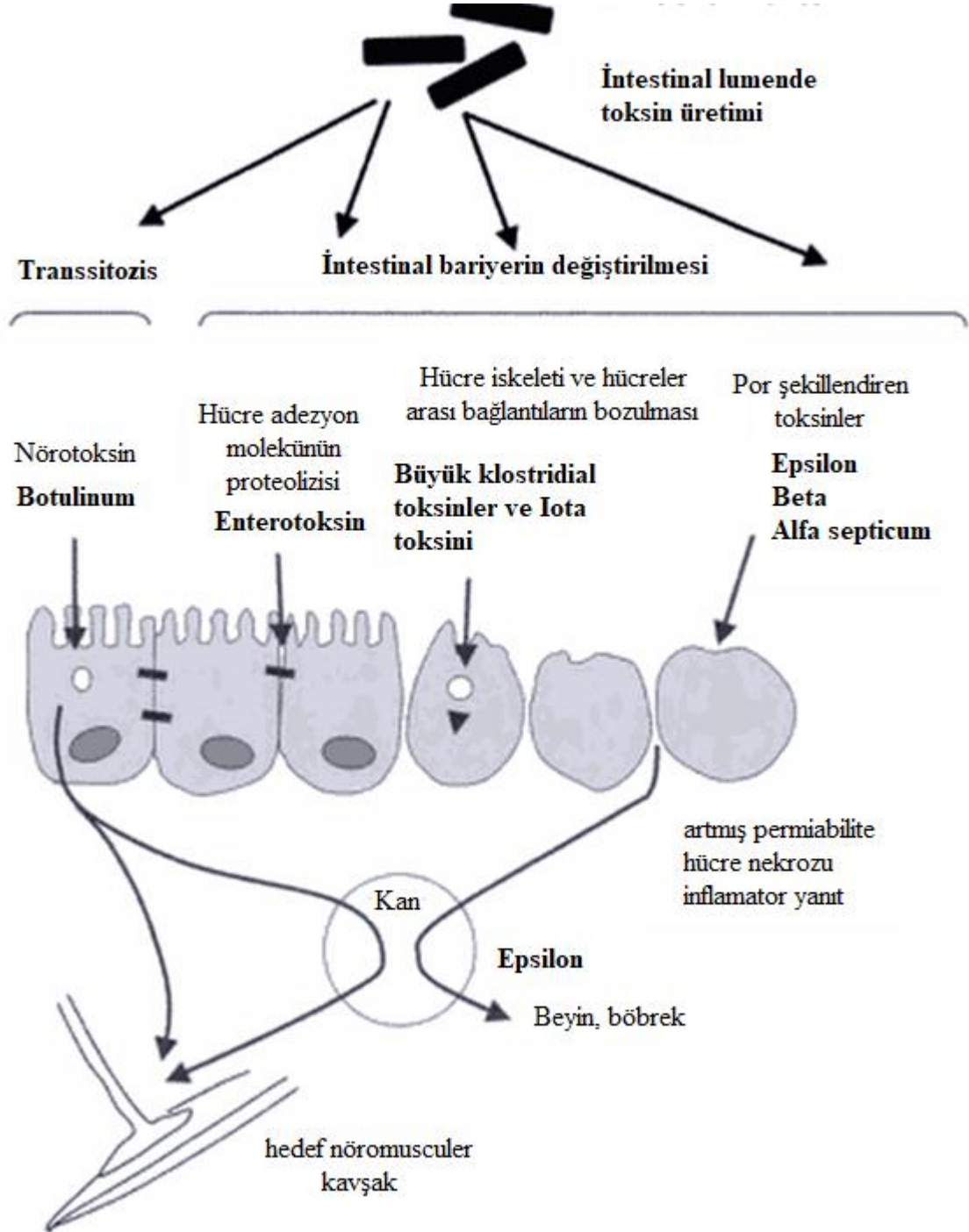
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Clostridium* Genusu ve Klostridial Toksinler

*Clostridium* genusu ilk olarak 1880 yılında Prazmowski tarafından *Clostridium butyricum* türü olarak önerilmiş, daha sonra bu genus Gram pozitif boyanan, spor oluşturan, anaerobik organizmalar için genel bir grubu ifade eder hale gelmiştir (Lawson ve Rainey, 2016). Bugün için genusun içinde onaylanmış 237 tür ve alt tür bulunmaktadır (WEB\_1, 2018). *Clostridium* genusu içinde yer alan türler aşırı heterojen bir yapıya sahiptir. Ana virulans determinantlarını sentezlenen toksinler oluşturur. Bilinen tüm bakterilerin en toksik grubu olarak kabul edilmektedir. Patojenik türler tarafından 15'ten fazla protein tabiatında toksin veya doku yıkımlayıcı enzim sentezlenmektedir. Tetanoz ve botulismus nörotoksinleri bunlardan en güçlüleri olup, bunu epsilon toksin (ETX) izlemektedir (Popoff, 2004; Stiles ve ark, 2013; Navaro ve ark, 2018). Klostridial toksinlerin yapısı, hedef organları ve etki mekanizması önemli farklılıklar gösterir (Şekil 1). Bazı toksinler lokal olarak etki eder, diğer bazıları mukozal bariyeri geçer ve dolaşım yoluyla çeşitli dokulara yayılır. Toksinlerin dolaşıma geçişi transsitozis veya intestinal bariyerin değişikliğe uğratılması yoluyla gerçekleşebilir. Hücre iskeletinin bozulmasına ya da por oluşumuna neden olabilirler. Bir kısmı kan beyin bariyerini geçebilir (Popoff, 2004). Bu bakımdan klostridial enfeksiyonlarda üretilen toksinlerin etkinliği ve mikroorganizmaların invaziv yeteneğine göre patojeniteleri dikkate alınarak *Clostridia* türleri aşağıdaki şekilde 4 farklı grup altında değerlendirilmektedir (Markey ve ark, 2013);

- a) Nörorotropik *Clostridialar* (*C. tetani* ve *C. butulismus*); Çok potent nörotoksinleri üretirler, invaziv değildirler, konakçıda çok sınırlı düzeyde kolonize olurlar.
- b) Histotoksik *Clostridialar* (*C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi tip A,B,C*, *C. haemolyticum*, *C. sordelli* ve *C. perfringens tip A*); Birinci gruptan daha az potent toksin üretirler ancak invazivdirler. Doku harabiyetine (gazlı gangren gibi) sebep olurlar.
- c) Enteropatojenik *Clostridialar* (*C. perfringens tip A, B, C, D, E*, *C. difficile*, *C. colinum* ve *C. spiroforme*), Enteroksemilerle ilgilidirler. Salgıladıkları toksinler bağırsaklarda yapılır, kan dolaşımına adsorbe olarak generalize bir toksemi tablosuna neden olurlar.
- d) Atipik *Clostridialar* (*C. pliforme*); Atipik karakterler sergilerler.

Bu gruplarda yer alan patojenik *Clostridiaların* oluşturdıkları enfeksiyonlar ve konakçıları Tablo 1’de özetlenmiştir.



**Şekil 1.** Klostridial toksinlerin etki mekanizmaları (Popoff, 2004'ten uyarlanmıştır)

**Tablo 1.** Patojenik Clostridiumların konakçıları ve neden olduğu hastalıklar (Markey ve ark, 2013'ten uyarlanmıştır)

| <b>Clostridium Türleri</b>           | <b>Konakçılar</b>  | <b>Hastalıklar</b>  |
|--------------------------------------|--|---|
| <b>Nörotoksik Clostridialar</b>      |  |   |
| <i>Clostridium tetani</i>            | At, ruminant, insan ve diğer hayvanlar                               | Tetanoz   |
| <i>Clostridium botulinum</i>         | Hayvan türlerinin çoğu ve insan                                      | Botulismus  |
| <i>Clostridium argentinense</i>      | İnsan  | Botulismus  |
| <b>Histotoksik Clostridialar</b>     |  |   |
| <i>Clostridium chauvoei</i>          | Sığır, koyun, (domuz)  | Yanıkara  |
| <i>Clostridium septicum</i>          | Sığır, koyun, domuz<br>Koyun<br>Tavuk                                | Malignant ödem<br>Bradzet<br>Nekrotik dermatitis  |
| <i>Clostridium novyi tip A</i>       | Koyun<br>Sığır ve Koyun  | Şişmiş baş hastalığı<br>Gazlı gangren   |
| <i>Clostridium novyi tip B</i>       | Koyun, (sığır)   | Kara hastalık (Nekrotik hepatit)  |
| <i>Clostridium haemolyticum</i>      | Sığır, koyun, keçi, domuz  | Basiller hemoglobiniüri   |
| <i>Clostridium sordelli</i>          | Sığır, koyun ve at   | Gazlı gangren   |
| <b>Enteropatojenik Clostridialar</b> |  |   |
|                                      | İnsan  | Gıda zehirlenmesi, gazlı gangren  |
| <i>Clostridium perfringens tip A</i> | Kuzu<br>Köpek<br>Domuz<br>Tavuk                                      | Enterotoksemik sarılık<br>Hemorajik gastroenterit<br>Nekrotik enterocolitis<br>Nekrotik enteritis |
| <i>Clostridium perfringens tip B</i> | Kuzu<br>Neonatal buzağı ve tay<br>Domuz yavrusu, kuzu, buzağı ve tay | Kuzu dizanterisi<br>Enterotoksemi<br>Hemorajik enterotoksemi                                      |
| <i>Clostridium perfringens tip C</i> | Ergin koyun<br>Tavuk   | Struck hastalığı<br>Nekrotik enterit  |
| <i>Clostridium perfringens tip D</i> | Koyun, (keçi ve buzağı)  | Yumuşak böbrek hastalığı  |
| <i>Clostridium perfringens tip E</i> | Buzağı<br>Tavşan   | Hemorajik enteritis<br>Enteritis  |
| <i>Clostridium spiroforme</i>        | Tavşan ve kobay<br>Tay, domuz, köpek<br>hamster, tavşan ve           | Diyare<br>Diyare  |
| <i>Clostridium difficile</i>         | (buzağı)<br>İnsan  | Diyare, nazokomiyal enfeksiyon  |
| <i>Clostridium colinum</i>           | Kuş, tavuk, hindi  | Ülseratif enteritis   |
| <b>Atipik Clostridialar</b>          |  |   |
| <i>Clostridium piliforme</i>         | Tay, laboratuvar hayvanları, diğer yabani ve evcil hayvanlar         | Tyzzet hastalığı hepatik nekrozis   |

## 2.2. Enteropatojenik Enfeksiyonlarda *Clostridium perfringens* Toksinlerinin Rolü

Klostridial enterotoksemiler koyun, kuzu, buzağı, domuz yavruları ve nadiren tayları etkileyen son derece öldürücü intoksikasyonlar olup, hastalığın oluşumunda *Clostridium perfringens* türleri tarafından salgılanan majör ekzotoksinler rol oynar. Başlıca majör toksinler alfa (CPA), beta (CPB) epsilon (ETX), iota (ITX), enterotoksin (CPE) ve nekrotik B benzeri (NetB) toksinlerdir (Tablo 2). Bunun yanında doku hasarına katkıda bulunan hemolizin, kollagenaz, hyaluronidaz ve DNaz gibi minör toksinler üretilmektedir Konakçı toksin etkileşimi çoğu durumda, spesifik reseptörler yoluyla hedef hücrelerin plazma membranları üzerinde başlamakta, takiben hücre ölümü de dahil farklı hücre içi yolların aktivasyonu ile etki mekanizmasını ortaya koymaktadır (Markey ve ark, 2013; Navarro ve ark, 2018).

**Tablo 2.** *Clostridium perfringens* alt tipleri ve salgılanan majör toksinler (Navarro ve ark, 2018'den uyarlanmıştır)

| Tip | Üretilen Toksinler |               |                  |               |     |      |
|-----|--------------------|---------------|------------------|---------------|-----|------|
|     | $\alpha$ (CPA)     | $\beta$ (CPB) | $\epsilon$ (ETX) | $\iota$ (ITX) | CPE | NetB |
| A   | +                  | –             | –                | –             | –   | –    |
| B   | +                  | +             | +                | –             | –   | –    |
| C   | +                  | +             | –                | –             | +/– | –    |
| D   | +                  | –             | +                | –             | +/– | –    |
| E   | +                  | –             | –                | +             | +/– | –    |
| F   | +                  | –             | –                | –             | +   | –    |
| G   | +                  | –             | –                | –             | –   | +    |

\*alfa (CPA), beta (CPB), epsilon (ETX), iota (ITX), enterotoksin (CPE) ve nekrotik B benzeri (NetB)

Bunlardan CPA; doğada çok yaygın bulunur, tüm *Clostridium perfringens* alt tipleri tarafından üretilir, lesitinaz (fosfolipaz) olarak da bilinir, hücre membranında fosfolipidlerin yıkımlanmasına neden olarak etki eder. İnsanlarda gazlı gangren etkenidir, hayvan hastalıklarındaki rolü sınırlı ve tartışmalıdır. CPB hücre membranında por oluşturan bir toksindir, vasküler endotel hücrelerine bağlanarak dejenerasyon, tromboz ve yıkımlanmaya sebep olur. Tüm hayvanlar ve insanlarda hemorajik ya da nekrotik enteritisten sorumludur. ETX, *C. perfringens* en şiddetli etkileri olan toksini olarak kabul edilmektedir. Prototoksin olarak salgılanır. CPB gibi hücre membranında por oluşumuna sebep olur. Koyun ve keçilerin

enterotoksemisinde rol oynar. ITX aktin iskeletine etki ederek hücre ölümüne sebep olan bir toksindir, prototoksin olarak salgılanır, enteritis/hemorajik enteritisten sorumludur. CPE özellikle insanlarda gıda kaynaklı zehirlenmelerde veya gıda kaynaklı olmayan ishallerde rol oynar. NetB ise tavuklarda nekrotik enteritisin sebebidir (Markey ve ark, 2013; Stiles ve ark, 2013; Navarro ve ark, 2018).

### **2.3. *Clostridium perfringens* Epsilon Toksin**

*C. botulinum* ve *C. tetani*'den sonra bilinen en güçlü klostridial toksin olan ETX, *C. perfringens* tip B ve D tarafından sentezlenir. Başta koyun ve keçilerde, daha az olarak sığırlarda klostridial enterotoksemilerin nedenidir. Çok küçük miktarları (LD<sub>50</sub> dozu 70 ng/kg vücut ağırlığı) bile öldürücü olan epsilon toksin, biyolojik savaş/terör gibi uluslararası kaygılar nedeniyle olası kötü niyetli kullanıma karşı özel moleküller listesinde yer almıştır. USDA 2012 yılının sonuna kadar bu toksini selektif ajanlar listesinde bulundurmamıştır. Fransa'da ise hala potansiyel biyolojik silah olarak kabul edilmekte ve laboratuvar çalışmaları için bile özel izin gerekmektedir (Stiles ve ark, 2013; Navarro ve ark, 2018).

#### **2.3.1. Yapısal Özellikleri**

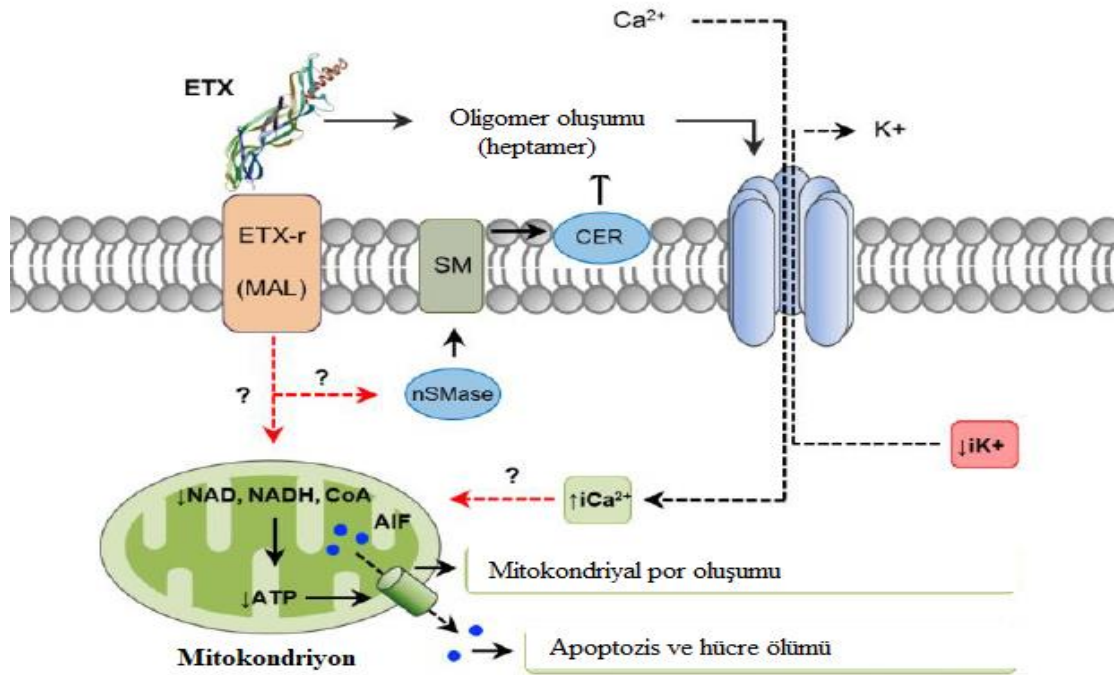
ETX; plasmid DNA'sından 32.9 kDa ağırlığında 311 amino asitli bir prototoksin olarak salgılanır. Takiben konakçı tarafından üretilen tripsin,  $\alpha$ -kimotripsin, karboksipeptidaz veya bazı *C. perfringens* suşları tarafından üretilen  $\lambda$ -metalloproteinaz gibi intestinal proteazlar tarafından 10-13 amino (N) terminal ve 22-29 karboksi (C) terminal rezidülerinin proteolitik olarak uzaklaştırılması ile aktif, maturasyonunu tamamlamış toksine dönüşür. Prototoksinden 1000 kat daha toksik kabul edilen bu molekülün amino asit kayıpları nedeniyle molekül ağırlığı yaklaşık 27 kDa'na gerilemektedir. Amino asit sekansları eşdeğer olmamakla birlikte epsilon toksin, *Aeromonas sp.* tarafından üretilen aerolizine yapısal benzerlik göstermektedir. Üç temel bölgesi bulunan bir protein yapısına (Şekil 2) sahiptir (Stiles ve ark, 2013; Uzal ve ark, 2014a, 2014b; Navarro ve ark, 2018).



**Şekil 2.** *Clostridium perfringens* epsilon toksinin kristalize yapısı (Stiles ve ark, 2013)

### 2.3.2 Hücresel Etki Mekanizması

ETX, spesifik reseptörlere bağlanarak ökaryotik hücre membranlarında por oluşumu yoluyla etkisini gösterir (Şekil 3).



**Şekil 3.** *Clostridium perfringens* epsilon toksinin intraselüler etki mekanizması (Navarro ve ark, 2018'den uyarlanmıştır) (ETX: Epsilon toksin, ETX-r: Epsilon toksin reseptörü, nSMase: Nötral sifingomiyelinaz, SM: Sfingomiyelin, CER: Seramid, NAD, NADH: Nüketinamid dinükleotid, CoA: Ko-enzim A, ATP: Adenezin trifosfat, AIF Apoptozise neden olan faktör)



ETX molekülünün reseptörlere bağlanmasından sonra nötral sfingomiyelinaz aktive olur, aktive olan bu enzim hücre membranındaki sfingomiyelini hidrolize eder ve lipid bilayer tabakasının dış katında seramid oluşur. Ortaya çıkan seramid ETX'ten oligomer oluşumunu (zayıf seçici iyon kanalları) kolaylaştırır. Oligomerizasyon plasma membranında heptamerik bir por oluşumuna neden olur. Por oluşumu intaselüler  $K^+$  iyonlarında hızlı bir kayba,  $Na^+$  ve  $Cl^-$  iyonlarının hücre içinde girişine ve sonuçta  $Ca^{+2}$  iyonlarının hücre içinde artışına yol açar. Hücre içi artan  $Ca^{+2}$  iyonları ETX'ten etkilenen hücrelerde enerji üretiminde ihtiyaç duyulan önemli ko-enzimlerin (NAD, NADH, CoA) kaybına, mitokondriyal membranda permeabiliteyi arttıran por oluşumuna, ATP'nin tükenmesine ve sonuçta apoptozis ve hücre ölümüne sebep olur. Epsilon toksin aktin hücre iskeleti ve hücre bağlantılarının organizasyonunda bir değişiklik oluşturmamaktadır (Uzal ve ark, 2014a; Navarro ve ark, 2018).

### 2.3.3. ETX'e Bağlı Genel Toksemi Tablosu

Epsilon toksin letal, sitotoksik ve dermonekrotik etkilidir. Toksin intestinal mukozadan emilir ve sirkülasyon yoluyla farklı organlara yayılır. Toksin kan-beyin bariyerini geçer. Önemli patolojik değişiklikler beyinde meydana gelir. Toksinin en temel özelliği vasküler permeabiliteyi bozması ve kan basıncını arttırmasıdır. Beyin endotelindeki spesifik reseptör bölgeleri ile etkileşime girerek vasküler endotel hücrelerinde dejenerasyona sebep olur. Mikrovasküler damar hasarına bağlı olarak generalize perivasküler ödem, intraserebral basınç artışı, serebral hipoksi ve parankimal beyin hasarı (fokal simetrik ensefalomalezi) gelişir. Bazı nöronlar, oligodendrositler ve astrositlerin doğrudan etkilenebildiği belirtilmektedir. Beyin hasarı neticesinde hayvanlarda şiddetli nörolojik bulgular gözlemlenir. Lezyonlar doza ve zamana bağlı artış gösterir. (Popoff, 2004; Stiles ve ark, 2013; Uzal ve ark, 2014a, 2014b; Navarro ve ark, 2018). Benzer bulgular akciğerler ve kalpte de şekillenir. Büyük miktarda perikardiyal ve pleural sıvı, pıhtılaşmış fibrin parçaları, intertisyel akciğer ödemi, hava keselerinde köpük oluşumu görülür (Uzal ve Songer, 2008).

Toksin enjekte edilen farelerin renal distal tubullerinde şiddetli dejenerasyon ve hemorajiler görüldüğü bildirilmekle (Soler Jover ve ark, 2004) birlikte; yumuşak böbrek hastalığı olarak bilinen enfeksiyonun böbrekler üzerindeki bulgularının tutarsızlık gösterdiği, muhtemelen post-mortem bir sonuç olduğu ve tanısal kanıt olarak kabul edilemeyeceği üzerinde durulmaktadır (Stiles ve ark, 2013; Uzal ve ark, 2014a).

Etkilenen koyun ve keçilerde ayrıca enterotoksemi bulguları dikkati çeker. Abdominal sıvı birimi, kolonda sıvı ve gaz birikimine bağlı genişleme, serozalarda hiperemi, intestinal lümeninde fibrin parçacıklarının oluşumu ve hemorajik diyare geliştiği görülür (Uzal ve Songer, 2008).

#### **2.3.4. Epsilon Toksinin Hücre Hatları Üzerindeki Etkisi**

ETX, MDCK ve daha az miktarda insan leiomyoblastoma (G-402) olmak üzere birkaç hücre hattında toksik etki gösterir. Bununla beraber, enfeksiyondan doğal olarak etkilenen türlerin (koyun ve sığır gibi) böbrek hücre hatlarının (MDBK) dirençli olduğu gözlenmiştir. Ayrıca toksinin kobay ve tavşan peritoneal makrofajları üzerinde toksik etkisinin bulunduğu belirtilmektedir (Popoff 2004; Uzal ve ark, 2014a; Navarro ve ark, 2018).

Toksinin MDCK hücrelerindeki toksisitesi üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Petit ve ark, 1997; Borrmann ve ark, 2001; Soler Javer ve ark, 2004). Bu çalışmalarda toksinin hücrelerin apikal membran yüzeyinde bulunan kendisine spesifik reseptörlere bağlandığı, toksinin bağlanmasından sonra hücrelerde şişme, dışa doğru büyük membran kompleksi şeklinde tomurcuklanma ve oligomerizasyon ile heptamerik por oluşumunun geliştiği, bunun sonucunda hücre permeabilitesi ile membran polarizasyonun değiştiği, membran hasarı ve hücrenin iyon dengesinin bozulması neticesinde hücre siklusu değişiklikleri ile beraber hücrenin ölüme gittiği gösterilmiştir.

ETX'in varlığında MDCK hücrelerinde sitotoksik etkiler hızlı gelişmektedir. Toksikite düzeyi maruz kalma süresi yanında, ısı ile artış göstermektedir. Isı ile inkübasyon yapılan durumlarda, oluşan büyük membran kompleksinin daha stabil olduğu, düşük ısıda inkübe edilenlerin aksine bazı kimyasal ve fiziksel ajanlarla (SDS ve ısı gibi) dissosiyeye edilemediği, ancak pH'nın toksisite üzerinde etkisinin bulunmadığı gözlenmiştir (Lindsay, 1996; Petit ve ark, 1997).

Bu çalışmada, TNT'ye alternatif olarak, MDCK hücre hatlarında nötralizasyon testinin uygulanabilirliği ve bu metodun sonuçların referans metotla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## 3. GEREÇ ve YÖNTEM

### 3.1. Gereç

#### 3.1.1. Aşılar

Çalışmada Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Bölümüne kalite kontrol testleri yapılmak üzere gönderilen farklı üreticilere ait ticari aşı serileri kullanılmıştır. Bunlardan 21 tanesi *Clostridium perfringens* epsilon toksoid içeren farklı kombinasyonlarda hazırlanmış polivalan inaktif aşılar iken, 10 tanesini bu komponentten yoksun negatif örnekler oluşturmaktadır. Negatif örnekler klostridial olan ya da olmayan örneklerden seçilmiştir.

#### 3.1.2. Hayvanlar

Hayvanlar üzerindeki testler; daha önce aşılama geçmişi bulunmayan sağlıklı tavşan ve fareler üzerinde yürütülmüştür (CFR, 2012; EP, 2018a). Tavşanlar (3-6 aylık Yeni Zelanda ırkı, dişi ya da erkek) immunizasyonun yapılması, fareler (18-22 gr ağırlığında Swiss Albino ırkı dişi ya da erkek) ise TNT için kullanılmıştır. Tüm deneme hayvanları Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Deney Hayvanları Biriminden temin edilmiş, test süresince yem ve su ad libitum verilmiştir.

#### 3.1.3. Standart Toksin ve Antitoksinler

Gerek TNT’de gerekse MDCK hücre analizinde kullanılan standart toksin ve antitoksinler USDA-APHIS’den elde edilmiştir. Standart toksin olarak *Clostridium perfringens* tip D epsilon toksin-IRP 632, antitoksin olarak *Clostridium perfringens* tip D epsilon antitoksin-IRP 249 kullanılmıştır.

##### 3.1.3.1. Standart toksinin hazırlanması

Fare TNT’de standart toksin 1/150 dilusyonda kullanıldı. Bu amaçla IRP 632’nin 0,5 ml’si 4,5 ml pepton diluenti (%1 pepton, %0.25 sodyum klorid, pH 7,2) içinde 1/10 oranında

dilue edildi. Daha sonra 1/10'luk toksin dilüsyonunun 1 ml'si 14 ml diluent içine katılarak 1/150'lik dilüsyonu gerçekleştirildi. Takiben aşağıdaki şekilde 10 L<sub>0</sub> ve 10 L<sub>+</sub> dozları hazırlandı.

0,6 ml 1/150 dilue edilmiş toksin + 0,4 ml pepton diluent = 10 L<sub>0</sub> doz

0,8 ml 1/150 dilue edilmiş toksin + 0,2 ml pepton diluent = 10 L<sub>+</sub> doz

Standart toksin ve 1/10'luk dilüsyonu -60°C ve altında stabil olduğundan, bu koşullarda muhafaza edilmiş, daha ileri dilüsyonları her çalışmadan önce hazırlanmıştır.

MDCK hücre analizi için standart toksin gene 1/150 dilue edilmiştir. Dilüsyon hazırlamak için IRP 632'nin 1 ml'si 9 ml EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium diluenti) ile dilue edildi. EMEM; %5 fetal bovin serum (FBS) ve % 0.1 penisilin-streptomisin ile hazırlanmıştır. Takiben 1/10'luk toksin dilüsyonunun 1 ml'si 14 ml EMEM ile sulandırılarak 1/150'lik dilüsyon elde edilmiştir. IRP 632'nin 1/10'luk dilüsyonu -60°C ve altında stabildir. İleriki dilüsyonları her çalışma öncesinde taze olarak hazırlanmıştır.

### 3.1.3.2. Standart antitoksinin hazırlanması

Standart antitoksin (IRP 249) mililitrede 50 antitoksin ünitesi (İÜ/ml) içermektedir. TNT'de 1 İÜ/ml antitoksin içeren dilüsyonu kullanılmıştır. IRP 249'un 2 ml'si 98 ml pepton diluenti ile dilue edilerek 1/50'lik dilüsyonu hazırlandı. Hazırlanan 1/50'lik antitoksin dilüsyonu -70 ±10°C'da muhafaza edildiğinde stabildir. Alikotlanarak saklanmıştır.

MDCK hücre analizinde kullanılan antitoksinler aynı yöntemle EMEM'de dilue edilerek hazırlanmıştır. Hücre hattı analizinde alikotlanmış antitoksinlerle bir örnek sonuçlar alınamadığından her çalışma öncesinde antitoksin dilüsyonları taze olarak hazırlanmıştır.

### 3.1.4. MDCK Hücre Hatları

Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü hücre kültürü koleksiyonunda bulunan MDCK epitel hücrelerinden (ATCC CCL-34) hazırlanmıştır. Hücreler yaklaşık 3x10<sup>5</sup> hücre/ml konsantrasyonunda hazırlanarak pleyte yerleştirilmiştir.

Stok hücreler -70 °C 'lik derin dondurucu ve/veya sıvı azot (-196°C) tankında muhafaza edilmektedir. Stok hücreler öncelikle 37°C'de su banyosunda çözdürülmüştür. Çözdürülen hücre %10 FBS'li 6-8 ml EMEM içeren 25 cm<sup>2</sup>'lik doku kültürü flasklarına alınarak pipetleme yardımıyla resüspanse edilmiştir. Doku kültürü flasklarının 37°C'ta %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 4-6 saat inkübasyondan sonra vasat değişimi (%10 FBS'li 6-8 ml EMEM ile)

yapılmıştır. Hücrelerin 25 cm<sup>2</sup>'lik doku kültürü flaskında monolayer halini alması ve gelişimini tamamlamasından sonra vasat uzaklaştırılmış ve hücre yüzeyi 0,5 ml Tripsin-EDTA solusyonu ile 2-3 tekrarlı yıkanmıştır. Bu arada flask yatay konumda hafifçe birkaç kez sallanarak solüsyonun hücre yüzeyi ile tamamen teması sağlanmıştır. Hücrelerin flask yüzeyinden tamamen ayrılmasını takiben, hücre vasatı içinde pipetleterek süspansiyon haline getirilmiş ve buradan 75 cm<sup>2</sup>'lik doku kültürü flasklarına aktarılmıştır. Aktarılan hücrelerin 75 cm<sup>2</sup>'lik doku kültürü flaskında monolayer halini alıp gelişimini tamamlamasından sonra içindeki vasat dökülmüş, hücre yüzeyi 1,5ml Tripsin-EDTA solusyonu ile 2-3 tekrarlı yıkanmış ve hücre yüzeyi ile solüsyonun tamamen teması sağlanmıştır. Hücrelerin flask yüzeyinden tamamen ayrılması sonrasında hücre vasatı içinde yeniden süspansiyon haline getirilerek İmproved Neubauer lamında mililitredeki hücre sayısı belirlenmiştir. Takiben elde edilen süspansiyondan bir taraftan sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 1/5 split oranı ile 75 cm<sup>2</sup>'lik doku kültürü flaskına subkültür yapılırken, diğer taraftan mililitredeki hücre sayısı 3x10<sup>5</sup> olacak şekilde resüspanse edilerek 96 gözlü pleyte her kuyucuk için 100 µl konulmuş, 24 saat 37°C'lik %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde tutulduktan sonra pleytler testte kullanılmıştır.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. İmmünizasyon Prosesi ve Serum Örneklerinin Elde Edilmesi**

Tavşanların immünizasyon işlemleri uluslararası monograflar ve ürünlerin onaylanmış protokol dosyaları dikkate alınarak yürütülmüştür (CFR, 2012; EP, 2018a). Her ürün için 10 adet 3-6 aylık sağlıklı tavşan önerilen dozda 21-28 gün arayla 2 defa subkutan yolla aşılanmış, ikinci aşılardan 14 gün sonra herbir hayvandan kan (8-12 ml) alınmıştır (Şekil 4). Kan alma işlemleri, kulak venasından veya kalpten vacotainer (20 G x 1 ½ inç iğne) yardımıyla vakumlu kaolinli tüplere yapılmıştır. Kan tüpleri 20-25°C'de 30-60 dakika bekletilmiş ve takiben 2200 RPM'de 10-20 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmıştır. Her hayvanın serumundan eşit miktarda alınarak her seri aşı için serum havuzları oluşturulmuş, TNT ve MDCK nötralizasyon testleri için porsiyonlanarak -20°C de saklanmıştır.

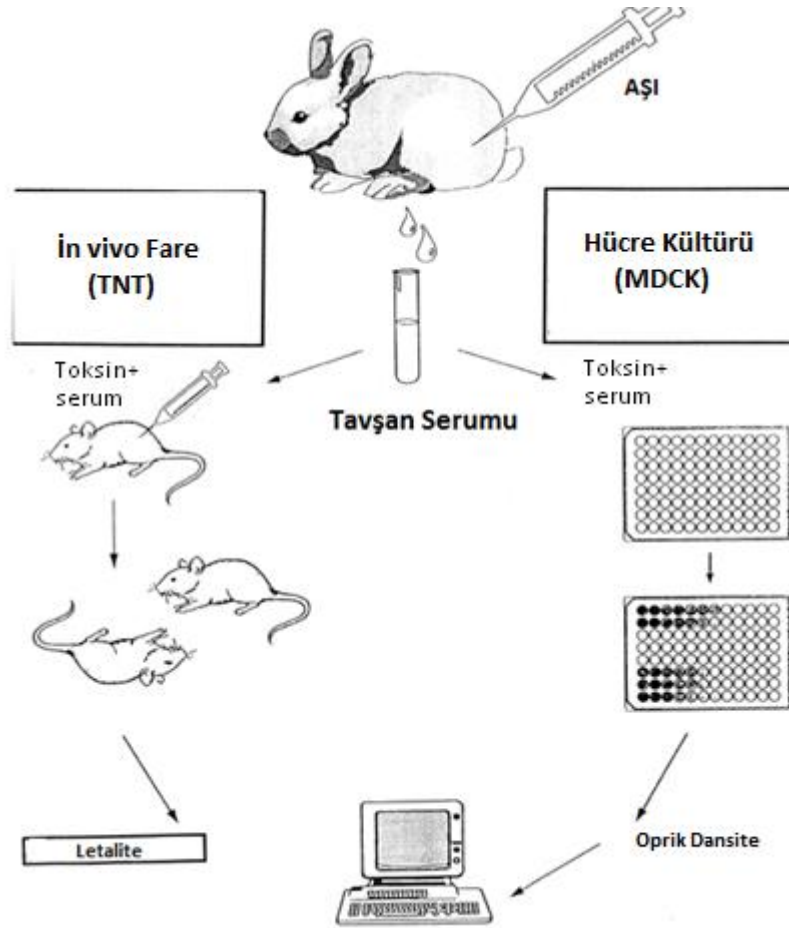
### 3.2.2. Fare Toksin Nötralizasyon Test Prosedürü

Bu amaçla *C. perfringens* tip D epsilon standart toksin ve standart antitoksin preparatları pepton dilüenti ile 3.1.3.1 ve 3.1.3.2 bölümlerinde belirtildiği şekilde lotuna özgü oranda dilüe edilmiş, toksinin mililitrede 10 L<sub>0</sub> ve 10 L<sub>+</sub> toksin dozları hazırlanmış, antitoksin ise mililitrede 1 İÜ olacak ayarlanmıştır. Test için aşağıdaki karışımlar hazırlanmıştır;

1 hacim 10 L<sub>0</sub> doz standart toksin + 1 hacim standart antitoksin karışımı,

1 hacim 10 L<sub>+</sub> doz standart toksin + 1 hacim standart antitoksin karışımı ve

1 hacim 10 L<sub>0</sub> toksin + 1 hacim örnek serum karışımları hazırlanmıştır. Örnek serumlar aranan İÜ antitoksin düzeyi dikkate alınarak (örneğin 5 İÜ düzeyinde antitoksin aramak için serumlar 1/5 oranında) dilüe edilmişlerdir.



Şekil 4. *In vivo* (fare) ve *in vitro* (MDCK hücre kültürü) potens testi (Ebert ve ark, 1999'dan uyarlanmıştır)

Hazırlanan karışımlar oda sıcaklığında (20-26°C'de) bir saat inkube edilmiş ve daha sonra farelere intravenöz olarak, lateral kuyruk veninden 1 ml'lik (25-27 G x 7/8-1 ¼ inç)

insülin enjektörü yardımıyla verilmiştir. Fare başına 0.2 ml olacak şekilde enjeksiyonlar yapılmış ve her karışım 5 adet fareye uygulanmıştır. Enjeksiyondan sonra fareler 48-72 saat gözlem altında tutulmuş ve letalite bulguları yönünden sonuçlar kayıt altına alınmıştır (Şekil-4).

Test sonuçları aşağıdaki şekilde değerlendirilmiştir;

10 Lo doz standart toksin + standart antitoksin karışımı verilen 5 adet farenin tamamının yaşaması,

10 L+ doz standart toksin + standart antitoksin karışımı verilen 5 adet farenin en az %80'nin (4 adet) ölmesi,

10 Lo standart toksin+ örnek serum karışımı verilen farelerde ise serum örneklerinde aşılamaıyla oluşan antitoksin miktarının, belirlenen toksin düzeyine eşit ya da yüksek olması durumunda 5 farenin sağ kalması gerekir (CFR, 2012).

### **3.2.3. MDCK Hücre Kültüründe Toksin Nötralizasyon Yöntemi**

#### **3.2.3.1. Test reagentlerinin hazırlanması**

##### **i. Kristal Viyole Solüsyonu (%0.25)**

Kristal viyole boyasının 2.5 g'ı 1000 ml distile su içinde solüsyon haline gelinceye kadar karıştırılarak çözdürülmüştür (USDA-CVB, 2016).

##### **ii. Hücre Kültürü Vasatı (EMEM)**

Eagles'ın MEM solüsyonuna (Sigma M4655) kullanım zamanında 1 ml penisilin/streptomisin (50/50) solüsyonu ve 50 ml FBS ilave edilir ve karıştırılır (USDA-CVB, 2016).

#### **3.2.3.2. Standart toksin, antitoksin ve bilinmeyen serum örneklerinin hazırlanması**

Standart toksin 3.1.3.1 bölümünde belirtildiği gibi EMEM ile lotuna özgü 1/150 dilüe edilmiş, ardından aşağıdaki şekilde 5 ayrı tüpe daha ileri dilüsyonları yapılarak test için hazırlanmıştır;

- 1.tüp (1/2100 dilüsyon); 154 µl 1/150 toksin + 2 ml EMEM
- 2.tüp (1/1800 dilüsyon); 182 µl 1/150 toksin + 2 ml EMEM
- 3.tüp (1/1500 dilüsyon); 222 µl 1/150 toksin + 2 ml EMEM
- 4.tüp (1/1200 dilüsyon); 286 µl 1/150 toksin + 2 ml EMEM
- 5.tüp (1/900 dilüsyon); 400 µl 1/150 toksin + 2 ml EMEM

Standart antitoksin 3.1.3.2 bölümünde tanımlandığı gibi lotuna özgü 1/50 dilüe edilmiş, ardından pleyte eklenmeden hemen önce 10 katlı daha dilüe edilerek 0.1 İÜ/ml olacak şekilde test antitoksini ayarlanmıştır.

Bilinmeyen serum örneklerinin hazırlanmasında; aranan İÜ antitoksin düzeyine göre (örneğin testin 5 İÜ'ye göre yürütülmesi durumunda havuzlanmış bilinmeyen serum örneklerinin 1/5 dilüe edilmesi gibi) hücre kültürü medyumunu ile dilüe edilmiştir. Takiben pleyte girilmeden hemen önce serum örneklerinin standart antitoksinde olduğu gibi 1/10 ileri dilüsyonları gerçekleştirilmiştir (USDA-CVB, 2016).

### **3.2.3.3. Testin yürütülmesi**

Standart toksin/standart antitoksin karışımları, canlı hücre kontrol, toksin kontrol ve bilinmeyen test serumları pleyte Şekil 5'te gösterildiği şekilde yerleştirilmiştir. Her pleytte 1 toksin-antitoksin kontrol, 3 bilinmeyen örnek, 1 canlı hücre kontrol ve 1 toksin kontrol çalışılmıştır.

Standart antitoksin (0.1 İÜ/ml) Şekil 5'teki plan dahilinde yapışma özelliği bulunmayan bir U tabanlı pleyte 1-5 ve A-D arasındaki kuyucuklara 100 µl olarak eklenmiştir. Pleytin 8-12/A-D kuyucuklarına birinci bilinmeyen serum, 1-5/E-H kuyucuklarına ikinci bilinmeyen serum, 8-12/E-H kuyucuklarına üçüncü bilinmeyen serum yerleştirilmiştir. Serum örnekleri de standart antitoksin gibi kuyucuk başına 100'er µl olarak koyulmuştur. Takiben kuyucuklara Şekil-5'te belirtilen plan dahilinde dereceli şekilde dilüe edilmiş standart toksinlerden 100'er µl olacak şekilde eklenmiştir. Bu yerleştirmede standart antitoksin ya da bilinmeyen serum örneklerinin çalışıldığı her bir alanda, 1.sütuna standart toksinin 1/2100 dilüsyonu, 2. sütuna standart toksinin 1/1800 dilüsyonu, 3.sütuna standart toksinin 1/1500 dilüsyonu, 4. sütuna standart toksinin 1/1200 dilüsyonu ve 5.sütuna standart toksinin 1/900 dilüsyonu eklenmiştir. Her bir dilüsyon düzeyinde 4 kuyucuk çalışılmıştır.



|          | 1                     | 2                     | 3                     | 4                     | 5                    | 6                   | 7 | 8                     | 9                     | 10                    | 11                    | 12                   |
|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| <b>A</b> | Standart Antitoksin   |                       |                       |                       |                      | Blank               |   | Bilinmeyen Serum 1    |                       |                       |                       |                      |
| <b>B</b> | Std. Toksin<br>1/2100 | Std. Toksin<br>1/1800 | Std. Toksin<br>1/1500 | Std. Toksin<br>1/1200 | Std. Toksin<br>1/900 | Canlı Hücre Kontrol |   | Std. Toksin<br>1/2100 | Std. Toksin<br>1/1800 | Std. Toksin<br>1/1500 | Std. Toksin<br>1/1200 | Std. Toksin<br>1/900 |
| <b>C</b> |                       |                       |                       |                       |                      |                     |   |                       |                       |                       |                       |                      |
| <b>D</b> |                       |                       |                       |                       |                      |                     |   |                       |                       |                       |                       |                      |
| <b>E</b> |                       |                       |                       |                       |                      | Bilinmeyen Serum 2  |   |                       |                       |                       | Toksin kontrol        |                      |
| <b>F</b> | Std. Toksin<br>1/2100 | Std. Toksin<br>1/1800 | Std. Toksin<br>1/1500 | Std. Toksin<br>1/1200 | Std. Toksin<br>1/900 | Blank               |   | Std. Toksin<br>1/2100 | Std. Toksin<br>1/1800 | Std. Toksin<br>1/1500 | Std. Toksin<br>1/1200 | Std. Toksin<br>1/900 |
| <b>G</b> |                       |                       |                       |                       |                      |                     |   |                       |                       |                       |                       |                      |
| <b>H</b> |                       |                       |                       |                       |                      |                     |   |                       |                       |                       |                       |                      |

**Şekil 5.** MDCK hücre kültürü analizinde pleytin yerleşimi

Pleytin ortasında canlı hücre kontrolü ve toksin kontrolü kuyucukları (her biri için 4'er kuyucuk) bırakılmıştır. Canlı hücre kontrolü için 6-7 / C-D, toksin kontrolü için 6-7 / E-F kuyucukları kullanılmıştır. Canlı hücre kontrolü için ilgili kuyucuklara 200 µl EMEM, toksin kontrolü için ise 200 µl 1/150'lik toksin dilüsyonu eklenmiştir. Takiben dilüsyon pleyti bir orbital çalkalayıcıda (80-120 RPM) 20-25°C'da 60±5 dk çalkalanarak inkübe edilmiştir.

Bu işlemlerin sonuna doğru, CO<sub>2</sub>'li inkübatörden çıkarılan hücre kültürü pleytinin (hücre büyümesinin tüm kuyucuklarda %90-100 kaplamış olduğunu teyit edilmiş) vasatı dökülmüş, emici bir kâğıtla artık sıvı uzaklaştırılmış ve dilüsyon pleytinin her bir kuyucuğundan 100 µl, hücre kültürü pleytinin karşılık gelen kuyucuklarına aktarılmıştır. Hücre kültürü pleyti 35-37°C'da CO<sub>2</sub>'li inkübatörde üzeri bir pleyt kapağı ile kapatılarak 1 gece (16-24 saat) inkübe edilmiş, ardından pleyt boşaltılmış, kuyucuk başına 75 µl olacak şekilde kristal viyole eklenmiş, bir orbital çalkalayıcı (80-120 RPM) ile 20-25°C'da 5±1 dk bekletilerek karıştırılmıştır. Ardından pleyt 3 defa distile su ile yıkanmış, canlı kalan hücrelerin resüpsansiyonu için 100 µl izopropil alkol eklenmiş ve pleyt, bir orbital çalkalayıcıda (80-120 RPM) 20 ± 25°C'de 5 ± 1 dakika döndürülerek işlem görmüştür. İşlemleri tamamlanan tüm pleytler ELISA okuyucuda (*BioTek Epoch*) 590 nm'de optik dansiteleri okunmuştur.

Test sonuçlarının yorumlanmasında; canlı hücre kontrol kuyucuklarının ortalama OD'si bulunarak %50 cut off değeri hesaplanmıştır. Ayrıca standart antitoksinin bulunduğu her bir sütunun ortalama OD'si ve bilinmeyen serum örneklerinin her bir sütununun ortalama OD'leri ayrı ayrı hesaplanmıştır. Testin geçerli olması için; standart antitoksin alanında 1/900 toksin sütununun (5/A-D kuyucukları) ortalama OD değerinin cut off değerinin altında olması, standart antitoksin alanındaki 1/2100 toksin sütununun (1/A-D kuyucukları) ortalama OD değerinin cut off değerinin üzerinde olması, toksin kontrol gözlerinin (6-7/E-F) standart antitoksin alanında 1/900 toksin sütununun (sütun 5/A-D kuyucukları) ortalamasından düşük olması, canlı hücre kontrol gözlerinin ise 2.0'dan daha büyük bir OD değerine sahip olması beklenmiştir.

Ortalama OD'si, canlı hücre kontrol %50 cut off değerinden daha büyük olan sütunlar canlı, %50 cut off değerinden daha küçük olan sütunlar ölü olarak kabul edilmiştir. Sonuçta bilinmeyen serum örneklerindeki epsilon antitoksin düzeyine, bilinen antitoksin sütunları ile karşılaştırılarak karar verilmiştir. Kabul kriterlerini karşılayan başarılı bir test için bilinmeyen serum örneğinin, standart antitoksininkinden daha yüksek bir toksin konsantrasyonunda (yani daha az dilüe bir sütünde) canlı hücrelere sahip olması beklenmiştir. Bilinmeyen serum örneğinin canlı hücrelerin bulunduğu son sütununun, standart antitoksinin canlı hücrelerinin bulunduğu son sütundan daha geride ise (daha dilüe toksin düzeylerinde yanıt veriyorsa), bu durumda bilinmeyen örnek başarısız olarak kabul edilmiştir (USDA/CVB, 2016).

### **3.3. İstatistiksel Analizler**

Fare ve hücre kültürü toksin nötralizasyon test sonuçları arasındaki korelasyon, Pearson korelasyon yöntemi (%95 güven düzeyinde, çift yönlü) ile IBM SPSS İstatistik Programı (Versiyon 24) kullanılarak hesaplanmıştır. Ayrıca aynı program kullanılarak iki metodun sonuçları arasındaki linear regresyon gösterilmiştir (Aktürk ve Acemoğlu, 2010).

Araştırma ile ilgili çalışmalar, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol bölümü labortuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. MDCK Hücre Analizi Bulguları

İn vitro MDCK hücre hattı analizinde dereceli dilüsyonları yapılan bilinen toksin ve standart antitoksin karışımlarında ortaya çıkan toksisite düzeyinin, bilinmeyen serum örnekleri ile kıyaslanması neticesinde, bu örneklerdeki (test edilen serum örneklerindeki) epsilon antitoksin düzeylerine karar verilmiştir (Şekil 6a ve 6b, Resim 1). Toksikite düzeyi alınan optik dansite değerlerinin canlı hücre ve toksin kontrol kuyucuklarındaki sonuçlar ile kıyaslanması neticesinde belirlenmiştir. Bu amaçla canlı hücre kontrol kuyucuklarındaki (6-7/C-D) OD değerlerinin aritmetik ortalamasının yarısı %50 cut off değeri olarak belirlenmiş, takiben her bir dereceli toksin ile muamele edilen antitoksin veya bilinmeyen serumların bulunduğu sütunların (örneğin 1 A-D, 2 A-D gibi) ortalama OD'leri bulunmuş ve bu değerlerin %50 cut off değerinin üzerinde ya da altında olmasına göre, ilgili dereceli toksin düzeyinde hücrelerin canlı kalıp kalmadığına karar verilmiştir (Şekil 6b). Ardından bilinmeyen serum örneğinin, standart antitoksine göre eşdeğer veya daha konsantre bir toksin dilüsyonunda canlı hücrelere sahip olması dikkate alınarak, İÜ/ml cinsinden antitoksin düzeyleri belirlenmiştir (Tablo 3). Düzeyi bilinen standart antitoksinin bulunduğu kuyucuklardan (1-5 A-D) alınan sonuçlara göre, aranan İÜ düzeyi açısından uygun (8-12/A-D ve 8-12/E-H kuyucuklarında bulunan örnekler) ve uygun olmayan (1-5/E-H kuyucuğundaki örnek) test serumlarının bulunduğu bir pleytte alınan OD'ler ve bu OD'lere göre canlı ve ölü hücre sütunlarının gösterimi Şekil 6a ve 6b'de yer almaktadır.

|   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 1,720 | 0,937 | 0,660 | 0,693 | 0,634 | Blank |       | 3,150 | 2,707 | 1,755 | 0,712 | 0,474 |
| B | 1,555 | 0,945 | 0,551 | 0,593 | 0,617 | Blank |       | 3,031 | 2,923 | 1,945 | 0,900 | 0,828 |
| C | 1,660 | 0,866 | 0,627 | 0,616 | 0,422 | 2,866 | 3,079 | 2,907 | 3,011 | 1,845 | 0,921 | 0,408 |
| D | 1,918 | 0,787 | 0,651 | 0,516 | 0,605 | 2,958 | 2,899 | 3,067 | 2,807 | 1,896 | 0,827 | 0,393 |
| E | 0,597 | 0,579 | 0,503 | 0,497 | 0,485 | 0,175 | 0,226 | 2,835 | 1,937 | 1,008 | 0,345 | 0,277 |
| F | 0,754 | 0,527 | 0,539 | 0,484 | 0,289 | 0,147 | 0,237 | 2,965 | 2,002 | 0,913 | 0,412 | 0,266 |
| G | 0,536 | 0,409 | 0,430 | 0,377 | 0,416 | Blank |       | 3,028 | 2,049 | 0,928 | 0,430 | 0,311 |
| H | 0,846 | 0,579 | 0,427 | 0,451 | 0,436 | Blank |       | 3,166 | 1,920 | 0,830 | 0,387 | 0,337 |

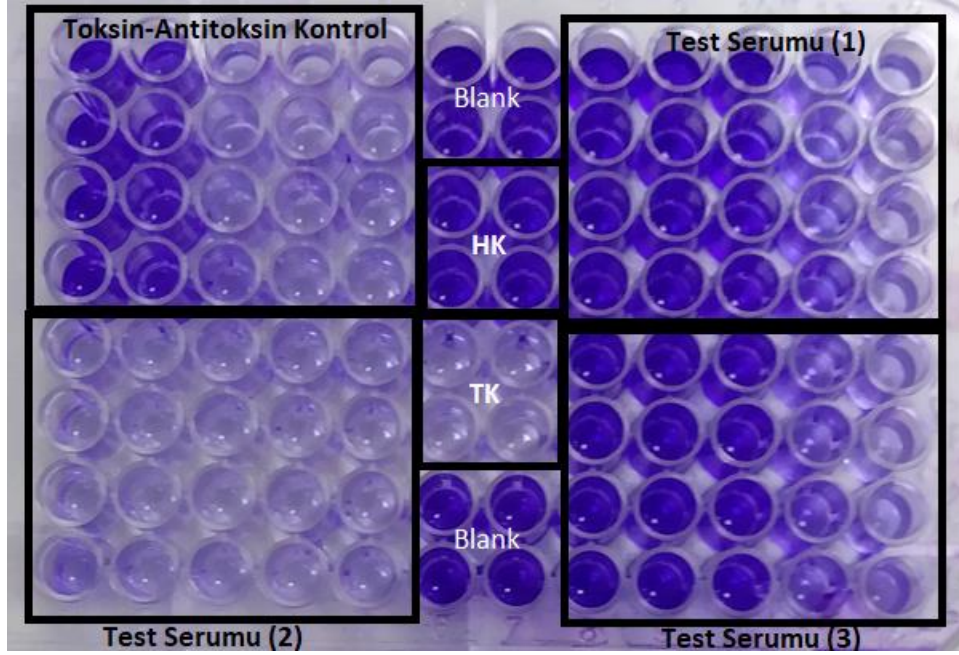
**Şekil 6a.** MDCK hücre kültürü toksisite analizi ile bir pleytte alınan OD değerleri (1-5/A-D: standart toksin-standart antitoksin kontrol, 8-12/A-D: birinci test serumu, 1-5/E-H: ikinci test serumu, 8-12/E-H: üçüncü test serumu, 6-7/C-D: EMEM kontrol, 6-7/E-F: toksin kontrol)

|   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6                     | 7 | 8       | 9      | 10      | 11     | 12     |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|---|---------|--------|---------|--------|--------|
| A |       |       |       |       |       | Blank                 |   |         |        |         |        |        |
| B | 1,713 | 0,884 | 0,622 | 0,605 | 0,570 |                       |   | 3,0388* | 2,862* | 1,8603* | 0,84   | 0,5258 |
| C | (CH)  | (ÖH)  | (ÖH)  | (ÖH)  | (ÖH)  |                       |   | (CH)    | (CH)   | (CH)    | (ÖH)   | (ÖH)   |
| D |       |       |       |       |       | 1,475<br>(%50Cut off) |   |         |        |         |        |        |
| E |       |       |       |       |       | 0,196                 |   |         |        |         |        |        |
| F | 0,683 | 0,524 | 0,475 | 0,452 | 0,407 |                       |   | 2,9985* | 1,977* | 0,920   | 0,3935 | 0,2978 |
| G | (ÖH)  | (ÖH)  | (ÖH)  | (ÖH)  | (ÖH)  |                       |   | (CH)    | (CH)   | (ÖH)    | (ÖH)   | (ÖH)   |
| H |       |       |       |       |       | Blank                 |   |         |        |         |        |        |

**Şekil 6b.** MDCK hücre kültürü toksisite analizinde alınan OD değerleri üzerinden canlı ve ölü hücre sütunlarının belirlenmesi (1-5/A-D: standart toksin-standart antitoksin kontrol, 8-12/A-D: test serumu (1), 1-5/E-H: test serumu (2), 8-12/E-H: test serumu (3), 6-7/C-D: EMEM hücre kontrol, 6-7/E-F: toksin kontrol; CH: canlı hücre, ÖH: ölü hücre, \*standart antitoksine göre birinci ve üçüncü test serumları spesifikasyonu karşılar, ikinci test serumu ise karşılamaz niteliktedir)

Negatif örneklerin MDCK hücrelerindeki toksisite analizinde, serumda antitoksin bulunmadığı için toksine bağlı hücrelerde ölüm gelişmiş ve kristal viyole ile yapılan boyamada bu gözlerin boya almaması (Resim 1, 2 nolu test serum örneği) nedeniyle düşük OD'ler verdiği (0,8 ve altında) görülmüştür (Şekil 6a ve 6b). Pozitif serum örneklerinde ise; serumdaki antitoksin düzeyine bağlı olarak, toksinin farklı konsantrasyonlarının nötralize edildiği, nötralizasyon derecesi ile orantılı bir şekilde hücrelerin canlı kaldığı ve canlı kalan hücrelerin kristal viyole ile koyu mavi renkte boyanarak (Resim 1, 1 ve 3 nolu test serum örnekleri) yüksek OD verdiği (genellikle 2 ve üzeri) gözlenmiştir (Şekil 6a ve 6b). Boyanma yoğunluğu ve dolayısı ile OD değerlerinin büyüklüğünün; artan toksin konsantrasyonuna bağlı canlı kalan hücre yoğunluğundaki azalmaya orantılı olarak, tedrici bir şekilde azaldığı görülmüştür.

EMEM bulunan canlı hücre kontrol gözleri antitoksin bulunan serum örneklerine benzer şekilde canlı olan hücreler nedeniyle koyu boyanmış (Resim 1, HK) ve yüksek OD'ler (3 düzeyinde) vermiştir (Şekil 6a ve 6b). Toksin bulunan kontrol gözlerinde ise yüksek toksin konsantrasyonuna bağlı hiç canlı hücre kalmaması nedeniyle boya almamış (Resim 1, TK) ve en düşük OD değerleri bu kuyucuklardan (0,1-0,2 dolayısı) alınmıştır (Şekil 6a ve 6b). Şekil 6a ve 6b'de optik dansiteler yönünden resmedilen pleyttteki uygun (pleyttteki 1 ve 3 numaralı serum örnekleri) ve uygun olmayan (pleyttteki 2 numaralı serum örneği) sonuçlar veren serum örneklerinin MDCK hücre analizindeki boyanma yetenekleri Resim 1'de gösterilmiştir.

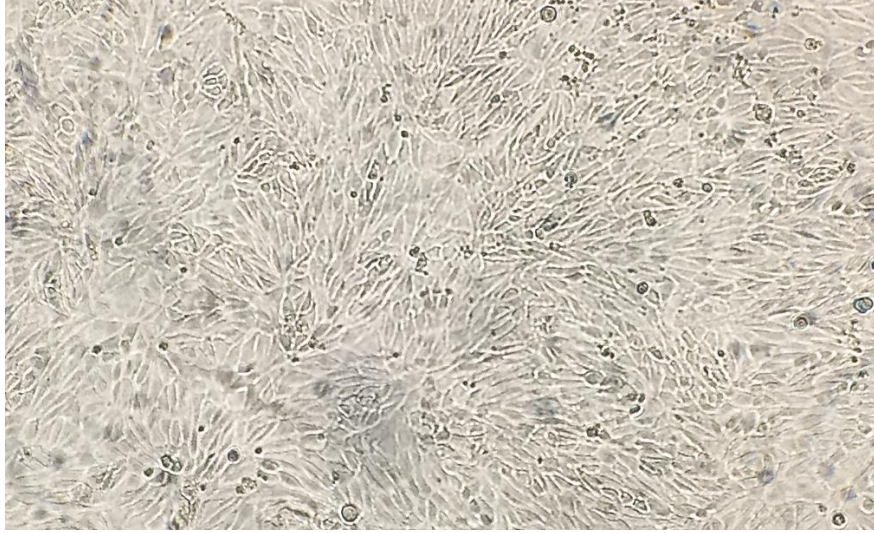


**Resim 1.** MDCK hücre kültürü toksisite analizinde pleytin görünümü (HK: hücre kontrolü, TK: toksin kontrolü, \*Pleyttteki test serumlarından 1. ve 3.serum örneklerinin geçer, 2.serum örneğinin ise kalır sonuç verdiği görülmektedir)

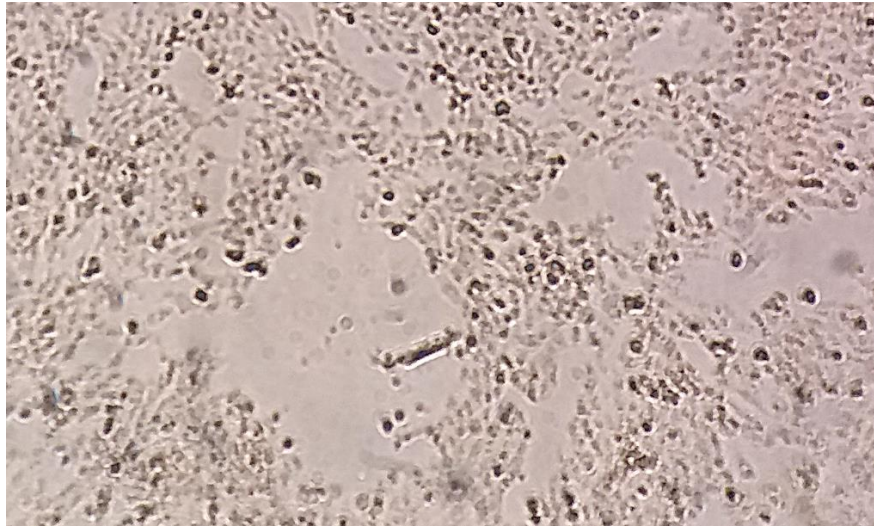
#### 4.2. Mikroskopik Bulgular

Mikroskopik olarak değerlendirildiğinde, sağlıklı MDCK hücre hattını oluşturan epiteliyal hücrelerin monolayer bir tabaka halinde, aralarında boşluk bırakmaksızın birbirlerine tutunmuş iç biçiminde hücrelerden oluştuğu ve kültürü oluşturan hücrelerin üniform bir görünüm sergilediği dikkati çekmiştir (Resim 2).

Farklı konsantrasyonlarda toksin ile muamele edilen ya da geçer limitlerde sonuç vermeyen pleytlerde ise epiteliyal hücrelerdeki üniform görünüm ve hücresel sınırların kaybolduğu, monolayer yapının bozulduğu, hücrelerin yuvarlaklaştığı, birbirlerinden ayrıldığı, aralarında geniş boşlukların ortaya çıktığı ve nukleuslarının piknotik görünüm sergilediği dikkati çekmiştir (Resim 3). Hücresel yıkımın boyutunun toksin konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı, özellikle toksin kontrol kuyucuklarında hücrelerin sadece piknotik nukleuslarının seçildiği görülmüştür.



**Resim 2.** Canlı MDCK hücre kültürünün mikroskopik görünümü



**Resim 3.** Toksin ile muamele edilen MDCK hücre kültüründeki mikroskopik görünüm

#### **4.3. Korelasyon ve Linear Regresyon Sonuçları**

İnaktif epsilon toksoid içeren farklı klostridial aşılarda deneme hayvanlarının immunizasyonundan elde edilen serum örnekleri üzerinde ayrı ayrı yürütülen *in vivo* fare TNT ile *in vitro* MDCK hücre kültürü toksisite analizlerinden alınan sonuçlar Tablo 3'te gösterilmiştir. Bulgular; TNT ve MDCK hücre kültürü analizleri ile yakın titrasyon verilerinin

elde edildiğini, bir testte geçer sonuçlar veren biyolojik ürüne ait serum örnekleri ile diğer testte de aynı doğrultuda sonuçlar alındığını göstermektedir.

**Tablo 3.** TNT ve MDCK hücre kültürü toksisite analizi ile serum örneklerinde epsilon antitoksin düzeyleri

| Serum No            | Epsilon Toksoid Varlığı | Kombinasyon   | TNT (İÜ/ml)    | MDCK (İÜ/ml)   |
|---------------------|-------------------------|---|----------------|----------------|
| 1                   | +                       | 9'lu polivalan aşısı  | 5,00           | 7,50           |
| 2                   | +                       | 8'li polivalan aşısı  | 20,00          | 17,50          |
| 3                   | +                       | 10'lu polivalan aşısı   | 8,00           | 10,00          |
| 4                   | +                       | 8'li polivalan aşısı  | 2,00           | 2,50           |
| 5                   | +                       | 7'li polivalan aşısı  | 12,50          | 15,00          |
| 6                   | +                       | 8'li polivalan aşısı  | 10,00          | 7,50           |
| 7                   | +                       | 10'lu polivalan aşısı   | 15,00          | 17,50          |
| 8                   | +                       | 6'lı polivalan aşısı  | 5,50           | 7,50           |
| 9                   | +                       | 10'lu polivalan aşısı   | 2,00           | 3,00           |
| 10                  | +                       | 8'li polivalan aşısı  | 8,00           | 10,00          |
| 11                  | +                       | 5'li polivalan aşısı  | 2,00           | 2,50           |
| 12                  | +                       | 7'li polivalan aşısı  | 15,00          | 17,50          |
| 13                  | +                       | 8'li polivalan aşısı  | 7,00           | 10,00          |
| 14                  | +                       | 9'lu polivalan aşısı  | 5,00           | 5,00           |
| 15                  | +                       | 8'li polivalan aşısı  | 10,00          | 12,00          |
| 16                  | +                       | 8'li polivalan aşısı  | 2,00           | 3,00           |
| 17                  | +                       | 8'li polivalan aşısı  | 4,00           | 5,00           |
| 18                  | +                       | 8'li polivalan aşısı  | 5,00           | 3,00           |
| 19                  | +                       | 8'li polivalan aşısı  | 2,00           | 3,00           |
| 20                  | +                       | 4'lü polivalan aşısı  | 2,50           | 2,50           |
| 21                  | +                       | 3'lü polivalan aşısı  | 12,00          | 15,00          |
| 22-31<br>(10 Örnek) | -                       | Epsilon toksoid bulunmayan klostridial/klostridial olmayan aşılar | Sonuç Alınmadı | Sonuç Alınmadı |

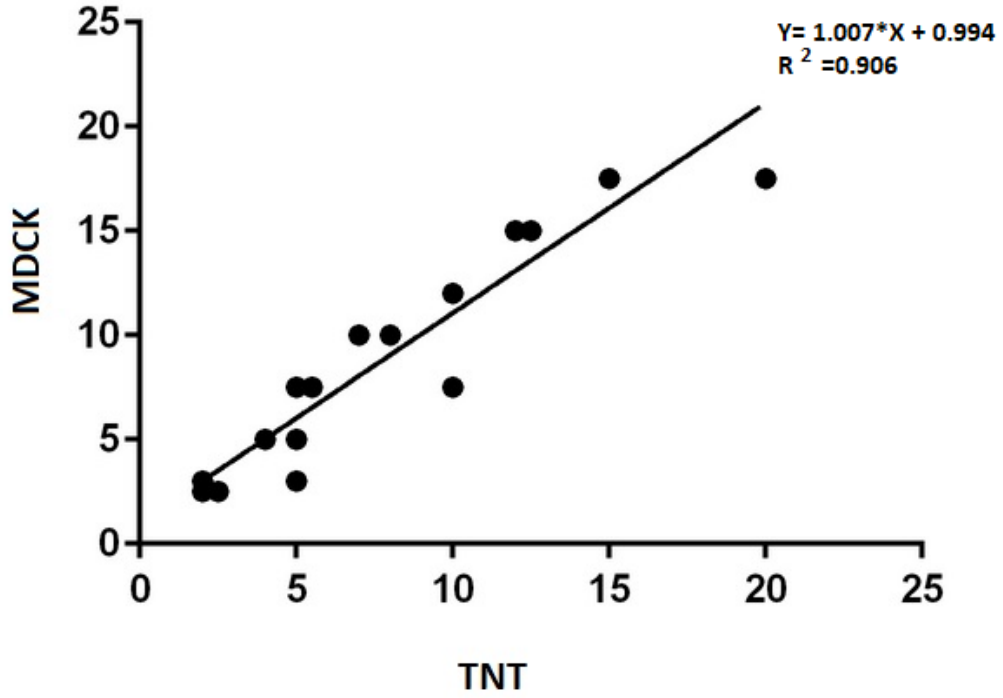
Bileşiminde epsilon toksoid bulunmayan 10 aşının gerek TNT ve gerek MDCK analizlerinde herhangi bir koruyucu yanıt gözlenmemiştir (Tablo 3).

TNT ve MDCK hücre kültürü nötralizasyon testleri arasında Pearson korelasyon katsayısı (r) 0,952 olarak bulunmuştur. Gruplar arasındaki korelasyonun istatistiksel olarak önemli olduğu ( $p < 0.01$ ,  $n=21$ , çift kuyruklu) görülmüştür. İki metoda ait sonuçlar arasındaki

regresyon ise ( $R^2$ ) 0.906 olarak belirlenmiştir (Tablo 4). Bu da iki metodun sonuçları arasında kuvvetli bir lineer ilişki bulunduğunu ifade etmektedir (Şekil 7). Test edilen serum örneklerinde alınan *in vivo* ve *in vitro* sonuçlar arasında bir miktar farklılıklar bulunmakla birlikte, kabul edilemez bir sapmanın kanıtları bulunmamaktadır.

**Tablo 4.** *İn vivo* ve *in vitro* analizler arasındaki korelasyon ve linear regresyon

| Karşılaştırılan Analizler | Örnek Sayısı (n) | Pearson korelasyon katsayısı (r) | Linear regresyon eşitliği | Regresyon ( $R^2$ ) |
|---------------------------|------------------|----------------------------------|---------------------------|---------------------|
| TNT /MDCK                 | 21               | 0,952                            | $1.007 * X + 0.994$       | 0.906               |



**Şekil 7.** TNT ve MDCK sitotoksosite analizleri arasındaki lineer regresyon eğrisi

#### 4.4. MDCK Hücre Analizi Optimizasyon Bulguları

Metodun optimizasyonu açısından elde edilen bulgular; MDCK hücre analizinde standart antitoksinin ön dilüsyonlarının yapılmasından sonraki stabilitesinin, hücre kültürü monolayer pleytlerinin hazırlanmasında kullanılan hücre yoğunluğunun ve okuma yapılan dalga boyu büyüklüğünün önemli olduğunu göstermektedir.



Standart antitoksin TNT’de kullanılmak için lotuna özgü tanımlanan oranda (1/50) dilüe edilmesinin ardından alikotlanmış halde dondurularak muhafaza edilebilmekte iken, MDCK hücre hattında 1/10 veya 1/50 dilüsyonları dondurularak saklanan antitoksinlerin iyi sonuç vermediği ve toksin-antitoksin kontrol gözlerinde alınan OD değerlerinin giderek azaldığı gözlenmiş, bu nedenle hücre kültürü toksisite analizinde antitoksin dilüsyonu her çalışmada taze olarak hazırlanmıştır. Bunun yanında bir diğer önemli gözlem, hücre kültürü pleytinde MDCK hücrelerinin  $1.0 \times 10^5$  ve  $2.0 \times 10^5$  hücre/ml yoğunluğuna göre  $3.0 \times 10^5$  hücre/ml konsantrasyonda hazırlanması ile daha iyi sonuçlar alındığının görülmesidir. Hücre yoğunluğundaki artış aynı serum örneklerinde canlı hücrelerin bulunduğu kuyucuklardaki OD değerlerini yaklaşık 0.3-0.4 OD düzeylerinde arttırmıştır. Ayrıca boyanmış mikroplyetlerde sonuçların okunmasında deneme yapılan farklı dalga boyları (405 nm, 450 nm, 490 nm, 590 nm gibi) arasından, 590 nm dışındaki dalga boylarının hiç birinde testin kabul spesifikasyonlarının karşılandığı görülmemiştir. Bu nedenle test sonuçlarının değerlendirilmesi 590 nm büyüklüğündeki dalga boyunda gerçekleşmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Avrupa “Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlarla Kullanılan Omurgalı Hayvanların Korunması Sözleşmesi” hükümleri gereği; testlerde minimum sayıda hayvan kullanılması veya hayvan kullanımının tamamen ortadan kaldırılması, daha az acı ve ızdırap veren ya da kalıcı hasara yol açmayan prosedürlerin uygulanması ve monograflardaki testlerin değerlendirme kriterlerinin bu gereklilikler doğrultusunda düzenlenmesi beklenmekte, bu amaca yönelik olarak da alternatif test yöntemlerinin kullanımının teşvik edilmesi gerekliliği üzerinde durulmaktadır (EP, 2018b). Bu yaklaşımı destekleyecek şekilde bir taraftan çeşitli sağlık kuruluşları (EDQM, ECVAM gibi) tarafından çalıştay, panel ve metot doğrulama çalışmaları yürütülürken (Hill, 2011; Lang ve ark, 2018), diğer taraftan Avrupa Farmakope içinde yakın zamanda *in vivo* yöntemlerin *in vitro* yöntemlerle nasıl değiştirileceğine dair bir kılavuz yayınlanması, bilimsel önemi olan, mevcut doğrulama gerekliliklerini yerine getiren ve *in vivo* yöntemlere göre uyumu gösterilen farklı *in vitro* prosedürlerin bu amaçla kullanımına yönelik beklentileri giderek arttırmıştır (EP, 2018c). Bu beklenti içinde klostridial aşılar önemli bir yer tutmaktadır. Ticari ölçekte sığır, koyun ve keçi yetiştiriciliğinin yapıldığı bütün dünyada yaygın bir kullanıma sahip olan bu grup aşılar genellikle çoklu kombinasyonlar halinde (10’lu kombinasyona kadar çıkan) hazırlanmakta ve globalde en fazla satılan ruminant aşıları içinde ön sıralarda yer almaktadır (Dempster, 2015). Ülkemizde de yıllık ortalama 40-60 milyon doz aşının pazara sürüldüğü görülmektedir (WEB\_2, 2019). Epsilon toksoid komponent, bu grup aşılarda hemen hemen tümünde bileşimin bir parçasını oluşturmaktadır. Klostridial aşılarda potensinin deney hayvanlarında belirlenmesi ve herbir komponent için etkinliğin gösteriminde çok sayıda deney hayvanı kullanımına ihtiyaç duyulması bu gerekliliği çok daha ön plana çıkarmaktadır. Bu bakımdan; çeşitli araştırmacılar tarafından 3R prensipleri doğrultusunda hayvan refahının iyileştirilmesini esas alan *in vitro* prosedürlerin geliştirilmesi ve doğrulanmasına yönelik araştırmalarda *Clostridia spp.* aşılarda yüksek öncelikli hedefler içerisinde olması gerekliliği dile getirilmiştir (Kulpa-Eddy ve ark, 2011; Stokes ve ark, 2011; Romberg ve ark, 2012). Dolayısıyla, epsilon toksoid içeren klostridial aşılarda potens testlerinde çok sayıda deney hayvanı kullanılan ve test hayvanlarının letalite sonuçlarına dayanan TNT yerine, toksinin hücre kültüründeki sitotoksik etkisinin nötralizasyonunu esas alan *in vitro* bir prosedürün uygulanabilirliğinin değerlendirildiği bir araştırma, gerek uluslararası monograflardaki

beklentiler, gerekse çalışılan aşı grubunun hayvan sağlığında yaygın kullanımı ve önceliği açısından bilimsel beklentilerle örtüşmektedir.

*In vivo* potens veya hayvanlarda spesifik toksisite yerine metot dönüşümlerinde; fonksiyonel bir yanıtın (virüs veya toksin nötralizasyonu gibi) ya da antijen içeriğinin *in vitro* serolojik yöntemlerle belirlenmesi, toksin bağlama ya da enzim aktivitesinin demonstrasyonu, moleküler yöntemler kullanılarak ekstra ajan genomlarının varlığı ve canlı organizmaların titrasyonu gibi farklı prosedürlerin uygulanabildiği bilinmektedir (Kulpa-Eddy ve ark, 2011; EP, 2018c). Ancak serolojik tabanlı testlerde standardize edilmiş antijen, antikor veya referans standartlara gereksinim bulunmaktadır. İşletme içi prosedürler halinde geliştirilen bu moleküllerin tanımlanması, karakterize edilmesi, saflaştırılması ya da standardizasyonundaki zorluklar bu tip testlerin önemli dezavantajları olarak durmaktadır. Ayrıca ürünlerin çeşitliliği ve formülasyonların karmaşıklığı, farklı adjuvanların varlığı veya uygun antijen ekstraksiyon yöntemlerinin eksikliği çoğu zaman analizlerin kesinliği üzerinde etki etmektedir (Stokes ve ark, 2011; Romberg ve ark, 2012). Bu bakımdan deney hayvanı yerine spesifik bir hücre hattının kullanıldığı prosedürler, bu farklılık dışında, tekniğin TNT ile aynı standartlar (toksin ve antitoksinler) kullanılarak uygulanabilmesi, ileri saflaştırılmış antijen ve antikorlara ya da antijen ekstraksiyon/elüsyon prosedürlerine gereksinim duyulmaması açısından diğer *in vitro* yöntemlerin ötesinde önemli avantajlara sahip olmasına neden olmaktadır. Ancak bu yöntemler; test örneklerinin elde edilebilmesi için, deney hayvanlarının (tavşan) aşı ile immunizasyonuna gereksinim gösterdiğinden, aşındaki antijen içeriğinin ölçülmesine dayanan metotlarda olduğu gibi hayvan ihtiyacını tamamen ortadan kaldırmamaktadır. Bununla birlikte, immunizasyon ve kan alma süreçlerinin hayvanlarda nispeten daha az acı ve ızdırap oluşturu prosedürler olduğu kabul edilebilir. Hücre hatları üzerinde çalışan Bormann ve ark. (2006)'da benzer şekilde hücre kültürlerinde yapılan çalışmaların sahip olduğu avantajlar içerisinde nonspesifik reaksiyonları bertaraf etmek için yüksek purifiye monoklonal antikorların kullanımını gerektirmemesini öne çıkarmışlar ve hücre kültürü prosedürlerinin hayvan deneylerinin karmaşık yapısı ile serolojik antikor tabanlı testler arasında bir pozisyon sergilediğini belirtmişlerdir.

Yapılan çeşitli araştırmalarda distal konvolüt tubul epiteliyal kökenli MDCK hücre hatlarının epsilon toksine duyarlı olduğu bulunmuştur (Petit ve ark, 1997; Bormann ve ark, 2001; Soler Javer ve ark, 2004). Bununla birlikte, koyun, keçi, sığır gibi ETX'ten doğal olarak etkilenen türlerin böbrek hücre hatları (MDBK) ile fare ve insan gibi spontan olarak D tipi enterotoksemi vakalarının rapor edilmediği farklı türlere ait çeşitli böbrek hücre hatlarının toksine dirençli olduğu görülmektedir (Uzal ve ark, 2014a; Navarro ve ark, 2018). Sadece

MDBK hücre hatlarının değil, Vero gibi pek çok hücre hattının da ETX'e duyarlılık göstermediği bilinmektedir. Payne ve ark (1994) tarafından Vero ve MDBK hücre hatları da dahil 12 farklı hücre hattı üzerinde epsilon toksinin duyarlılığı konusunda yapılan bir araştırmada, sadece MDCK hücre hatlarının duyarlı olduğunu, diğer hücre hatları üzerinde epsilon toksinin sitoksisite göstermediği ifade edilmiştir. Daha sonraları insan leiomyoblastoma (G-402) hücrelerinin de az miktarda da olsa ETX'e duyarlı olduğu bulunmuştur (Popoff, 2004; Uzal ve ark, 2014a). MDCK hücrelerinde ETX'in hücrelerin apikal yüzeyinde bulunan spesifik bir membran reseptörüne bağlanarak çok hızlı bir şekilde etki gösterdiği, büyük bir membran kompleksi ile por oluşumuna neden olduğu, hücrenin elektrolit dengesinin bozulması neticesinde nekrozuna yol açtığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiş, ayrıca ısı ile (örneğin 37°C'da yapılan inkübasyonlarda) toksinin membran yüzeyindeki reseptöre daha stabil bir bağlantı yaptığı, daha büyük bir membran kompleksinin oluşumuna sebep olduğu görülmüştür (Petit ve ark, 1997; Borrmann ve ark, 2001, Uzal ve ark, 2014a). Bu hücre hatları üzerinde Borrmann ve ark. (2006) tarafından yürütülen bir çalışmada, MDCK hücrelerinin *C. perfringens* epsilon toksin için hassas ve spesifik bir tespit sistemi oluşturduğu ve aşı kaynaklı antitoksinlerin kantitatif tayini için kullanılabileceği dile getirilmiştir. Bu araştırmacılar çalışmasında MDCK-ATCC/CCL-34 hücre hattını kullanmıştır. Aynı hücre hattı benzer başka çalışmalarda da kullanılmıştır (Salvarini ve ark, 2013). Bu nedenle araştırmamızdaki MDCK-ATCC/CCL-34 hücre hattı *C. perfringens* epsilon toksinin neden olduğu hücrel toksitenin nötralizasyonuna dayanan çalışmalar için çok uygun bir model oluşturmaktadır. Prosedür sırasında 37°C'da bir gece inkübasyon, ortamda denetüre olmamış toksinin varlığında sitotoksiteyi daha da arttırmaktadır.

Bu araştırmada TNT ve MDCK hücre hattı toksisite analizi ile çalışılan 21 pozitif serum örneğinde epsilon antitoksin titrelerinin korelasyonu ( $r$ ) 0.952 ( $p < 0.01$ , çift kuyruklu) olarak bulunmuştur. Klasik olarak; sayısal veriler elde edilen iki değişken arasındaki ilişkinin doğrusallığını ifade eden korelasyon katsayısının 1'e yakın olması, değişkenler arasındaki ilişkinin kuvvetli olduğunu gösterdiğinden (Aktürk ve Acemoğlu, 2010), bu çalışmadan elde edilen veriler iki metodun sonuçları arasında istatistiksel öneme sahip güçlü bir korelasyonun varlığına işaret etmektedir. Bu sonuçlar, sınırlı sayıda olmakla birlikte, benzeri konuda yürütülen çeşitli araştırmaların sonuçları ile mukayese edilebilir düzeydedir. Borrmann ve ark (2006), iki farklı aşırıya ait 113 tavşan serumunun MDCK hücrelerindeki antikor titrelerinin Paul Ehrlich Enstitüsünün sonuçlarıyla karşılaştırmak suretiyle yapmış oldukları çalışmada, biraz daha düşük olmakla birlikte iyi korelasyon (A ve B aşırıları için  $r=0.60$  ve  $r=0.72$ )

gösterdiğini ve bu korelasyonun istatistiksel olarak önemli olduğunu ( $p<0.01$ ) belirlemişlerdir. Bir başka araştırmada (Salvarini ve ark, 2013) ise örnek sayısı biraz az olmakla birlikte, biri negatif olmak üzere 7 tavşan serumunda fare ve MDCK serum nötralizasyon testleri ile alınan sonuçlar arasındaki korelasyonun çok daha yüksek ( $r=0.997$ ,  $p<0.05$ ) düzeyde olduğu görülmektedir. *C. perfringens* epsilon toksin yanında, farklı klostridial komponentler üzerinde (*C. septicum* alfa toksin, *C. novyi* tip B alfa toksin gibi) yapılmış çeşitli hücre kültürü çalışmalarında da benzer yönde iyi bir korelasyona işaret eden sonuçlar alınmıştır. Redhead ve ark. (2011) tarafından Vero hücre hatları kullanılarak *C. septicum* içeren 80 aşının havuzlanmış tavşan serumları üzerinde yapılan çalışmada  $r=0.99$ 'dan daha büyük bir korelasyon katsayısının elde edildiği, bu katsayının aynı çalışmada yürütülen ELISA ve TNT testleri arasındaki korelasyondan ( $r=0.95$ ) biraz daha büyük olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçların ışığında, prensip olarak *C. novyi*, *C. perfringens* tip C ve D için de benzer hücre hatlarının geliştirilebileceği ileri sürülmüştür. *C. septicum* içeren aşılar için Vero hücre kültürleri kullanılarak yapılan bir başka araştırmada da *in vivo* ve *in vitro* seronötralizasyon testleri arasında oldukça yüksek bir korelasyon ( $r=0.99$ ,  $p<0.05$ ,  $n=9$ ) elde edilmiştir (Salvarini ve ark, 2010). Benzer şekilde daha yenilerde; *C. septicum* aşılarının kalite kontrol işlemlerinde alternatif 3R metotlarının validasyonu konusunda yapılan uluslararası işbirliği çalışmasında da Vero hücre hatlarında toksisite analizi ile TNT metodu arasındaki korelasyonun ( $r=0.99$ ) mevcut sonuçları desteklediği görülmektedir (Sinitskaya ve ark, 2015). Vero hücreleri üzerinde *C. septicum* yanında, *C. novyi* alfa toksini ile yapılmış çalışmalar da bulunmaktadır. Borrmann ve ark (2006) tarafından 124 bireysel serumda bulunan antitoksin titrelerinin Paul Ehrlich Enstitüsünün sonuçlarıyla karşılaştırılması sonucunda iki metot arasında  $r=0.8-0.9$  arasında değişen bir korelasyon bulunduğu belirtilmiştir. Korelasyon düzeyi değişmekle birlikte, tüm bu veriler farklı klostridial komponentler üzerinde hücre kültürü nötralizasyon testlerinin başarılı bir şekilde kullanılabilirliğini göstermektedir. Bu araştırmadaki metodolojide, TNT ve MDCK hücre kültürü yöntemlerinin dizayn edilen limit bir İÜ düzeyini hedef alması ve tam titrelerin bulunmasına yönelik çok sayıda test yapılması gerekliliğinden zaman zaman kaçınılması nedeniyle, korelasyonun bir miktar daha yüksek bulunmasının olası olduğu belirtilebilir. Ayrıca bu çalışmadan elde edilen veriler; MDCK hücre kültürü yöntemiyle alınan sonuçların doğruluğunun, antikor tabanlı ELISA metotları ile elde edilenlerle mukayese edilebilir nitelikte olduğunu göstermektedir. Arslan ve ark. (2016) tarafından farklı klostridial komponentlerde antikor tabanlı ELISA ve TNT testleri arasındaki sonuçların karşılaştırıldığı bir başka araştırmada *C. perfringens* epsilon toksoid için TNT ve ELISA metotları arasındaki korelasyon katsayısının  $r=0.95$  ( $p<0.01$ ,  $n=20$ ) olarak bulunması,

ELISA ve MDCK hücre hattı analizlerinin TNT'ye göre benzer paralellikte sonuçlar verdiğini ve her iki alternatif yöntemin sonuçlarının kendi aralarında benzer korelasyonda olduğunu ifade etmektedir. Knight ve ark. (1990) *in vivo* MDCK hücrelerinde epsilon toksinin sitopatojenitesinin Vero hücre kültürlerindeki *C. septicum* veya *C. novyi* toksinleri ile elde edilen sitotoksiteden daha zayıf olduğu, bu nedenle hücre kültürü yöntemi kullanılarak mevcut yöntemlerden daha düşük seviyelerde antitoksin tespit edildiği bildirilmiş olmakla birlikte, bizim araştırmamızdaki sonuçlar bu yönde bir veriyi desteklememektedir. Elde edilen veriler, bir kısım serumlarda TNT'ye ait sonuçların, bir kısım serumlarda ise MDCK hücrelerindeki titrelerin önemsiz düzeylerde daha düşük ya da daha yüksek olduğunu göstermektedir. Test sonuçları arasında aynı yönde bir düşüklük ya da yükseklik söz konusu değildir.

Bu sonuçlara paralel olarak, farklı konsantrasyonlarda epsilon antitoksin içeren serumlarda TNT ve MDCK hücre nötralizasyon testlerine ait sonuçların linear regresyonu ile bağımsız değişkene karşı (X=fare TNT) bağımlı kabul edilen değişkenin (Y=MDCK analizi) regresyon katsayısı ( $R^2$ ) 0.906 ( $Y=1.007*X + 0.994$ ) olarak bulunmuştur. Değişen konsantrasyonlarda *C. perfringens* epsilon antitoksin içeren serumların hücre kültüründeki titrasyon sonuçlarının TNT'ye lineeritesi konusunda bir veriye ulaşılamamakla birlikte, *C. septicum* alfa antitoksin üzerinde yapılan farklı çalışmalarda TNT ve Vero hücre kültürü seronötralizasyon testleri arasındaki regresyon katsayısının 0.98-0.99 dolayında seyrettiği ve çok kuvvetli bir lineer ilişkinin gözlemlendiği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Salvarini ve ark, 2010; Redhead ve ark, 2011; Sinitskaya ve ark, 2015). Diğer araştırmalardaki *C.septicum* için alınan sonuçlarla mukayese edildiğinde bir miktar daha düşük olmakla birlikte, bu araştırmanın sonuçları epsilon antitoksin düzeyi değişen (2-20 İÜ/ml) çeşitli serum örneklerinde fare TNT ve MDCK hücre kültürü toksisite analizleri ile alınan sonuçlar arasında kuvvetli bir lineer ilişkinin varlığına işaret etmektedir. Çalışılan lineer aralık epsilon toksoid içeren klostridial aşılardaki antitoksin düzeyleri ile örtüşmektedir. Bu ilişki, çalışılan aralık içindeki sonuçların çok fazla sapma göstermediğini ifade etmesi bakımından önemlidir.

ELISA analizlerinde antijenlere bağımlı ya da bağımsız olarak çeşitli hatalı pozitif ve negatif reaksiyonların gelişebildiği bilinmektedir. Bu non-spesifik reaksiyonlar arasında en yaygın olanı; örnek numunelerdeki immüoglobulin komponentlerinin solid yüzeylere hidrofobik bağlanmasının neden olduğu arka plan (background) gürültü reaksiyonu sonucu gelişen yanlış pozitif reaksiyonlardır. Ayrıca protein-protein etkileşimleri ile immüoglobulinlerin hedef antijenlere spesifik olmayan bağlantılarından kaynaklanan yanlış

pozitif reaksiyonlar ile tampon bileşenlerinin neden olduğu çeşitli yanlış pozitif ve negatif reaksiyonların selektiviteyi değiştirdiği söylenebilir. Bu gerekliliklerle antijen ve antikörlerin ileri düzeyde purifikasyonlarına gereksinim duyulmakta, söz konusu non-spesifik bağlanmaların eliminasyonuna yönelik antijen kaplı kuyucuklarla, kaplı olmayan kuyucukların ya da ayrı ayrı primer ve sekonder antikör bulunan ve bulunmayan kuyucukların karşılaştırılmasına dayanan kontrol prosedürleri uygulanmakta ancak yine de spesifite/sensitiviteyi etkileyen sonuçlar alınabilmektedir (Waritani ve ark, 2017). MDCK hücre kültüründe toksin seronötralizasyon testleri ise *in vivo* fare toksin nötralizasyon testlerinde olduğu gibi; toksinin antitoksin varlığında denatüre olması ve zararlı etki göstermemesi prensibine dayanır. Bu bakımdan, bu metotların önemli avantajlarından biri serolojik tabanlı testlerde olduğu gibi non-spesifik reaksiyonların ortaya çıkması yönünde endişelerin bulunmamasıdır. Bu çalışmada da, negatif serum örneklerinde yalancı pozitif reaksiyonlar alınmaması bunu destekleyen bulgulardır. Benzer şekilde Salvarini ve ark. (2010, 2013) tarafından da; gerek *C. septicum* alfa toksoid, gerekse *C. perfringens* tip D epsilon toksoid üzerinde sırasıyla Vero ve MDCK hücre kültürleri kullanarak yapılan analizlerde negatif serum örneklerinde saptanabilir bir reaksiyon bulunmadığı bildirilmiştir. Bu tip testlerde oluşabilecek en büyük risk, hücre kültürünün kontaminasyonuna bağlı hücrelerin dökülmesi ve sonuçta pleytin boyayı almaması nedeniyle düşük OD vermesi ve sensitivitenin etkilenmesidir. Bu kontaminasyonları önlemek için hücre kültürü büyütme medyumu (EMEM) içerisine penisilin-streptomisin katılmaktadır. Ayrıca çalışılan her pleytte, toksin-antitoksin kontrol, canlı hücre kontrol (sadece EMEM bulunan) ve toksin kontrol kuyucukları oluşturularak spesifiteyi değiştirebilecek olası faktörler kontrol edilmektedir.

Toksine maruz kalan MDCK hücrelerinin mikroskopik gözlemlerinde, hücrelerin iğ biçimini kaybettiği, düzenli birbirine tutunmuş yapılarının kaybolduğu, şiştiği ve yuvarlaklaştığı, çekirdeklerinin koyu ve piknotik bir hal aldığı ve sonuçta hücre lizisine bağlı monolayer yapının bozulduğu ve hücreler arası boşlukların ortaya çıktığı gözlenmiş, daha konsantre toksine maruz kalan hücrelerde bu bulguların çok daha şiddetli olduğu izlenmiştir. Bu gözlemler ETX'in MDCK hücrelerindeki toksisitesini araştıran farklı araştırmacıların bulguları ile örtüşür niteliktedir. Birçok araştırmacı tarafından ETX'e maruz kalan hücrelerin şiştiği, tomucuklanmalar oluştuğu, çekirdeğin yoğunlaştığı, membran hasarının ortaya çıktığı ve hücrelerin lize olduğu bildirilmiştir. Ayrıca hücre membranında oluşan hasara bağlı değişen permeabilite sonucu, elektrolit dengenin bozulduğu bilinmektedir (Petit ve ark, 1997; Soler Jover ve ark, 2004; Stiles ve ark, 2013; Uzal ve ark; 2014a). Bu bakımdan hücrelerin büyümesi, şişmesi veya yuvarlaklaşması yönündeki mikroskopik gözlemler, bu

morfolojik ve yapısal değişikliklere bağlı bulgular olarak görölmektedir. Ayrıca toksin ile muamele edilen hücrelerde hücre çoğalmasının mitozun erken safhasında durduğu, kromozomların nükleusta düzensiz bir şekilde kümelenediği, karyotoksik etkiler olduğu ve sentez aktivitesinin tamamen inhibe olduğunun bilinmesi (Borrmann ve ark, 2001), toksinden etkilenen hücre çekirdeklerinin mikroskopik bakıda koyu ve yoğunlaşmış şekilde görünmesini destekler nitelikte bulgulardır. Doza bağlı toksisite yanıtı farklı araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir. Özellikle zayıf toksin karışımlarının hücre büyümesini inhibe ettiği halde, yüksek bir letal sitopatik etki göstermemesi ve bir kısım hücrelerin canlı kalabildiğinin bildirilmesi önemlidir (Knight ve ark, 1990).

İn-vivo yöntemler validasyona uygun prosedürler değildirler. Bu prosedürler karmaşık fonksiyonel tepkileri ölçme potansiyeline sahip olsa da, kesinlik, tekrar üretilebilirlik, tayin ve ölçüm limitlerinin belirlenmesi açısından uygunluk göstermezler. Oysa in-vitro analizler, kontrol edilebilen laboratuvar koşulları nedeniyle daha düşük değişkenlik ve daha yüksek sensitivite yeteneği sergilerler (EP, 2018c). Ancak alternatif metodolojilerdeki teknik ayrıntıların optimizasyonu; test spesifikasyonlarının karşılanması ve tekrarlanabilir nitelikte sonuçların alınması açısından önemlidir. Bu bakımdan, söz konusu uygulanabilirliği arttırmaya yönelik olarak metotlar, farklı laboratuvar koşulları altında test edilmekte, çeşitli laboratuvarlar arası karşılaştırma testleri ile doğrulanmaktadır. Ne olursa olsun beklenti, in-vitro yöntem ya da test stratejisinin alınan sonuçları tutarlı kılmak için önemli kalite kontrol gerekliliklerini uygun şekilde karşıladığının teminine yönelik duyulan ihtiyaçtır. Bu araştırmada, metodun uygulanmasındaki teknik detayların değerlendirilmesine yönelik sonuçlar; mevcut literatür (USDA-CVB, 2016) bilgisinden biraz farklı olarak, daha yoğun ( $3.0 \times 10^5$ ) hücre kullanılması, 405 nm'de yapılan okumalardan sonuç alınamaması ve standart antitoksinin kullanılmadan hemen önce dilüe edilmesi gerekliliği gibi metot optimizasyonu açısından bazı farklılıklar sergilemiştir. Ancak tüm bu farklılıklara rağmen, alınan sonuçlar farelerde *in vivo* bir test olan TNT'ye karşı, hayvan refahını ön plana çıkararak MDCK hücre kültürlerinde epsilon toksinin gösterdiği sitotoksitenin seronötralizasyonuna dayanan in-vitro alternatif metodolojinin başarı ile uygulanabileceğini göstermektedir. MDCK hücre kültürlerinde toksisite analizi ile antitoksin titrasyonu metodu, TNT'ye göre testlerde kullanılan deney hayvanı sayılarının azaltılması ve hayvan refahının iyileştirilmesi yanında, aynı pleytte birden fazla sayıda serum örneğinin test edilebilmesi, TNT'ye benzer referans standartlarla çalışılabilmesi, daha hızlı sonuç alınabilmesi ve validasyona uygun, tekrarlanabilir *in vitro* metodolojiler olması bakımından önemli avantajlara sahiptir.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

*Clostridium perfringens* tip B ve D epsilon toksoid içeren inaktif aşılar, ruminantlarda önemli ekonomik kayıplara neden olan enterotoksemilerin önlenmesi açısından yaygın bir kullanıma sahiptir. Bu aşılarda potensin gösterimi; immunize edilen deney hayvanı serumlarında toksoide karşı oluşan spesifik antitoksin düzeylerinin, *in vivo* bir prosedüre dayalı olarak, standart toksinleri nötralize etme yeteneğinin değerlendirilmesini esas almaktadır. Bu metotlar bütün dünyada hem üreticiler, hem de yetkili otoriteler tarafından kullanılmaktadır. Ancak bilinen hassasiyet ve güvenilirliğine rağmen, çok sayıda deney hayvanı kullanımına ve sonuçların hayvanlardaki letalite bulguları ile değerlendirilmesine bağlı olarak bu yöntemler biyoetik bulunmamaktadır. Bu nedenle söz konusu *in vivo* metodolojilerin yerine, laboratuvar koşullarında uygulanabilen, spesifitesi ve sensitivitesi yüksek, hızlı ve güvenilir sonuçlar veren validasyona uygun tekrarlanabilir prosedürlerin geliştirilmesi ve uygulamaya aktarılması konusunda giderek yükselen bir hassasiyet ve işbirliği söz konusudur.

Buna yönelik farklı metotlar üzerinde yürütülen çalışmalar yanında, çeşitli toksinlerin hücre kültürleri üzerindeki bilinen sitotoksitesisi, *in vivo* toksin nötralizasyon testlerine alternatif metotların geliştirilmesinde hücre hatlarının kullanım olanaklarının araştırılmasına dayanak teşkil etmiştir. Epsilon toksinin MDCK hücrelerindeki tipik sitotoksitesisi ise, epsilon toksoid aşılara karşı oluşan antitoksin düzeylerinin ölçülmesinde, bu hücre hatlarının kullanımının araştırılmasını öne çıkarmaktadır.

Epsilon toksinin farelerdeki ve MDCK hücre kültürlerindeki toksitesisi dikkate alınarak, serum örneklerindeki epsilon antitoksin düzeylerinin belirlenmesine yönelik yürütülen bu araştırmanın bulguları; iki metodun sonuçları arasında yüksek bir korelasyon ve iyi bir lineer ilişki yanında, seronötralizasyona dayalı prosedürlerde MDCK hatlarının iyi bir spesifite ve sensitivite gösterdiğine işaret etmektedir. Söz konusu alternatif metodun hızlı ve kolay uygulanabilmesi, doğru ve güvenilir sonuçlar vermesi yanında, diğer serolojik tabanlı testlerin aksine metodun uygulanması sırasında ileri düzeyde saflaştırılmış antijen/antikorlara ihtiyaç duyulmaması ve hücre kültürleri dışında TNT'ye benzer standartlarla testlerin yürütülebilmesi bakımından kabul edilebilir avantajlara sahiptir. Ancak sonuçlardaki standardizasyonun sağlanması açısından, metot şartlarında daha ileri optimizasyon yapılması gerekliliği de ortadadır.

## KAYNAKLAR

**Aktürk Z, Acemoğlu H.** Sağlık Çalışanları İçin Araştırma ve Pratik İstatistik, Örnek Problemler ve SPSS Çözümleri, Anadolu Matbaası, İstanbul, 2010, 310.

**Aly SE, Hussein HA, Aly AHM, Abdel-Baky MH, El-Sanousi A.A.** Assessment of *in vitro* potency of inactivated Newcastle disease oil-adjuvanted vaccines using hemagglutination test and blocking ELISA, *Veterinary World*, 2018, 1222-1228.

**Arslan A, Dilik Z, Özeyer M, Oktay N, Yılmaz Ş.** Klostridial Aşıların Potensinin Belirlenmesinde Toksin Nötralizasyon Testlerine Alternatif Olarak ELISA'nın Kullanımı, TAGEM Projesi- HSGYAD/13/A07/P02/32, TAGEM Program Değerlendirme Toplantısı, s36, 15-19 Şubat 2016, Antalya.

**Baş AT, Alp R.** Clostridial aşıların kombine hazırlanması, *Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi* 2005, 36 (1-2), 35-45.

**Bonistalli KN.** Monoclonal antibody production: A comparison of *in vitro* and *in vivo* methods and their use in clostridial vaccine manufacture, MSc, Institute of Veterinary, Animal and Biomedical Sciences, Veterinary Medicine at Massey University, Palmerston North, New Zealand, 2013, 97.

**Borrmann E, Günther H, Köhler H.** Effect of Clostridium perfringens epsilon toxin on MDCK cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 31, 2001, 85-92.

**Borrmann E, Schulze F, Cussler K, Hanel I, Diller R.** Development of a cell culture assay for the quantitative determination of vaccination induced antibodies in rabbit sera against Clostridium perfringens epsilon toxin and Clostridium novyi alpha toxin. *Veterinary Microbiology*, 2006, 114, 41-50.

**Code of Federal Regulation (CFR).** Clostridium perfringens type D toxoid and bacterin-toxoid, Section 113.112, In: Title 9: Animal and Animal Products, U.S. Government Publishing Office, 2012, 720-721.

**Crowthwer JR.** The ELISA Guidebook (2nd Edition), Humana Press, New York, 2009, 566.

**Dempster RP.** The manufacture of veterinary clostridial vaccines, *Microbiology Australia*, 2015, 120-121.

**Ebert E, Oppling V, Werner E, Cussler K.** Development and prevalidation of two different ELISA systems for the potency testing of *Clostridium perfringens*  $\beta$  and  $\epsilon$ -toxoid containing veterinary vaccines, *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 1999, 24, 299-311.

**Erbaş G.** Veteriner aşı ve biyolojik maddelerin kontrollerinde alternatif metotlar, *Firat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi* 2011, 25(3), 141-146.

**European Pharmacopoeia (EP).** *Clostridium perfringens* vaccine for veterinary use (Monograph 0363), Version 9.6, 2018a, 1038-1040.

**European Pharmacopoeia (EP).** Vaccines for veterinary use (Monograph 0062), Version 9.6, 2018b, 5574-5579.

**European Pharmacopoeia (EP).** Substitution of *in vivo* methods by *in vitro* methods for the quality control of vaccines (Monograph 5.2.14), Version 9.6, 2018c, 4737-4738.

**Halder M.** Three Rs potential in the development and quality control of immunobiologicals, *Altex* 2001, 18, Suppl/01, 13-46.

**Hill RE.** Alternative methods to reduce, refine, and replace the use of animals in the development and testing of veterinary biologics in the United States: A strategic priority, *Procedia in Vaccinology* 2011, 5, 141-145.

**Knight PA, Queminet J, Blanchard JH, Tilleray JH.** *In vitro* for the measurement of Clostridial toxins, toxoids and antisera. II. Titration of *Clostridium perfringens* toxins and antitoxins in cell culture. *Biologicals*, 1990, 18, 263-270.

**Kulpa-Eddy J, Srinivas G, Halder M, Hill R, Brown K, Roth J, Draayer H, Galvin J, Claassen I, Gilford G, Woodland R, Doelling V, Jones B, Stokes WS.** Non-Animal Replacement Methods for Veterinary Vaccine Potency Testing: State of the Science and Future Directions, *Procedia in Vaccinology* 2011, 5, 60-83.

**Lang C, Kolaj-Robin O, Cirefice G, Toconet L, Pel E, Jouette S, Buda M, Milne C, Charton E.** Replacement, Reduction, Refinement. Animal welfare progress in European Pharmacopoeia Commission from 2007 to 2017, *Pharmeuropa Bio&SN*, 2018, 12-36

**Lawson PA, Rainey FA.** Proposal to restrict the genus *Clostridium* Prazmowski to *Clostridium butyricum* and related species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2016, 66, 1009–1016.

**Lindsay CD.** Assessment of aspects of the toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin using MDCK cell line. *Human & Experimental Toxicology*, 1996, 15, 904-908.

**Lobato FCF, Lima CGRD, Assis RA, Pires PS, Silva ROS, Salvarini FM, Carmo AO, Contigli C, Kalaphotakis E.** Potency against enterotoxemia of a recombinant *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in ruminants. *Vaccine* 2010, 28 (38), 6125-6127.

**Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D.** Clinical Veterinary Microbiology (2nd Edition), Mosby Elsevier, St.Louis, 2013, 215-237.

**Navarro MA, McClane BA, Uzal FA.** Mechanisms of action and cell death associated with *Clostridium perfringens* toxins. *Toxins* 2018, 10, 212, 1-21.

**Payne DW, Williamson ED, Havard H, Modi N, Brown J.** Evaluation of a new cytotoxicity assay for *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin *FEMS Microbiology Letters* 1994, 116,161-168.

**Petit L, Gibert M, Gillet D, Laurent Winter C, Boquet P, Popoff MR.** *Clostridium perfringens* epsilon toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex. *Journal of Bacteriology*, 1997, 6480-6487.

**Popoff MR.** Clostridial and bacteroides toxins: Structure and mode of action, In: Strict and Facultative Anaerobes: Medical and Environmental Aspects, Nakano MM, Zuber P (eds.), Horizon Bioscience, Norfolk, England, 2004, 171-198.

**Prescott JF.** *Clostridium*. In: Veterinary Microbiology (3rd Edition), McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM (Eds.), Wiley Blackwell, Danvers, 2013, 245-262.

**Redhead K, Wood K, Jackson K.** Testing of veterinary clostridial vaccines: From mouse to microtitre plate, In: Potency testing of veterinary vaccines for animals: The way from *in vivo* to *in vitro*, Jungback C. (Eds.), Vol 134, Karger AG, Basel, Switzerland, 2011, 45-50.

**Romberg J, Lang S, Balks E, Kamphuis E, Duchow K, Loos D, Rau H, Motitschke A, Jungbäck C.** Potency Testing of Veterinary Vaccines: The way from *in vivo* to *in vitro*, *Biologicals* 2012, 40, 100-106.

**Salvarini FM, Lobato ZIP, Assis RA, Silva ROS, Pires PS, Lobato FCF.** *In vitro* evaluation of Clostridium septicum alpha toxoids, *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 2010, 62(4), 778-783.

**Salvarini FM, Lobato ZIP, Pires PS, Silva ROS, Alves GG, Pareira PLL, Lobato FCF.** *In vitro* potency test for evaluation of Clostridium perfringens type D epsilon toxoid. *Arquivos do Instituto Biológico*, 2013, 80 (4), 450-452.

**Sinitskaya N, Redhead K, Daas A, Bruckner I, Behr-Gross E.** Validation of alternative/3Rs methods for the in-process quality control of Clostridium septicum vaccines, BSP130 participants workshop report, Egmond aan Zee, Netherlands, 2015, 107.

**Soler Jover A, Blasi J, Aranda IG, Navarro P, Gibert M, Popoff MR, Martin Satue M.** Effect of epsilon toxin-GFP on MDCK cells and renal tubules *in vivo*. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2004, 52 (7), 931-942.

**Souza Junior MF, Lobato ZIP, Pires PS, Silva ROS, Salvarini FM, Assis RA, Lobato FCF.** Standardization of the titration of the epsilon toxin of Clostridium perfringens type D in cell line as an alternative to animal bioassay, *Ciencia Rural*, 2010, 40 (3), 600-603.

**Stiles BG, Barth G, Barth H, Popoff MR.** Clostridium perfringens epsilon toxin: A malevolent molecule for animals and man. *Toxins* 2013, 5, 2138-2160.

**Stokes WS, Brown K, Kulpa Eddy J, Srinivas G, Halder M, Draayer H, Galvin J, Claassen I, Gifford G, Woodland R, Doelling V, Jones B.** Improving animal welfare and reducing animal use for veterinary vaccine potency testing: state of the science and future directions, *Procedia in Vaccinology* 2011, 5, 84 – 105.

**USDA-CVB:** Potency test for Clostridium perfringens type D epsilon antitoxin using a cell assay testing protocol, BBPRO1008.03, Center for Veterinary Biologics, USDA Animal and Plant Health Inspection Service, Ames, 2016, 1-8

**Uzal FA, Songer JG.** Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2008, 20, 253-265.

**Uzal FA, Vidal JE, McClane B.A, Gurjar AA.** *Clostridium perfringens* toxin involved in mammalian veterinary disease. *The Open Toxicology Journal* 2014a, 2, 24-42.

**Uzal FA, Freedman JC, Shrestha A, Theoret JR, Garcia J, Awad MM, Adams V, Moore RJ, Rood JI, McClane BA.** Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiology*, 2014b, 9(3), 361-377.


**Waritani T, Chang J, McKinney B, Terato K.** An ELISA protocol to improve the accuracy and reliability of serological antibody assays, *MethodsX* 2017, 4, 153–165.

**WEB\_1. (2018).** LPSN bacterio.net:List of procaryotic names with standingin nomenclature. <http://www.bacterio.net/-allnamesac.html> (20.02.2019)

**WEB\_2. (2019).** Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü web sitesi, Piyasaya Arzı Uygun Bulunan Veteriner Biyolojik Ürünler, <https://vetkontrol.tarimorman.gov.tr/bornova> (05.03.2019).

## EKLER

### Ek 1. Etik Kurul Raporu

|   |   |   |
|---|---|---|
|    | <b>T.C.</b><br><b>GIDA TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI</b><br><b>İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü</b>   |  |
| <b>BORNOVA VETERİNER KONTROL ENSTİTÜSÜ</b><br><b>DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU</b><br><b>PROJE DEĞERLENDİRME RAPORU</b>  |   |   |
| Projenin Adı  | Clostridium perfringens Epsilon Toksoid İçeren Aşılarda MDCK Hücre Hatlarında Toksikite Analizi ile Potensin Belirlenmesi   |   |
| Proje Yürütücüsü  | Ahmet ARSLAN  | Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Bölümü  |
| Yardımcı Araştırmacılar   | Yrd.DoçDr.Göksel ERBAŞ  | Doktora Tez Danışmanı   |
| Projenin yürütüleceği yer/Bölüm   | Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü   |   |
| Projenin süresi   | 6 ay  |   |
| Kullanılacak Deney hayvanı türü ve sayısı   | Tavşan<br>Fare  | 200 adet<br>300 adet  |
| Yapılacak İşlemin kısa tanımı   | Testlerde kullanılan deney hayvanı sayılarının azaltılması ve diğer antikör tabanlı ELISA metotlarındaki monoklonal antikör ihtiyacının ortadan kaldırılması hedeflenerek planlanan bu araştırmada; enterotoksemiye karşı profilaktik olarak uygulanan Cl.perfringens epsilon içeren inaktif toksoid aşılarda potens testlerinde kullanılmakta olan TNT'ne alternatif olarak, MDCK hücre hatlarında sitotoksik etkiye dayalı nötralizasyon testinin uygulanması, standart kabul edilen fare TNT sonuçlarına göre karşılaştırmasının ve korelasyonunun yapılması ve enterotoksemi aşılarda potens testlerinde 3R prensiplerine uygun yeni metodolojinin uygulanabilirliğinin ortaya konması amaçlanmaktadır. |   |
| <b>GÖRÜŞLER</b>   |   |   |
| Sunulan proje " Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik (6 Temmuz 2006 tarih ve 26220 sayılı Resmi Gazete) ve Enstitü Etik Kurul Yönergesine UYGUN bulunmuştur. |   |   |
| <b>KARAR</b><br>(UYGUN / DÜZELTİLMESİ GEREKİR / KOŞULLU OLARAK UYGUN / UYGUN DEĞİLDİR)<br><b>UYGUN</b>  |   |   |

29.03.2017

Dr. Nejder CÖVEN  
Veteriner Hekim

Dr. Seza ESKİİZMİRLİLER  
Veteriner Hekim

Dr. Gülçin ERDAL  
Veteriner Hekim

Bülent KAFA  
Uz. Veteriner Hekim

Z.Nejdet ERHAN  
Veteriner Hekim

H.Gökhan ÖZDEMİR  
Sivil Üye

Turgut Mesut YILMAZ  
Sivil Üye

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

## Ek 2. İstatistiksel Hesaplamalar

### → Correlations

**Correlations**

|          |                     | VAR00001 | VAR00002 |
|----------|---------------------|----------|----------|
| VAR00001 | Pearson Correlation | 1        | ,952**   |
|          | Sig. (2-tailed)     |          | ,000     |
|          | N                   | 21       | 21       |
| VAR00002 | Pearson Correlation | ,952**   | 1        |
|          | Sig. (2-tailed)     | ,000     |          |
|          | N                   | 21       | 21       |

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

**Variable Processing Summary**

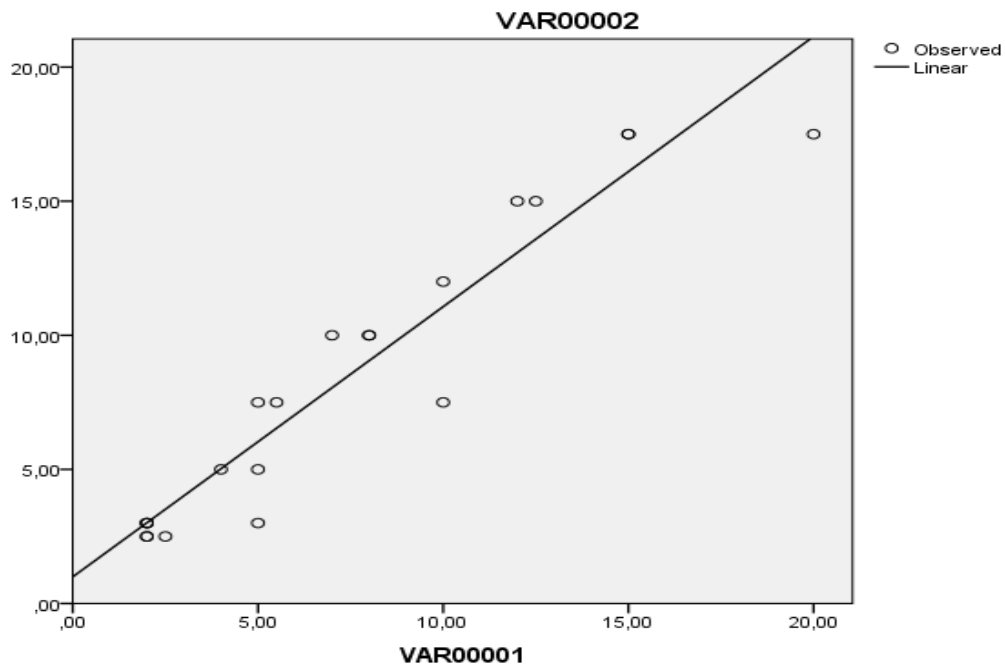
|                             |                | Variables             |                         |
|-----------------------------|----------------|-----------------------|-------------------------|
|                             |                | Dependent<br>VAR00002 | Independent<br>VAR00001 |
| Number of Positive Values   |                | 21                    | 21                      |
| Number of Zeros             |                | 0                     | 0                       |
| Number of Negative Values   |                | 0                     | 0                       |
| Number of Missing<br>Values | User-Missing   | 0                     | 0                       |
|                             | System-Missing | 0                     | 0                       |

**Model Summary and Parameter Estimates**

Dependent Variable: VAR00002

| Equation | R Square | F       | Model Summary |     |      | Sig. | Parameter Estimates |    |
|----------|----------|---------|---------------|-----|------|------|---------------------|----|
|          |          |         | df1           | df2 |      |      | Constant            | b1 |
| Linear   | ,906     | 182,204 | 1             | 19  | ,000 | ,994 | 1,007               |    |

The independent variable is VAR00001.





### Ek 3. MDCK Hücre Hattı Ürün Genel Bilgisi

## MDCK (NBL-2) (ATCC<sup>®</sup> CCL-34<sup>™</sup>)

Organism: **Canis familiaris, dog** / Tissue: **kidney** / Disease: **normal**

| GENERAL INFORMATION       | CHARACTERISTICS  | CULTURE METHOD | HISTORY | DOCUMENTATION |
|---------------------------|--|----------------|---------|---------------|
| <b>Organism</b>           | Canis familiaris, dog  |                |         |               |
| <b>Tissue</b>             | kidney   |                |         |               |
| <b>Product Format</b>     | frozen   |                |         |               |
| <b>Morphology</b>         | epithelial   |                |         |               |
| <b>Culture Properties</b> | adherent   |                |         |               |
| <b>Biosafety Level</b>    | 1<br><br><i>Biosafety classification is based on <u>U.S. Public Health Service Guidelines</u>, it is the responsibility of the customer to ensure that their facilities comply with biosafety regulations for their own country.</i> |                |         |               |
| <b>Disease</b>            | normal   |                |         |               |
| <b>Age</b>                | adult  |                |         |               |
| <b>Gender</b>             | female   |                |         |               |
| <b>Applications</b>       | This cell line is a suitable transfection host and is useful for influenza research.   |                |         |               |
| <b>Storage Conditions</b> | liquid nitrogen vapor phase  |                |         |               |

## ÖZGEÇMİŞ

**Soyadı, Adı** : ARSLAN Ahmet  
**Uyruk** : TC  
**Doğum yeri ve tarihi** : Bursa-Yenişehir/1969  
**Telefon** : 0533 4996723  
**E-mail** : arslan-ahmet@tarimorman.gov.tr  
**Yabancı Dil** : İngilizce, YDS:55

### EĞİTİM

| Derece    | Kurum   | Mezuniyet tarihi |
|-----------|---|------------------|
| Doktora   | ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü<br>(Mikroniyoloji ABD)         | Devam Ediyor     |
| Doktora   | U.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü<br>(Histoloji-Embriyoloji ABD) | 1997             |
| Y. Lisans | U.Ü.Veteriner Fakültesi                                       | 1992             |
| Lisans    | ---   |                  |

### BURSLAR ve ÖDÜLLER:

---

### İŞ DENEYİMİ

| Yıl       | Yer/Kurum                    | Ünvan                                  |
|-----------|------------------------------|--|
| 1992-1997 | U.Ü.Veteriner Fakültesi      | Araştırma Gör.                         |
| 1997-1998 | MAE Ü.Veteriner Fakültesi    | Öğretim Görevlisi                      |
| 1998-2003 | Erzurum Veteriner Kont.Enst. | Veteriner Hekim /<br>Patoloji Lab.Şefi |
| 2003-2012 | Bornova Veteriner Kont.Enst. | Veteriner Hekim                        |
| 2012-     | Bornova Veteriner Kont.Enst. | Vet.Biy.Ürn.Kont.<br>Bölüm Şefi        |

## AKADEMİK YAYINLAR

### 1. MAKALELER

- Balıkçılar M, Özfiliz N, Erdost H, **Arslan A.** Kronik Alkolik Sıçanlarda Maternal Alkol Tüketiminin Plasenta Yapısı ve Gelişimi Üzerine Etkisinin Histolojik Yönden İncelenmesi, *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(3), 2000,95-103.
- Sağlam YS, Temur A, **Arslan A.** Detection of leptospiral antigens in kidney and liver of cattle, *Dtsch.Tierarztl.Wschr*, 110, 2003, 71-77,
- Arslan A**, Sağlam YS, Temur A. Detection of rabies viral antigens in non-autolysed and autolysed tissues by using an immunoperoxidase technique. *Vet Rec.* 30;155(18), 2004, 550-2.
- Sağlam YS, Işık N, **Arslan A**, Erer H. Erzurum bölgesindeki gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* w. 1792) *Aeromonas hydrophila* ve *Yersinia ruckeri* izolasyonu ve patolojik incelemeler. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 1 (2), 2006, 6-10.

### 2. PROJELER

- Arslan A.** Etanolün Sıçan Fötüslerinde Merkezi Sinir Sisteminin Gelişmesi Üzerindeki Etkisinin Histolojik ve Morfometrik Yönden İncelenmesi (Doktora Tezi, TÜBİTAK Projesi – Prj.No: TOVAG-195V019), 1996.
- Özer A, Erdost H, Zık B, **Arslan A.** Tavuklarda Kırmızı Acı Biberli Rasyonla Beslemenin Reprodüktif Sistem Organları Üzerine Etkisinin Histolojik Yönden İncelenmesi, DPT destekli, Proje No: 96/8 (96K 121700), 1996.
- Önalın SK, Işık N, **Arslan A**, Sağlam YS. Tortum (Erzurum) İlçesi ve Köylerinde Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) Yetiştiriciliği Yapılan Çiftliklerdeki Su Kalitesi ile Balık Ölümleri Arasındaki İlişki. TAGEM Projesi, 2004
- Arslan A**, Dilik Z, Özyer M, Oktay N, Yılmaz Ş. Klostridial Aşıların Potensinin Belirlenmesinde Toksin Nötralizasyon Testlerine Alternatif Olarak ELISA'nın Kullanımı, TAGEM Projesi (TAGEM/ HSGYAD / 13 / A07 /P02 / 32), 2016.

- Özyer M, Oktay N, Gedik Y, Subay D, Ertuğrul FC, Akıncı S, Diker SE, Eskiizmirli SN, **Arslan A**, Dilik Z, Dayanıklı C. Koyun ve keçilerin Kazeöz Lenfadenitis (Pseudotuberculosis) enfeksiyonlarına karşı kombine aşı hazırlanması (TAGEM Projesi-TAGEM-18/AR-GE/28, Devam Ediyor)
- Altun S, Ünal N, Yücepete Y, Çalı M, Dinler Ş, Deniz T, **Arslan A**, Kalaycı G, Dilik Z. Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) *Yersinia ruckeri*, *Listonella anguillarum*, *Lactococcus garviae* ve Deniz Levreklerinde (*Dicentrarchus labrax* L, 1758) *Listonella anguillarum*, *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*'ya karşı monovalan banyo emülsiyon ve polivalan enjeksiyon emülsiyon inaktif aşı üretilmesi (TAGEM Projesi-TAGEM-18/AR-GE/29, Devam Ediyor)
- Gedik A, Özyer M, Oktay N, Gedik Özvural Y, Subay GD, Yıldırım E, Akıncı S, Diker KS, **Arslan A**, Eskiizmirli SN, Özden M, Dilik Z, Yılmaz AZ. Sığırların Mastitis Enfeksiyonlarına Karşı Ulusal Suşlar ile Kombine Aşı Üretimi (TÜBİTAK 1007 KAMAG Projesi, 118G016-Devam Ediyor).

### 3. BİLDİRİLER

#### Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

- Mısırlıoğlu A, **Arslan A**. Işığın gelişim süreci içindeki tavukların gonadları üzerine etkisi, 3. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Eskişehir, 1996 (Sözlü Tebliğ)
- Özfiliz N, Erdost H, **Arslan A**. Erişkin Boz Ayılarda Skrotum Derisinin Yapısal Özellikleri. III. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi., 3-7 Eylül 1996, Eskişehir. (Sözlü Tebliğ).
- Sağlam YS, Işık N, **Arslan A**, Erer H. Erzurum Bölgesindeki gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* W.1972) *Aeromonas hydrophila* ve *Yersinia ruckeri* izolasyonu ve patolojik incelemeler, III. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi (Uluslararası katılımı), 6-9 Eylül 2006, Elazığ, 2006. (Sözlü Tebliğ)
- Arslan A**. Etanolün Sıçan Fötüslerinde Merkezi Sinir Sisteminin Gelişmesi Üzerindeki Etkisinin Histolojik ve Morfometrik Yönden İncelenmesi, 4. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Diyarbakır, 1998. (Sözlü Tebliğ)