

ŞAP AŞILI SIĞIRLARDA MİKRONÖTRALİZASYON VE ELİSA İLE ANTİKOR DÜZEYLERİNİN SAPTANMASI (*)

Determination of the Antibody Levels of the Cattle Immunised against FMD by NT and ELISA

Burhan GÜRHAN (**), Erdoğan ŞENEL (**), Gülhan DAKILIR (**)
Hasan ÖZTÜRKMEN (**)

GİRİŞ

Yurdumuzda şap hastalığı ile mücadelede, 1962 yılından bu yana aşılama ve karantina stratejisi uygulanmaktadır. Bu amaçla A+O tipi bivalent inaktif şap aşısından yararlanılmakta ve rutin olarak sığırlara yılda iki kez aşılama yapılmaktadır.

Diğer inaktif viral aşılar gibi şap aşılarının da avantajları yanında bazı dezavantajları mevcuttur. Sevk sırasında soğuk zincirin kırılması, uygulama hataları, hayvanların ferdi özellikleri gibi nedenlerle aşılama sonrası elde edilen immün yanıt, hayvanlara ve bölgelere göre farklılıklar gösterebilir (20).

Aşılama kampanyasının başarısını saptamak için en uygun yöntem, aşılanmış hayvanlardan temin edilecek mümkün olduğu kadar çok sayıda kan serumu numunelerinde antikor seviyesini, gene mümkün olan en güvenilir bir biyolojik sistem ile tesbit etmektir (2). Sığır populasyonlarının yaygın serolojik taraması ve şap hastalığına karşı bağışıklığın belirlenmesi için güvenilir serolojik testlere ihtiyaç vardır. Bu testlerin uygulanması kolay, ucuz ve çok miktarda materyali kısa zamanda işleyebilecek özellikte olmalıdır. Bu amaçla radial immunodiffusion (RID) (6), agar-jel immunodiffusion (AGID) (13), komplement fiksasyon inhibisyon (CFI) (14), komplement fiksasyon (CF) (16) ve mikro nötralizasyon (MN) (18) testleri uzun yıllardan beri uygulanmaktadır. Bunlar arasında MN test, biraz daha pahalı ve zaman alıcı olmasına rağmen geniş çaplı serolojik taramalarda en uygun test olarak bildirilmiştir (2).

(*) Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Araştırma Dairesi Başkanlığı tarafından KKGA-HS-V-10-09 Nolu proje olarak desteklenmiştir.

(**) Uzm. Vet. Hekim. Şap Enstitüsü P.K. 714, 06044 Ankara/Türkiye

Immuno-enzymatik teknikler 1966'da Avrameas ve Uriel'in çalışmaları ile başlamıştır. 1980'lerin başlarında enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) laboratuvarlarda ve araştırma programlarında rutin teşhis tekniği olarak kullanılmaya başlanılmıştır (17). Şap virusuna yönelik çalışmalara da adapte edilen (1) bu tekniğin zaman içerisinde, amaca göre farklı uygulamaya şekilleri ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar liquid-phase blocking sandwich ELISA (LPBS-ELISA)'nın şap virusuna karşı antikorların tesbitinde en uygun ELISA tekniği olduğunu bildirmektedirler (8).

Bu çalışmanın amacı, sahada şap virusuna karşı aşılı hayvanlardan sağlanacak kan serumu numunelerini MN ve ELISA ile test ederek hem aşının sahada sağladığı bağışıklık düzeyini saptama hem de laboratuvarımız şartlarında söz konusu iki testi karşılaştırmaktır.

MATERYAL VE METOT

MATERYAL :

Hücre : Mikronötralizasyon test için BHK 21 C 13 An₃₁ cell-line, laboratuvarımız -196°C stoklarından çıkartılarak kullanılmıştır.

Virus : O₁ Manisa 1969 ve A₂₂ Mahmatlı 1965 şap virusu laboratuvar suşları laboratuvarımız stoklarından çıkartılarak kullanılmıştır.

Serum : Adana, Adıyaman, Ağrı, Ankara, Balıkesir, Bilecik, Bitlis, Bolu, Bursa, Çanakkale, Çorum, Denizli, Diyarbakır, Edirne, Erzincan, Eskişehir, Gaziantep, Giresun, Gümüşhane, İçel, İstanbul, İzmir, Kahramanmaraş, Kars, Kastamonu, Kırklareli, Kocaeli, Konya, Kütahya, Malatya, Mersin, Muş, Ordu, Sakarya, Samsun, Sivas, Tekirdağ, Tokat, Yozgat ve Zonguldak illerinde şap hastalığına karşı aşılanmış olduğu bilinen sığırlardan toplam 4978 adet kan serumu numunesi alınmış ve test edilmiştir.

ELISA : Reagent'ları : ELISA'da kullanılan antiserumlar ve peroksidaz ile konjuge serum IAH Pirbright'dan temin edilmiştir.

METOT :

Mikro Nötralizasyon Test (MN) : Virus sabit, serum dilüe olarak mikropleytlerde yapılmıştır. Sonuçlar serum nötralizasyon % 50 (Sn₅₀) hesabı ile değerlendirilmiştir. 1/22'nin altındaki (nötralizan indeks = 1,3) titreler antikor negatif (bağışık değil) olarak kabul edilmiştir.

ELISA Testi : Liquid phase blocking ELISA tekniği ile yapılmıştır. Burada 1/100'ün altındaki titreler antikor negatif (bağışık değil) olarak kabul edilmiştir (8).

Istatistik Değerlendirme : Toplam 41 ilden temin edilen 4978 adet sığır kan serumu numunesinin tespit edilen antikor titrelerine göre A ve O tipi şap viruslarına karşı aşılı hayvanlar arasında bağışıklığın gerçek prevalansı, % 95 duyarlılık esas alınarak

$$Tr = \frac{App + Sp-1}{Sne + Sp-1}$$

Sp = spesifite
Sen = sensitivite
App = görülen prevalans

formülüne göre tesbit edilmiştir.

Laboratuvarımız şartlarında MN test ve ELISA arasındaki duyarlılığın karşılaştırılması

$$\chi^2 = \frac{(O - E)^2}{E}$$

O = gözlenen pozitiflik
E = beklenen pozitiflik

formülüne göre değerlendirilmiştir (3).

BULGULAR

Tablo 1'de görüldüğü gibi, 41 ilden temin edilen toplam 4978 sığır kan serumu numunesinin MN test ile yapılan antikor taraması sonucu 3874 adedi (% 77,8) A₂₂ tipine, 3702 adedi (% 74,3) O₁ tipine karşı bağışık bulunurken ELISA ile yapılan incelemede 4258 adet kan serumu numunesi (% 85,5) A₂₂ tipine, 3885 adet kan serumu numunesi (% 78,0) ise O₁ tipine karşı bağışık bulunmuştur.

Bu bulgulara göre yapılan istatistik değerlendirme sonucunda 41 ilde uygulanan şap aşılamaları ile sağlanan bağışıklığın gerçek prevalansı A₂₂ tipi için % 81,65, O₁ tipi için ise % 76,15 olarak tesbit edilmiştir.

Değerlendirmeler sırasında minimum bağışıklık sınırının altındaki serum numunelerinin titre değerleri ve sayıları dikkate alınmamıştır. Buna göre MN test ile kabul edilebilir minimum bağışıklık sınırı olan 1/22 serum dilusyonu (NI = 1,34)'nun üzerinde antikor titresini veren sığır kan serum numunelerinin miktarları Tablo 2'de ve şekil 1'de gösterilmiştir. Aynı şekilde ELISA ile kabul edilebilir minimum bağışıklık sınırı olan 1/100 serum dilusyonu (log₁₀ 0,01 = 2,0)'nun üzerinde antikor titresini veren sığır kan serumu

numunelerinin miktarları da Tablo 3 ve Şekil 2'de gösterilmiştir. Tablo ve grafikler incelendiğinde minimum limite bağışık olan hayvan sayısını oldukça az olduğu görülmektedir.

A₂₂ tipi şap virusuna karşı bağışıklık oranı MN test ile % 77,8, ELISA da ise % 85,5; O₁ tipi şap virusuna karşı ise MN test ile % 74,8, ELISA'da % 78,0 olarak tesbit edilmiştir. Buna göre MN ve ELISA arasındaki hassasiyet farkı ($x^2_T = \text{tablo değeri} = 3,841$; $x^2_H = \text{hesap değeri} = 129,466$) $x^2_T < x^2_H$ olduğu için önemli bulunmuş ve ELISA ile pozitif antikor titrelerini tesbit etme şansının daha fazla olduğu belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Türkiye'de şap hastalığı ile mücadelede aşılama esas alınmaktadır. Burada kullanılan aşının sahada seyretmekte olan şap virusu suşlarına karşı yeterli düzeyde koruma sağlaması gerekmektedir. Bu amaçla saha taramaları ile aşılı hayvanlardan temin edilecek kan serumlarının serolojik yöntemler ile incelemesi gerekmektedir. Sahadaki bağışıklık düzeylerinde bir azalma tesbit edilir ise yeni bir suşun varlığından şüphe edilebilir. Bunun yanında aşının sahaya sevki, uygulama hataları gibi pek çok faktör de sahadaki sürü bağışıklığının kırılmasında rol oynayan önemli etkenler arasındadır (20).

Serum nötralizasyon test pek çok araştırmacı tarafından şap virusuna karşı aşılama hayvanlarda koruma düzeyini belirlemek amacı ile kullanılmış ve antikor titresinin uygulanan aşının suşuna ve serisine de bağlı olduğu bildirilmiştir (2,18,20).

Koruma ve serum nötralizasyon antikor titreleri arasındaki ilişki araştırmacılar tarafından tesbit edilmiştir (9,11,15). Bununla beraber nötralizan antikor titresini her zaman aşının etkinliğini belirleyen bir kriter olmayabilir (5,12). Son yıllarda serum nötralizasyon testine paralel olarak ELISA da kullanılmaya başlanılmıştır (8,10) ve enfekte ve aşılı hayvanların antikor düzeylerinin ölçülmesinde nötralizasyon testinden daha kesin ve muhtemelen daha güvenilir olduğu kabul edilmektedir (8). Çünkü ELISA, nötralizan antikorlar yanında şap virusunu in vivo nötralize etmeyen fakat bağışıklıkta rolü olan diğer antikor gruplarını da ölçmektedir (7). Bu çalışma sonunda elde edilen değerler de ELISA'nın pozitif antikor titresini belirlemede nötralizasyon teste oranla daha hassas olduğunu göstermektedir.

Şap hastalığının ulusal kontrol programları çerçevesinde, geniş çaplı serolojik taramaların en az yılda bir kez yapılması gerekmektedir (2). Bu taramalarda kullanılacak serolojik teknik pratik, ucuz ve çok fazla numuneyi

aynı zamanda işleyebilecek özellikte olmalıdır. Bu çalışma sonuçları ve diğer araştırmacıların bulguları (7,8,19). ELISA'nın bugün için en uygun teknik olduğunu kanıtlamaktadır.

Şap hastalığında aşılama ile mücadele ancak sürü bağışıklığının oluşturulması ile mümkündür (12). Bu da hayvanların potent bir aşı ile en az 4-5 kez revaksine edilmesi sonucu sağlanabilir. Bu çalışma sonucunda bağışık hayvanların gerçek prevalansı A₂₂ tipi için % 81,65, O₁ tipi için ise % 76,15 olarak tesbit edilmiştir. Ancak, burada gözden uzak tutulmaması gereken nokta kan serumlarının sadece aşılanmış hayvanlardan alınmış olmasıdır. Yani bu değerler sahanın şap hastalığına karşı bağışıklık düzeyini değil şap aşılarının sahada oluşturduğu bağışıklığı göstermektedir. Burada kaydedilmemiş olan değerlere göre, gene bu çalışma sırasında Tarım İşletmelerinden temin edilen serumların antikor seviyesinin daha yüksek olduğu da gözlenmiştir. MN test ile yapılan ve 1/20 dilusyonun limit kabul edildiği bir çalışmada, Federal Almanya'da bu oran ortalama % 74 olarak tesbit edilmiştir (20). Laboratuvar şartlarında yapılan bir başka çalışmada ise gerçek prevalans % 90'dır (4). Bu araştırmada yaklaşık % 20 oranında koruma tesbit edilememesi yaşa, individüel bağışıklık sistemi özelliğine, aşının uygulama hatalarına bağlı nedenlerden ileri gelebilir.

Şap aşılara karşı nötralizan antikor oluşumu aşılamaı takip eden 7. günde başlar, 21. günde maksimum düzeye ulaşır ve 6 ay kadar bu seviyeyi muhafaza eder. Bu çalışmada gerek MN ve gerekse ELISA ile bağışık olduğu tesbit edilen hayvan sayılarının titrelelere göre farklılık göstermesinin nedeni serum örneklerinin, aşıllı olduğu bilinen ancak aşılama tarihleri bilinmeyen hayvanlardan tesadüfi örnekleme ile alınmış olmasıdır.

Tüm bu sonuçlar, şap hastalığı ile mücadelede başarının sistematik aşılama kampanyalarına bağlı olduğunu bir kez daha vurgulamaktadır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1 - 1989-1990 yıllarında sahada uygulanan şap aşıları yeterli bağışıklığı sağlayacak düzeydedir. Ancak, aşılama kampanyalarının kurallarına uygun bir şekilde gerçekleştirilmesi gerekmektedir.
- 2 - ELISA tekniği saha taramalarında MN teste tercih edilmelidir. Ancak, gerekli reagent'lar yönünden dışa bağımlı olarak uygulanmakta olduğu için enstitümüz için henüz ekonomik bir metot değildir. Konunun önemi gözönüne alınarak bu test için gerekli serum ve konjugeyin enstitü içerisinde hazırlanması yoluna gidilmelidir.

ÖZET

Şap hastalığına karşı sahadaki aşılı sığırlarda oluşan immun yanıtı tesbit etmek için uygulaması kolay, ucuz, aynı zamanda çok fazla materyal ile çalışmaya elverişli serolojik tekniklere ihtiyaç vardır. Bu amaçla geliştirilmiş olan mikronötralizasyon ve liquid phase sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) ile karşılaştırmalı olarak sahada aşılı sığırlardan alınan kan serumlarının antikor düzeyleri ölçüldü. 41 ilde şap hastalığına karşı aşılı sığırlardan alınan toplam 4978 adet sığır kan serumu numunesi test edildi. Veriler istatistik yöntemler ile değerlendirildi. Sonuçta bağışıklığın gerçek prevalansı A₂₂ tipi için % 81,65, O₁ tipi için % 76,15 olarak tesbit edilirken iki metot arasında yapılan karşılaştırmada ELISA'nın antikor pozitif serumları tanımlamada seronötralizasyon teste oranla daha hassas olduğu görüldü.

SUMMARY

Simple, cheap and reproducible serological procedures are required to determine foot and mouth disease (FMD) immune response of the vaccinated cattle in the field. The antibody levels of the blood sera of the vaccinated cattle in the field have been measured by both microneutralisation (MN) and liquid phase sandwich enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) techniques which were developed for that purpose, comperatively. 4978 vaccinated cattle blood sera have been received from 41 provinces in Turkey and tested. As a result, the true prevalence of the immunity among the vaccinated cattle was estimated as 81,65 % against A₂₂ and 76,15 % against O₁ types. In comparison of the two tests he sensitivity of ELISA in measuring the antibodies which positively effect the immunity have been found more than MN test.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın gerçekleştirilmesi için gerekli sığır kan serumlarının teminindeki yardımlarından dolayı Vet. Hek. Serdar KIZIL'A, istatistik değerlendirmeleri yapan Vet. Hek. Özden ÖZKAN'a, Tarım ve Köyşleri Bakanlığı Araştırma Dairesi'ne ve Şap Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkürü bir borç biliriz.

	MN Test				ELISA				Gerçek prevalans (Tp)	
	A ₂₂		O ₁		A ₂₂		O ₁		A ₂₂ (%)	O ₁ (%)
	Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%		
Bağışık olanlar	3874	77,80	3702	74,30	4258	85,50	3885	78,00	81,65	76,15
Bağışık olmayanlar	1104	22,20	1276	25,70	720	14,50	1093	22,00	18,35	23,85
Toplam	4978		4978		4978		4978			

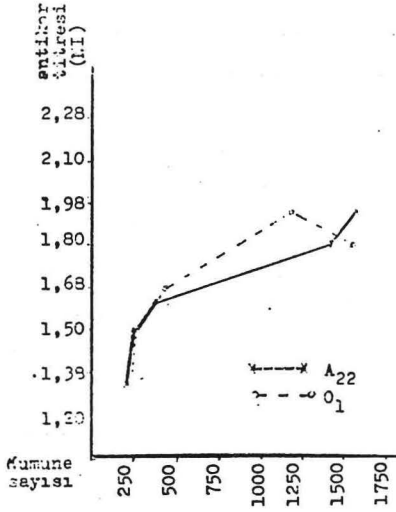
Tablo 1 : MN ve ELISA teknikleri ile A₂₂ ve O₁ tipi şap hastalığına karşı bağışıklık düzeyleri tesbit edilen serum miktarları ve gerçek prevalans değerleri.

Antikor titresi		A ₂₂	O ₁
Serum dil.	log ₁₀		
1/22	1,34	214	238
1/32	1,50	265	269
1/44	1,64	392	442
1/64	1,80	1417	1567
1/88	1,94	1586	1186
TOPLAM		3874	3702

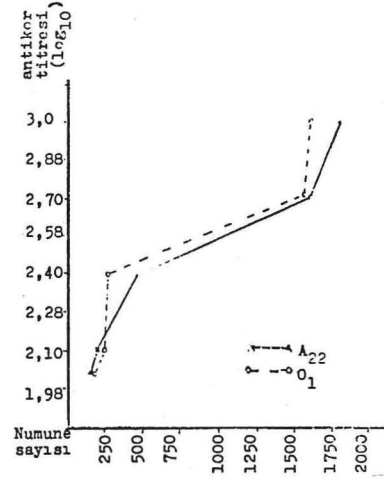
Tablo 2 : MN test'te minimum bağışıklık sınırını aşan serumların anti-kor titreleri

Antikor titresi		A ₂₂	O ₁
Serum dil.	log ₁₀		
1/100	2,0	164	199
1/128	2,10	207	237
1/256	2,41	454	259
1/512	2,71	1620	1573
1/1024	3,01	1813	1617
TOPLAM		4258	3885

Tablo 3 : ELISA'da minimum bağışıklık sınırını aşan serumların anti-kor titreleri



Şekil 1 : MN test'de minimum bağışıklık sınırını aşan serumların numune sayısına göre titrelerini gösteren grafik



Şekli 2 : ELISA'da minimum bağışıklık sınırını aşan serumların numune sayısına göre titrelerini gösteren grafik

LİTERATÜR LİSTESİ

- 1- ABU-ELZEIN, E.M.E. and COUWTHOR, J.R. : The specific detection of FMDV whole antigen by ELISA. J. Hyg. Camb., 83, 127-134. 1979.
- 2- ARIAS, C.A.L., HANSON, R.P. and GERARDINO, A.G. : Antibody response of tropical tests. Int. Symp. FMD, Lyon, 1976. Dev. Stand., 35, 345-356 (S. Karger, Basel 197).
- 3- BAILEY, N.T.J. : Statistical Methods in Biology, Sec. Ed., Edward Arnold and Hodder and Stoughton, London, 1981.
- 4- DUBOURGET, P., DTERAZ, N., GARGON, P. and LOMBARD, M. : Serological and biochemical properties of FMD strains recently isolated in Near and Meadle-East. 1. Int. FMD. Symp., June, 1989. Ogun Kard. Mat., Ankara, 1990.
- 5- DOEL, T.R. : The immune response of cattle to FMD antigens. Pitman-Moore FMD Bulletin, 29, 1, 1-5. 1991.
- 6- FEDIDA, M., DANNACHER, G., COUDERT, M., PEILLON, M. and LUCAM, F. : Evolution et durée de l'immunité antiaphteuse post-vaccinale chez les bovins pluri-vaccinés. Bull. Off. Int. Epizoot. 77, 1005-027. 1972.
- 7- HAMBLIN, C., BARNETT, I.T.R., CROWTER, J.R. : Anew ELISA for detection of antibodies against FMDV. I. Development and method of ELISA. J. Imm. Meth. 93, 115-121. 1986.

- 8 - HAMBLIN, C., KITCHING, R.P., DONALDSON, A.I., CROWTER, J.R. and BARNETT, T.R. : ELISA for the detection of antibodies against FMDV. *Epidem. Inf.*, 99, 733-744. 1987.
- 9- LOMBARD, M. : Utilisation de sérums de bovins vaccinés dans l'évaluation des souches virales aphteuses du terrain. *Sess. Res. Gr. Stand. Tech. Comm. Eur. Comm. Cont. FMD*, Lindholm, Denmark, FAO, Rome, 1979.
- 10- LOMBARD, M. und PETERMAN, H.G. : Korrelation zwischen der ELISA-Test und der Serumneutralisation zur Titrierung MKS-Virus-neutralisierender antikörper im Serum von Kontrollrindern. *Tierärztl. Umschau*, 37. 354-356. 1982
- 11- MACKOWIAK, C., LANG C., FONTAINE, J., CAMAND, R., PETERMAN, H.G. : Relation between neutralising antibody titre and protection in animals immunized against FMD. *Ann. Inst. Pasteur*, 103, 252-257. 1962.
- 12- MCCULLOGH, K.C., ACKERMANN, M., MÜLLER, H.K., BRUCKNER, L. and KIHM, U. : Potency testing of FMD vaccines by challenge and antibody measurement. *I. Int. FMD Symp.*, June, 1989. *Ongun Kard. Mat.*, Ankara. 1989.
- 13- OUCHTERLONY, O. : Diffusion in gels methods for immunological analyses. *Prog. n Allergy*, 5, 1-78. ed. by p. Kallas, Karger-Basel, 1958
- 14- PANINA, G. and DeSIMONE, F. : Risposta anticorpale dei bovini a diverse dosi di vaccino antiapftoso. Confronto tra siero-neutralizzazione ed inibizione della fissazione del complemento. *Atti Della Societa Italiana Della Scienze Veterinarie*, 25, 518-520. 1971.
- 15- PAY, T.W.F. and HNIGLEY, P.J. : Corralation of 140S antigen dose with serumneutralizing antibody response and the level of protection induced in cattle by FMD vaccines. *Vaccine*, 5, 60-64. 1987.
- 16- RIVENSO, S. and CONSTANTINI, H.L. : Aplicacion de la técnica de Marucci en la fiebre aftosa. *Rev. Invest. Canad.*, 11, 7-16. 1961.
- 17- VIZCAINO, S.J.M. and ALVAREZ, C.M. : Enzyme immunoassay techniques, ELISA, in animal and Plant Disease. *Off. Int. Ep. Tehnical Series*, No. 7, 1987. Paris.
- 18- WAGNER, G.G. and McVICAR, J.W. : FMD antibodies. Comparison of a tissue culture micro-neutralisation test with the assay in suckling mice. *Appl Microb.* 20, 995-997. 1970.
- 19- WESTBURY, H.A., DOUGHTY, W.J., FORMAN, A.J., TANGCHAITRONG, S. ad KONGTHON, A. : A coparison of ELISA, CF and virus isolation for FMD diagnosis. *Vet. Mic.*, 17, 21-28. 1988.
- 20- WITTMAN, G. : Control of FMD vaccine and a field trial in Federal Rep. of Germany. *I. Int. FMD Symp.*, June, 1989. *Ongun Kard. Mat.*, Ankara.

ŞAP AŞILARININ KOBAYLARDA VE DOKU KÜLTÜRÜNDE ZARARSIZLIK KONTROLÜ

Gülhan AYNAGÖZ (*) Burhan GÜRHAN (*)

GİRİŞ

Şap hastalığı ile mücadele, tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi yurdu-muzda da önemli bir konudur. Ekonomik ve kültürel ilişkilere olan olumsuz etkisi nedeni ile hastalığın hiç görülmediği ülkelerde dahi önemini uzun yıllardan beri muhafaza etmiştir. Aşılama programının başarılı olabilmesi için, sahaya sevk edilmeden önce aşının zararsızlık ve bağışıklık kontrolleri yapılmalıdır.

Günümüzde şap aşıları, dil epiteli (Frenkel metodu) veya monolayer ve süspanse BHK hücre kültürlerinde üretilen virüsü içerir. Bu viruslar alu-minyum hidroksit jeline adsorbsiyondan önce veya sonra değişik kimyasal işlemlerle inaktive edilir.

Ankara Şap Enstitüsü'nde; ısı ve BEI (Binary Etilen İmin) ile inaktive, alüminyum hidroksit jeline adsorbe, saponin ilaveli şap aşıları hazırlan-maktadır. Değişik aşı hazırlama metodları, üretilen virus miktarı, viral antije-nin kalitesi yönünden farklılık göstermektedir. Bu nedenle üretim protokolü sadece virus üretiminde değil, aynı zamanda aşı virusunun seçimi, kloro-formla muamelesi, değişik konsantrasyon basamaklarının kullanımı, inaktiva ve adjuvant gibi konularda da belli limitler içerisinde standardize edilmiştir.

Aşı sahaya sevk edilmeden önce, aşının zararsızlığının ve bağışıklık gücünün tespit edilmesi zorunludur. Bu nedenle hazırlanan her aşı bunlar için belirtilen testlerden geçirildikten sonra uygulamaya hazır hale gelir. Şap hastalığının kontrol altına alınması aşının kaliteli ve güvenli bir kontrolünü gerekli kılmaktadır. Bu hayvan sahipleri için olduğu kadar ülkelerarası ilişkiler bakımından da önemli bir konudur. Bu kontrol testleri, önceleri her laboratuvarın araştırmacıları tarafından standardize edilmiş farklı protokoller şeklindeydi. Daha sonraki yıllarda milletlerarası ilişkilerin artmasıyla tek bir standardizasyona ihtiyaç duyulmuştur. Avrupa Farmakopisi burada büyük bir role sahiptir (1).

(*) Uzm. Vet. Hekim. Şap Enstitüsü, PK. 74 06044 Ankara/Türkiye

Yıllarca şap aşılarında canlı virusun varolmadığının kontrolü, diğer bir deyimle zararsızlık kontrolü için danalar kullanılmıştır. Bu amaçla sağlıklı, antikör negatif 3 adet sığıra, 20 noktaya intradermolingual 0.1 ml aşı inokule edilir. 4 günden az olmamak şartıyla kontrol edilen bu hayvanlarda herhangi bir şap lezyonu görülmemesi aşının zararsız olduğu şeklinde kabul edilmiştir (13).

Son yıllarda zararsızlık kontrolleri doku kültüründe de test edilmeye başlanmıştır (2,4). Amaç, aluminyum hidroksit jeline adsorbe virusu elüe ederek; duyarlı doku kültürlerine inokulasyondan sonra içerisinde aktif virus partikülü bulunup bulunmadığının tespit edilmesidir.

Ankara Şap Enstitüsü'nde yapılan bir araştırmada (17) değişik bufferlar kullanılarak aluminyum hidroksit jeline adsorbe ettirilen aktif virus partiküllerinin elusyyonu denenmiştir (1 ml aluminyum hidroksit jeli + 5 ml virus). Sonuçta NaPO_4 % 97, KPO_4 % 96 ve 0.33 M fosfat buffer % 99 virusun elusyyonu sağlamıştır. Fernandez ve ark. (9) ise Matheka bufferi elusyonda kullanmıştır. Elusyon testini Barteling (3) aziridin inaktive şap aşıları ile, Strobbe ve ark. (16) ise formol inaktive aşıları kullanarak çalışmışlardır. Elusyon testinde kullanılan aşılar saponin ihtiva etmemelidir (6,17). Saponin hücre için toksik bir etkiye sahiptir. Saponin ihtiva eden aşı elüetleri doku kültürüne inokule edildiğinde, hücrelerde dökülmeler meydana gelir. Bu da CPE tablosu ile karışabilir. Az miktarda kalan enfektif virus partiküllerini inaktive olmuş büyük partiküller maskeleyebilir ve ortaya çıkarılmasını güçleştirir. Bunun için konsantrasyon mutlaka gereklidir. Araştırmacılar konsantrasyonda sature amonyum sülfat (6), polyethylenglycole (PEG) (16,17) gibi kimyasal maddeler ya da ultrafiltrasyon (11) yöntemlerini kullanmışlardır. Eluet BHK, IB-RS-2 (6,17) gibi duyarlı hücre kültürlerine ya da yavru farelere (6) inokule edilir. Hazırlanan formol ile inaktive aşılar genelde inaktivasyon periyodunun bitiminden aylarca sonra inaktivasyonun devam etmesine imkan sağlayacak şekilde oda sıcaklığında bekletilirken kontrol edilir. Doğru ve güvenilir sonuç elde edebilmek için şap aşılarının zararsızlık kontrolü inaktivasyondan sonraki 30 günü içeren bir zamanda yapılmalıdır (6,16). Bu süre 60 güne çıkarsa elüsyonda enfektif virus partikülü bulma olasılığı azalır. Bu kural dana testleri için de geçerlidir (16). Doku kültüründe yapılan testler sonucunda zararlı olduğu yani enfektif virus partikülü içerdiği tespit edilen aşılardan tekrar ve danalarda yapılacak zararsızlık kontrolü sonuçlarına güvenilmemelidir. Lombard ve ark. (11) zararsızlık kontrolünde, doku kültürü testlerinin, dana testlerinden 64 defa daha hassas olduğunu tespit etmiştir.

Şap aşılarının zararsızlık kontrollerinde dana testi en iyi ve güvenilir bir test olmasına rağmen bu testlerin pahalı oluşu, hayvanların bazen antikör taşımaları ve antikorsuz kontrol danalarının teminindeki güçlükler diğer

laboratuvar hayvanlarının kullanılmasına neden olmuştur (kobay, yavru fare, tavşan gibi). Laboratuvarda kobay ve yavru fareler eksperimental çalışmalar için en çok kullanılan deneme hayvanlarıdır. 350 gr ağırlığındaki kobayların ayak tabanlarına skarifikasyon veya intradermoplanter inokulasyonu takiben 24 saat veya daha uzun süre, inokulasyon yerlerinde ilk veziküllerin meydana geldiği ve kanda da virusun varlığı tespit edilmiştir (10). Bu süreyi takiben 18-36 saat içinde de ikinci veziküller ağızda görülür, ancak bu lezyonların oluşmasını takiben kanda virusa rastlanmaz. 7-10 günlük yavru fareler de deneysel çalışmalar için uygun olmaktadır. Farelere materyalin intraperitoneal verilmesini takiben spastik paralizler oluşur ve bazı fareler ölebilir (15). Zararsızlık kontrolünde yavru farelere 0.1 ml aşı intraperitoneal olarak inokule edilir (14) ve 24 saat sonraki ölümler kontrol edilir.

Ayrıca hastalık sahada çok iyi kontrol altına alındığında bu testi geçen aşılarla aşılana yüzbinlerce hayvanın birkaç tanesinde klinik şap hastalığı vakalarının meydana geldiği tespit edilmiştir (18). Bu tür residual enfektivitenin ciddi problemler meydana getirmemesi için testler sıklaştırılmış ve bu testlere ilave olarak final ürünün her serisi için inaktivasyon kontrollerinin yapılması gerekliliği bildirilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Materyal :

1. Aşı : BHK monolayer ve süspanse kültür metodları ile üretilen O₁ ve A₂₂ tipi şap virusu ile hazırlanan, alüminyum hidroksit jeline adsorbe BEI ve ısı ile inaktive edilen saponinsiz aşılar kullanıldı (12).
2. Deneme Hayvanı : Bu çalışmada 30-600 gr ağırlığındaki albino kobaylar kullanıldı.
3. Hücre : Şap viruslarına duyarlı BHK-21 ve IB-RS-2 monolayer hücre kültürleri kullanıldı.
4. Virus : BHK-21 ve IB-RS-2 monolayer hücre kültürlerine adapte O₁ ve A₂₂ Mahmatlı şap virusları kullanıldı.
5. Vasatlar:
 1. Eagle's MEM : Hücre kültürlerinde hücre üretme vasatı olarak % 10 serumlu Eagle's MEM kullanıldı.
 2. Virus Vasatı (VM3) : Elüetin doku kültürlerine inokulasyonda virus üretme vasatı olarak serumuz virus medium No 3, FAO Technical Report 2'ye göre hazırlanarak kullanıldı.

6. PEG Solüsyonu : Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer solüsyonuna pH 7.6 % 50 oranında PEG (polyethyleneglycol) 6000 R karıştırılarak hazırlanır. 121°C otoklavda 15 dakika steril edildi.

Metot :

Elusyon Testi :

Aşı virusunun adsorbsiyon sonrası yapılan inaktivasyonunda infektif virus partikülü bulunup bulunmadığının araştırılması amacı ile Avrupa Farmakopisi'nde (1) bildirildiği şekilde uygulandı.

Kobay Testi :

Kobaylarda zararsızlık kontrolü için aşı kobay tabanlarına 0.1 ml intradermoplanter olarak inokule edildi. 2. günden itibaren 5. güne kadar hergün kobay tabanları vesikül oluşumu yönünden incelendi (5,14). Her aşı numunesi için 20 adet kobay kullanıldı. Kobaylar 5 adet bir grup olacak şekilde dört gruba ayrıldı.

I. gruba 0.1 ml saf aşı intradermoplanter olarak inokule edildi.

II. grup aynı aşının elusyon metodu ile elde edilen eluetleri 0.1 ml intradermoplanter olarak inokule edildi.

III. gruba aynı aşının elusyon metodu ile elde edilen eluetlerine 10.000 enfektan virus partikülü ilave edilen, virus + eluet süspansiyonu intradermoplanter olarak inokule edildi.

IV. grup hiçbir inokulasyon yapılmamış kontrol grubu kobaylarını içerir.

Bu gruplara ilave olarak virus kontrol amacı ile 5'er adet kobay içeren 2 grup daha ilave edildi. Bu 2 gruba da A₂₂ ve O₁ şap virusları pür olarak 0.1 ml intradermoplanter olarak inokule edildi.

BULGULAR

Bu çalışmada 5 seri A₂₂ ve 5 seri O₁ tipi şap aşısı kullanılmıştır. Aşılar, yöntemine uygun olarak elusyon metodunda tanımlandığı gibi elue edilmiştir. Eluet 0.45 m por çapındaki Sartorius minisart filtrelerinden filtre edilmiştir. Sterilite kontrolünden sonra BHK-21 monolayer hücre kültürlerine adsorbsiyona bağlı yöntemle inokule edilmiştir. 3 gün süre ile hergün CPE durumları incelenmiştir. Her pasaj sonunda; CPE ile tip identifikasyonu ve antijenite kontrolleri yapılmıştır. Sonuçları bir tablo şeklinde gösterilmiştir (Tablo 1-2).

Doku kültürlerinde yapılan zararsızlık kontrolünde O₁ Seri II, Seri V ve A₂₂ Seri V aşılarında inaktivasyonun yeterli olmamasından dolayı virus tespit edilmiştir. CFT ile kontrol testleri CPE'yi doğrulamıştır. Tablo 1-2'de sonuçlar gösterilmiştir.

Kobay sonuç tabloları (Tablo 3-4) incelendiğinde eluet + virus (eluet 10.000 enfektan doz virus partikülü ilave edildi) inokule edilen kobay tabanlarında şap vesikülleri bazı gruplarda görülmüş; bazılarında ise görülmemiştir. Tablo 5 incelendiğinde saf virus inokule edilen kobay tabanlarındaki vesiküller, eluet + virus inokule edilenlere göre daha fazla oluşmuştur. Ancak bütün bunlara rağmen saf virus verilen bazı kobay tabanlarında lezyonların oluşmadığı da saptanmıştır. Bu da kobay testinde yapılacak zararsızlık kontrollerinin çok fazla hassas olmadığını göstermiştir.

TARTIŞMA

Şap hastalığı çift tırnaklı hayvanların, domuzların mortalitesi düşük, ağız ve mükoz membranlarda, dilde, tırnak arasında, korona bölgesinde, memelerde vesiküller ile karakterize, akut seyirli, ateşli, çok bulaşıcı bir viral hastalıktır. Hastalık ile mücadelede en etkin yol aşılama programıdır. Bunun için de aşılar zararsızlık ve bağışıklık kontrolleri en iyi şekilde yapıldıktan sonra uygulamaya sevk edilmelidir. Ankara Şap Enstitüsü'nde şap virusları ısı ve BEI ile inaktive, alüminyum hidroksit jeline adsorbe edildikten sonra saponin ilave edilerek şap aşıları hazırlanmaktadır. Aşı, yöntemine uygun hazırlandıktan ve gerekli tüm testler yapıldıktan sonra sahaya gönderilir. Bu tür güvenli aşılardan kullanılasından sonra bile yüzbinlerce hayvanın birkaç tanesinde klinik şap hastalığı meydana gelebilir (18). Zararsızlık kontrolleri gereği gibi yapılmamış aşılardan saha uygulamasına sevk edilmesi ile hastalığın önlenemeyeceği gibi enfektif virus partikülü içeren aşılardan hastalanması ve büyük salgınların meydana gelmesi de mümkündür. Polio hastalığındaki current olayı (12) ve 1984-1985 yılları arasındaki İtalya'daki aşılamalardan sonra tespit edilen şap vakalarındaki artış buna en iyi örnektir (8). Bu tür aşı uygulaması ile portörük oranında da bir artış görülecektir. Bunların önüne geçmek için aşılardan kullanıma sunulmadan önce inaktivasyon durumları incelenmelidir. Bu maksatla inaktivasyon süresince her saatte bir inaktive edilen virus kültüründen örnekler alınıp, doku kültürlerinde test edilir. Normal inaktivasyon periyodunda saatte bir alınan bu örnekler arasındaki logaritmik değer düşmeleri birbirine yakın olmalıdır ki, çizilecek inaktivasyon eğrisi düz bir çizgi oluştursun.

Saponin içeren aşılardan elusyonundan sonra doku kültürüne yapılan inokulasyonlarından 24-48 saat sonraki mikroskopik kontrollerinde hücre-

lerde dökülmeler ve ölümler tespit edilmiştir. Bu da elusyonda kullanılacak aşılardan saponin içermemesi gerektiğini doğrulamaktadır (7,17).

Bu çalışmada Lombrad ve ark.nın (11) da bildirdiği gibi, doku kültürü testlerinin kobay testlerinden daha hassas olduğu tespit edilmiştir. Aşılardan zararsızlık kontrolünde deney hayvanı aktif virusa çok duyarlı olmalıdır. Kobay, şap virusuna karşı regüler olarak duyarlı değildir. Normal şartlarda kobaya yapılan virus inokulasyonlarında bile virus kobay tabanında çoğalıp vesikül oluşturmayabilir. Kontrol olarak: virus + eluet inokule edilen kobay tabanlarında şap vesikülleri tespit edilmiştir. Fakat, direkt virus verilen kobay tabanlarında eluet + virusa göre daha belirgin şap vesiküllerinin oluştuğu saptanmıştır. Çalışmalar göstermiştir ki, kobaylarda vesikül oluşturmayan enfektif güce sahip virus miktarları danalarda lezyon oluşturabilmektedir. Bu nedenle kobaylarda yapılan zararsızlık kontrollerinde yanılma payı mevcuttur (5). Bütün bu bulguların sonucunda denebilir ki, şap aşılardan zararsızlık kontrol testlerinde deneme hayvanı olarak kobay kullanımı ile sağlıklı sonuçlar elde edilemeyebilir.

Şap aşılardan zararsızlık kontrolünde doku kültürünün daha hassas olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni de, doku kültüründe kullanılan eluetin konsantre edilerek kullanılmasıdır. Çok az miktarda bile bulunan enfektif virus partiküllerini doku kültüründe tespit edebilme olasılığı daha fazladır. Ancak sığır testlerinde 10.000 enfektan dozdan daha az olan virus partikülleri hastalık meydana getirmeyebilir. Bu durumda aşı zararsızdır denilemez, fakat doku kültürü testlerinde büyük bir güvenlikle sonucu bildirilebilir. Ayrıca doku kültürü; antikorsuz dana bulmanın zorluğu ve ekonomik şartlar dikkate alındığında dana testlerine tercih edilmelidir. Süre bakımından da dana testlerine nazaran daha kısa zamanda sonuç elde edilebilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

- Şap aşılardan zararsızlık kontrolünde kobay testleri ve doku kültürü testlerinin mukayeseli çalışmasında doku kültürü daha hassas bulunmuştur.
- Antikorsuz dana teminindeki güçlükler ve ekonomik şartlar dikkate alındığında doku kültürü testleri dana testinin yerine tercih edilmelidir.
- Aşının inaktivasyonundan kesin olarak emin olunabilmesi için her serinin mutlaka inaktivasyon durumu kontrol edilmelidir.
- Kobay testi zararsızlık kontrolünde güvenilir bir test değildir.
- En önemlisi doku kültüründe zararsız olduğu tespit edilen aşılardan sığırda tekrar test edilmemelidir.

ÖZET

Şap aşılarının hazırlanmasından sonra, zararsızlık ve bağışıklık kontrolleri yapılarak, aşının kalite ve güvenilirliğinden emin olunur. Bu testler antikorsuz duyarlı danalar, yavru fareler, kobaylar gibi *invivo* veya doku kültürü gibi *invitro* sistemlerde yapılabilir. Pratik, ekonomik ve güvenilir sistem tercih edilmelidir. Bu çalışmada kobay ve doku kültürü testleri duyarlılık ve uygulamadaki kolaylıklar yönünden karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Bu amaçla 210 kobay ve BHK-21 monolayer hücre kültürü kullanılarak BEI ile inaktive alüminyum jeline adsorbe 10 seri A₂₂ ve O₁ tipi şap aşılarının zararsızlık kontrolü karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Enfektif virus partiküllerinin varlığı kobay tabanında vesikül oluşumu, doku kültüründe CPE ile belirlenmiş, Complement Fiksasyon Test (CFT) ile doğrulanmıştır.

Sonuçta kobay testleri pratik ve ekonomik olmasına rağmen, doku kültürü testleri inaktiv şap aşılarının zararsızlık kontrolünde daha güvenilir bir testtir.

SUMMARY

THE SAFETY CONTROL OF FMD VACCINE IN GUINEA PIGS AND TISSUE CULTURE

After food and mouth disease vaccine preparation safety and protection controls have to be done to be sure about its quality and reliability.

This tests can be done either *in vivo* such as antibody free susceptible calves, suckling mice, guinea pigs or *in vitro* such as tissue cultures. For that purpose the most practical economical and reliable systems must be preferred. Guinea pigs and tissue culture systems are both more practical and economical than cattle tests.

In this work those last two test systems have been studied comparatively to find out the most sensitive and practical one. For that purpose 10 series of BEI inactivated alhydrogel A₂₂ and O₁ type FMD vaccines have been tested for their innocuity by using 210 guinea pigs and BHK-21 monolayer tissue culture. The presence of trace infective virus particules have been detected by the vesicles on the guinea pig pads and CPE in tissue cultures and have been confirmed by complement fixation test (CFT).

At the end it was concluded that although the guinea pig tests are more practical and economical. The tissue culture tests are the most reliable for safety controls of inactivated FMD vaccines.

Şap aşısı zararsızlık kontrolü - Aynagöz - Gürhan

Aşı Tipi Seri No.	Elusyon öncesi ilk santrifüj		Doku kültürü I. pasaj		Doku kültürü II. pasaj		Doku kültürü III. pasaj		SONUÇ
	T.I.	A.T.	T.I.	A.T.	T.I.	A.T.	T.I.	A.T.	
O1 Seri I	-	-	-	-	-	-	-	-	zararsız
O1 Seri II	0	-	-	-	0	A.C	0	3x4321	zararlı
O1 Seri III	-	-	-	-	-	-	-	-	zararsız
O1 Seri IV	-	-	-	-	-	-	-	-	zararsız
O1 Seri V	-	-	0	A.C	0	A.C	0	5x43	zararlı

Tablo 1 : O₁ tipi aşılarda elusyon öncesi ve sonrası doku kültürlerindeki kontrol sonuçları

Aşı Tipi Seri No.	Elusyon öncesi ilk santrifüj		Doku kültürü I. pasaj		Doku kültürü II. pasaj		Doku kültürü III. pasaj		SONUÇ
	T.I.	A.T.	T.I.	A.T.	T.I.	A.T.	T.I.	A.T.	
A22 Seri I	-	-	-	-	-	-	-	-	zararsız
A22 Seri II	-	-	-	-	-	-	-	-	zararsız
A22 Seri III	-	-	-	-	-	-	-	-	zararsız
A22 Seri IV	-	-	-	-	-	-	-	-	zararsız
A22 Seri V	-	-	A±	A.C	A	3.21	A	2x432	zararlı

Tablo 1 : A22 tipi aşılarda elusyon öncesi ve sonrası doku kültürlerindeki kontrol sonuçları

T.I. : Tip İdentifikasyonu (CFT)

A.T. : Antijenite titresini

A.C. : Antikomplementer

- : Negatif

± : Şüpheli

Kobay	AŞI					ELUET					ELUET+VIRUS					Kontrol
	SERI I	SERI II	SERI III	SERI IV	SERI V	SERI I	SERI II	SERI III	SERI IV	SERI V	SERI I	SERI II	SERI III	SERI IV	SERI V	
1. grub	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
2. grub	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
3. grub	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
4. grub	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	-	+	-
5. grub	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-

Tablo I : 5 seri O1 tipi şap aşısının sonuçları Aşı, Eluet, Eluet+Virus için 5 adet kobaya inokulasyonlar yapıldı. Denemeler sırasında kontrol grubu da kullanıldı.

Kobay	AŞI					ELUET					ELUET+VIRUS					Kontrol
	SERI I	SERI II	SERI III	SERI IV	SERI V	SERI I	SERI II	SERI III	SERI IV	SERI V	SERI I	SERI II	SERI III	SERI IV	SERI V	
1. grub	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	±	±	±	+	-
2. grub	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
3. grub	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	±	+	-	-
4. grub	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
5. grub	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	+	+	±	-

Tablo II : 5 seri A22 tipi şap aşısının sonuçları Aşı, Eluet, Eluet+Virus için 5 adet kobaya inokulasyonlar yapıldı. Denemeler sırasında kontrol grubu da kullanıldı.

Kobay	Virus+Eluet	Pur virus	Kontrol
1	+++	++++	-
2	+±--	++++	-
3	++±-	++++	-
4	++--	++++	-
5	+±--	++++	-

Tablo 5 : Kobay tabanlarında şap virusunun yapmış olduğu lezyonların değerlendirilmesi.

- : Negatif
+ : Pozitif
± : Şüpheli

LİTERATÜR LİSTESİ

- 1- Avrupa Farmakopisi
 - a- VIII-7. Test for inactivation of foot and mouth disease virus
 - b- 63-1.2- Vaccinum Aphtharum Epizooticarum Inactivatum pro Ruminantibus (Foot and Mouth Disease (Ruminants) inactivated vaccine).
- 2- BARTELLING, S.J. and WORTMEYER, R. : Rpt. of Meet. of Stand. Tech. Comm to European Comm. Cont. FMD held at Pirbright U.K. 1982.
- 3- BARTELLING, S.J. : Safety control of FMD vaccines: II. Aziridine Inactivated antigen produced in BHK cells. Rep. Meet. Res. Gr. Stand. Tech. Comm. Pirbright. U.K. 1982.
- 4- BARTELLING, S.J., WORTMEYER, R. and VISSER, N. : Innocuity testing of FMD vaccines I. formaldehyde inactivated alhydrogel vaccine. Journal of Biological standardization 11 279-300. 1983.
- 5- BAYRAMOĞLU, O.S., ÜNLÜLEBLEBİCİ, N. : Şap aşlarının zararsızlık ve bağışıklık kontrollerini kobay testleri ile yapılması üzerinde çalışmalar. Şap Enstitüsü (1967-1969). 247-289. Ogun Kard. Mat. Ankara. 1969.
- 6- DeSIMONE, F., BUGNETTI, M., PANINA, G.F., BAREI, S. and MELLANO, D. : Quantification and safety of foot and mouth disease vaccines antigen eluted from vaccine. Rep. Meet. Res. Gr. Stand. Tech. Comm. Tubingen. 1981.
- 7- DOEL, T.R., STAPLE, R.F. : Elution of FMD virus from aluminium hydroxide vaccine. J. Biol. Stand. 10: 1985-195. 1982.
- 8- European Commission for the Control of foot and mouth disease : Foot and Agriculture Organization of the United Nations. 1989.

- 9 - FERNANDEZ, A., SANDAHL, M.S., ABARACON, D. and FERREIRA, M.E. : Innocuity control of aluminium hydroxide saponin FMD vaccines by elution and concentration of the antigen. Bol. Centro Panamericano Fiebre Aftosa No. 33-34, 47, 59. 1979.
- 10- HYDE, U.L. and GRAVES, J.H. : The comparative titration of foot and mouth disease virus inoculated into the tongue and foot pads of guinea pigs. Am. J. Vet. Res., 24: 642-643. 1963.
- 11- LOMBARD. M., MOUGEOT, H. and FAVRE, H. : Safety tests of foot and mouth disease vaccines concentration of samples of inactivated antigen. Rep. Meet. Res. Gr. Stand. Tech. Comm. Tubingen. 1981.
- 12- MOVAT, G.N. : Şap aşularının hazırlanmasında virus inaktivasyonu-geçmiş, şimdiki durumu ve geleceği. I. Uluslararası Şap Sempozyumu. Haz. 1989. Ogun Kard. Mat. Ankara. 1990.
- 13- OIE MANUEL VOLUME II : Foot nad Mouth Disese. 1988.
- 14- SÜTÇÜ, M., OKAY, G., ŞENTÜRK, M. : Şap hastalığı virus tiplerinin doku kültüründe üretilmesi ve kültür virus tiplerinin antijenik immunolojik özellikleri üzerinde araştırma. Şap Enstitüsü (1967,1969).110-142. Ogun Kard. Mat. Ankara. 1969.
- 15- SKINNRE, H.H. : Propagation of strains of FMDV in unweaned white mice. Proc. Roy. Soc. Med. 441: 1041-1044. 1951.
- 16- STROBBE, R., DEBECO, J. and LEUNEN, J. : Elution and innocuity of foot and mouth disease vaccines. Rep. Meet. Res. Gr. Stand. Tech. Comm. Tubingen. 1981.
- 17- ULUTÜRK, S., AYNAGÖZ, G. : Şap aşularının zararsızlık kontrollerinin in vivo ve in vitro sistemde mukayeseli olarak yapılması. T.O.K., Bakanlık araştırması Proje Kod. No. 88-2. 1989.
- 18- VAN BEKKUM, J.G. : Şap aşularının kalite ve zararsızlık kontrolleri. I. Uluslararası Şap Sempozyumu. Haziran 1989, Ogun Kard. Mat. Ankara. 1990.