

İnaktif mavidil serotip 4 aşısı üretimi

Özden KABAKLI¹, A.Burak GÜNGÖR¹, Elvin ÇALIŞKAN¹, Nedret ÇELİK², İlkey DEMİRHAN³, Halil EROL³, Hasan KESKİN⁴, Hasan YURDAKUL⁴

¹Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Viral Aşı Üretim Laboratuvarı, Ankara, Türkiye, ²Şap Enstitüsü, Virüs Kültürü Laboratuvarı, Ankara, Türkiye, ³Lalahan Merkez Hayvancılık Araştırma Enstitüsü, Sığır Yetiřtirme Şubesi, Ankara, Türkiye, ⁴Karacabey Tarım İşletmesi, Bursa, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 30.05.2011, Kabul Tarihi / Accepted: 07.07.2011

Özet: Bu çalışmada, mavidil attenüe serotip 4 aşısı suşu ile inaktif aşı üretimi yapıldı. Virus Vero hücre hatlarında üretilip, betapropiolactone ile inaktive edilerek, ISA 206 (Seppic) adjuvant ile emülsifiye edildi. Aşılar daha sonra laboratuvar hayvanları ve hedef hayvanlarda sterilite, toksisite ve güvenlik testleri açısından test edildi. Aşının immunojenitesi subkutan olarak 2 ml 10 koyuna, 10 keçiye ve 5 ml 3 sığıra verilerek test edildi. Rapel dozları koyunlarda 28 gün sonra yapıldı ve aşılamalar sonrası hiçbir yan etki tespit edilmedi. Aşılanan keçi, sığırların hepsinde ve koyunların %67'sinde virus spesifik antikorlar gelişti. Elde edilen bu sonuçları değerlendirmek ve minimal aşı dozunu belirlemek amacıyla bütün hedef hayvan türlerini içeren daha büyük bir hayvan grubunda yeni bir çalışma planlandı.

Anahtar sözcükler: İnaktif aşı, mavidil, virus nötralizasyon.

Production of inactivated serotype 4 bluetongue vaccine

Summary: In this study production of inactivated bluetongue vaccine with attenuated bluetongue serotype-4 strain was performed. The vaccine viruses were propagated in Vero cell cultures, and inactivated with Beta-propiolactone. Subsequently by using adjuvant Montanide ISA 206 inactivation studies were carried out. Vaccines prepared were then tested against sterility, toxicity and safety. Immunogenicity of the prepared vaccine was tested by inoculating 10 sheep and 10 goats, 3 cattle subcutaneously. Booster doses were administered to sheep after 28 days. All of the vaccinated goats and cattle and 67% of the sheep showed BTV-4 specific antibodies. To test further these promising results and to evaluate the minimum protective vaccinal dose, a new trial with a larger number of animals, including all target species, has been planned.

Key words: Bluetongue virus, inactivated vaccine, virus neutralisation.

Giriş

Mavidil virusu, Reoviridae familyasına ait Orbivirus genusunda yer alan çift iplikçikli RNA yapısında, 60-80 nm büyüklüğündedir. VP2 proteini nötralizan antijene sahip olup değişken sekansları nedeniyle virusun 24 serotipe ayrılmasına neden olur. Nötralizan antikorlar oluşturma özelliğinden dolayı hastalıktan korunmada da önemlidir (14, 22). Mavidil virusu +4 ve -70°C de dayanıklı iken -20°C de daha az dayanır. Ultraviyole ve gamma irradyasyon ışınlarına nispeten daha dayanıklıdır. Hastalık etkeni Ceratopogonidae familyasından Culicoides genusundaki sokucu sineklerle bulaşır. Hastalıkta morbidite %80 ve mortalite %5-10 arasında değişiklik göstermektedir.

Hastalıktan korunmada vektör mücadelesinin yanı sıra, en önemli mücadele yöntemi aşılama ile

bağışık sürülerin elde edilmesi olup, dünyada bugüne kadar mavidil salgınlarında monovalan veya polivalan olarak attenüe mavidil aşısı kullanılmıştır (10, 18, 27). Attenüe mavidil aşısının dışında inaktif ve rekombinant teknoloji ile geliştirilmiş aşılar mevcuttur (8, 11, 14, 20, 23). Attenüe aşılar inaktif aşılarla göre daha ekonomiktir ve daha iyi immun yanıt alınmaktadır. Fakat bunun yanı sıra uluslararası hayvan ve hayvansal ürünlere ilişkin kurallar gereği ve gebelik dönemindeki koyunlara, koç katımı döneminde koçlara uygulanamaması ve değişik araştırmacılar tarafından bildirildiği gibi, (15, 18) aşı virusunun geri dönüşüm riski olabileceğinden dolayı son zamanlarda inaktif mavidil aşı geliştirme çalışmaları tüm Avrupa Ülkelerinde önem kazanmıştır (7, 11, 20, 21, 23, 24). Türkiye'de 1978 yılından itibaren BT-4 suşundan hazırlanan monovalan attenüe mavidil aşısı üretilmekte ve kullanılmak-

tadır. 1999- 2001 yıllarında görülen mavidil vakalarında serotiplerin farklı olması ve serotipler arası kross bağışıklık olmaması sebebiyle (22) bu serotipleri ve ileride ortaya çıkabilecek farklı serotipleri içeren monovalan veya polivalan mavidil aşılarının kullanılması gerektiği ortaya çıkmıştır.

İnaktif aşı üretimi amacıyla, virus inaktivasyonunda inaktif madde olarak çeşitli kimyasallar ve fiziksel yöntemler kullanılmaktadır. Bunların başında gamma irradiasyon, lazer, ısı, ultraviyole ve ultraviyolenin kimyasallarla bir arada kullanılması suretiyle geliştirilen fotokimyasal metotlar, ve en yaygın kullanılan yöntemler olarak kimyasal maddelerin kullanımını sayabiliriz (4, 8, 9, 20, 21, 23, 25). En çok tercih edilen kimyasal inaktiflerin başında formaldehit, binary ethylenimin ve beta-propiolactone gelmektedir (9, 11, 19, 20). İnaktif mavidil aşı üretimi için farklı inaktifantların denendiği aşı çalışmaları mevcut olup (6, 7, 11, 17, 20, 21, 23), Parker ve arkadaşları (19), Ramakrishnan ve ark. (20), ile Savini ve ark. (23), tarafından beta propiolakton, Binary etylenimine ve Campbel ve ark. (8), gamma irradiasyon ile inaktivasyon yöntemlerinin daha etkili olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarla aşının immunojenik aktivitesinin antijen ve adjuvant miktarına göre arttığı görülmüştür (12, 26). Birçok madde adjuvant olarak bilinmesine karşın en çok kullanılanları alimünyum hidroksit jeli, saponin ve yağ emülsiyonlu adjuvantlardır. İlk yağ adjuvantlı mavidil aşısı Parker ve ark. (19), tarafından gerçekleştirilen inaktif mavidil aşısı üretimi sırasında çift yağ emülsiyonlu adjuvant kullanılarak üretilmiştir. Son yıllarda alternatif olarak kullanıma hazır yağ adjuvantları geliştirilmiştir.

Bu çalışmamızda mavidil serotip 4 virusuna karşı inaktif aşı geliştirilmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Virus suşu: Güney Afrika orijinli embriyolu tavuk yumurtasında 72, kuzu böbrek hücre kültürlerinde 2, BHK hücrelerinde de 4 üncü pasajı yapılan atenué S.A. BT./4 -BHK/4 PDAM suşudur.

Vasat: Glasgow MEM (Applichem A1321.9010), Minimum essential medium- NaHCO₃ lı Earl's vasatı (Gibco 61100-087), Eagle's minimum essential medium (Sigma EMEM M 0268) %10 FCS'lu hücre ve virus üretme vasatı olarak kullanıldı.

BT antikor C- ELISA: VMRD firmasından ticari olarak temin edilmiştir.

BT antijen ELISA: VMRD firmasından ticari olarak temin edildi.

FTIC (florasan izotiyosiyonat) ile conjugé edilmiş BTV VP7 mab: VMRD firmasından ticari olarak temin edildi.

Beta propiolakton: Across Organics %98 pure, code: 269040250 ticari olarak temin edildi.

Montanide ISA 206 (Seppic) adjuvant: Seppic firmasından temin edildi.

Deneme hayvanları: Enstitünün deneme hayvanları bölümündeki fare, kobay,koyun, Lalahan Merkez Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğündeki sığır ve keçiler ile TİGEM Karacabey Tarım işletmesindeki koyunlarda Etik Kurul kararına uygun olarak çalışıldı.

Virus üretimi: Ana tohum virus suşundan çalışma tohum virus suşu elde edilerek kalite kontrol testleri tamamlandı ve aşı üretiminde kullanılacak antijen için %80 -90 Monolayer olan vero hücrelerine 37°C de inokule edildi. İnokulasyonu takip eden 4-5. günlerde %90-100 CPE gelişen kültürlerdeki virus süspansiyonu aseptik şartlarda toplandı. Toplanan bulk ürünün kalite kontrol testleri; titre, sterilite, özdeşlik (identitiy) vs OIE Manual of standarts of diagnostic tests and vaccines (18) ve European pharmacopea'ye göre (1, 2, 3) yapıldı.

Daha sonra santrifüj edilerek berraklaştırılan virus süspansiyonu finalde %0.2 (v/v) olacak şekilde beta propiolactone ile Parker ve ark. (19), bildirildiği şekilde inaktive edildi. İnaktive virus süspansiyonundan alınan örnekler invivo ve invitro olarak inaktivasyon kontrol testlerine tabi tutuldu.

İnaktivasyon kontrol testleri: İn vivo test: 20 ml inaktive olan virus süspansiyonundan 4 adet mavidil seronegatif koyuna subkutan olarak inokule edildi. İki adet aşılammış koyun negatif kontrol olarak bırakıldı. 21 gün boyunca beden ısıları kontrol edildi ve klinik olarak anormal bir belirti olup olmadığı yönünden gözlemlendi. İki günde bir 21 gün boyunca EDTA ' lı tüplere kan alınarak mavidil virus varlığı yönünden BTV antijen ELISA ve embriyolu tavuk yumurtasına inokulasyon yolu (13) ile test edildi. **İn vitro test:** Üç adet 175 cm² monolayer VERO hücrelerine 10 ml inaktive olan virus süspansiyonundan inokulasyon yapıldı. Üç pasaj sonra olası CPE varlığı yönünden gözlemlendi. CPE gözlenmemesi

halinde, kültür sıvılarındaki BTV antijenlerinin varlığı, ELISA ve immunofloresan teknikleri ile araştırıldı.

Adjuvant ve koruyucu ilave edilmesi: İnaktivasyon gerçekleştirildikten ve test edildikten sonra eşit ağırlıktaki Montanide ISA 206 adjuvanla 50:50 (v/v) oranında karıştırılarak emülsifiye edildi. Oluşturulan emülsiyonun sterilite testi yapılarak, konsantrasyon 1: 10 000 olacak şekilde koruyucu olarak %5 solusyondan thiomersol katıldı. Oluşan antijen, adjuvant emülsiyonunun stabilite testleri yapıldı;

Santrifüj metodu: Bu amaçla 15 ml emülsiyon santrifüj tüpüne konarak 3000 rpm de 20 dakika santrifüj edildi.

Bekletme metodu: Emülsiyon +4 °C de 4 ay süresince bekletildi. Her iki metotta ayrışma olup olmadığı takip edildi.

Son ürünün kontrol testleri: Sterilite, zararsızlık, güvenlik ve etkinlik vs OIE Manual of standarts of diagnostic tests and vaccines (18) ve European pharmacopea'ye göre (1, 2, 3) yapıldı.

Güvenlik ve zararsızlık testi: Deney hayvanlarında; 350gr ağırlıktaki 4 adet kobaya 2 ml ve altı 12 adet 18 gr ağırlıktaki fareye 0.5 ml subkutan olarak enjekte edildi. Hayvanlar 14 gün boyunca enjeksiyon bölgesinde lokal reaksiyon ve klinik bulgular yönünden gözlemlendi.

Hedef hayvanlarda: Bu amaçla Enstitü deneme hayvan ünitesinde bulunan ve bulunan ve mavidil virus antikorlu içermeyen iki adet koyuna son ürün 3 ml subkutan olarak inokule edildi. İki adet aşılanmamış koyun negatif kontrol olarak bırakıldı. 21 gün boyunca beden ısıları kontrol edildi ve klinik olarak anormal bir belirti olup olmadığı yönünden gözlemlendi. İki günde bir, 21 gün boyunca EDTA'lı tüplere kan alınarak mavidil virus varlığı yönünden BTV antijen ELISA ve embriyolu tavuk yumurtasına inokulasyon yolu ile test edildi. Aynı zamanda bu hayvanlardan 14.gün, 21.gün ve 28. günlerde kan serum örnekleri alındı. 28 gün sonra 3 ml olarak aşı tekrarı (rapel) yapıldı. Aşı tekrarı sonrası 1 aylık periyotlarda 6 ay boyunca kan serum örnekleri alınarak mavidil antikor varlığı yönünden ELISA ve SNT ile test edildi.

Etkinlik ve potens testi: Etkinlik testi için kontrol testleri tamamlanmış olan monovalan inaktif mavidil serotip 4 aşısı, Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsündeki 3 adet sığra (5 ml) ve 10 adet keçiye

(2 ml) tek saha dozu aşı uygulaması yapılırken, Tİ-GEM işletmelerinde daha önce mavidil antikorları yönünden test edilerek negatif bulunan 10 adet koyuna (2 ml) aşı uygulaması ve 28 gün sonra aşı tekrarı yapıldı. Aşılama sonrası 14., 21. ve 28. günlerde kan serum örnekleri alındı. Koyunlarda 28. günden sonra 126. günde ve 173. günde serum örnekleri alındı. Alınan kan serum örnekleri BT nötralizan antikorlar yönünden ELISA ve VN ile test edildi. Güvenlik ve zararsızlık testi için 3 ml subkutan aşı uygulaması yapılan koyunlar da etkinlik testinde değerlendirilerek 6. aya kadar kan serum örnekleri alındı.

Bulgular

Aşı Üretimi ve Kontrolü: Ana tohum virusu, çalışma tohum virusu ve aşı üretiminde kullanılan virus süspansiyonlarının kalite kontrol testleri OIE Manual of standarts of diagnostic tests and vaccines (18) ve European pharmacopea ye göre (1, 2, 3) uygun bulundu. Virus üretimine ait kalite kontrol testleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

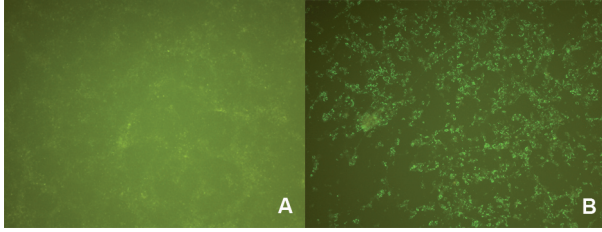
Tablo 1. İnaktif mavidil tip 4 aşısı - virus üretim ve kontrol testleri.

Antijenik titresi (log 10* DKID ₅₀ /ml)	8,3
Sterilite (virus, mantar, bakteri ve mikoplazma) uygun	
Özdeşlik (identity) (VNT, PCR)	+
İnaktivasyon (in vivo/ invitro)	inaktif

Virus inaktivasyonu: Gerek invivo, gerekse invitro virus inaktivasyon testlerinin her ikisi de olumlu sonuçlandı.

İn vivo test: İki koyuna yapılan inokulasyonu takip eden 21 gün boyunca bu hayvanların beden ısılarında yükselme olmadı ve klinik olarak mavidil hastalığını düşündürecek bir belirti gözlenmedi. Yirmibir gün boyunca iki günde bir, EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri mavidil virus varlığı yönünden BTV antijen ELISA tekniği ve embriyolu tavuk yumurtasına inokulasyon ile test edildi. Her iki yöntem ile kan örneklerinde mavidil virusu tespit edilmedi.

İn vitro test: Vero hücre hattında yapılan üç pasaj sonunda CPE varlığı gözlenmedi, BTV antijen ELISA ve BTV immunofloresan yönünden negatif bulundu. BTV immunofloresan yönünden yapılan boyama sonuçları Şekil 1. de gösterildi.



Şekil 1. A. BTV immunofloresan yönünden yapılan in-vitro test sonucu negatif görüntü ve B. pozitif kontrol örnekte yapılan immunofloresan görüntü.

Final ürün kontrol testleri: Adjuvantla emülsiyon oluşturulan aşılarda, gerek santrifüj gerekse +4 °C de 4 ay süresince bekletme şeklinde yapılan stabilite testlerinde ayrışma olmadığı gözlemlendi. Final ürünün OIE Manual of standards of diagnostic tests and vaccines (18) ve European pharmacopea'ye göre (1, 2, 3) yapılan sterilité testi sonucu bakteri, mantar ve mikoplazma yönünden steril bulundu.

Güvenlik ve zararsızlık testi: Deney hayvanlarında; Enjeksiyon yapılan fare ve kobaylarda 14 gün boyunca herhangi bir klinik bulgu ve enjeksiyon bölgesinde herhangi bir lokal reaksiyon görülmedi. Hedef hayvanlarda: İnokulasyon yapılan ve kontrol olarak bırakılan koyunlarda, 21 gün boyunca beden ısılarında herhangi bir yükselme ve klinik olarak anormal bir belirti gözlemlenmedi. Enjeksiyon bölgesinde herhangi bir lokal reaksiyon görülmedi. İki günde bir 21 gün boyunca EDTA'lı tüplere kan alınarak mavidil virus varlığı yönünden BTV antijen ELISA ve embriyolu tavuk yumurtasına inokulasyon yolu ile yapılan test sonucu virus tespit edilmedi. Sığırlarda ve keçilerde herhangi bir lokal ve klinik reaksiyon gözlemlenmedi. Deney hayvanları ve

hedef hayvanlarda elde edilen güvenlik ve zararsızlık test sonuçları Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. İnaktif mavidil aşısı deneme üretim güvenlik ve zararsızlık test sonuçları.

Hayvan/ sayısı	Doz/miktar	Aşılama sonrası reaksiyon	
		Lokal	Genel
Kobay/4	2 ml / kas içi	Y	Y
Kobay/2	Aşısız kontrol	Y	Y
Fare/12	0.5 ml/ kas içi	Y	Y
Fare/4	Aşısız kontrol	Y	Y
Koyun/2	3 ml / kas içi	Y	Y
Koyun/2	Aşısız kontrol	Y	Y

Y: Yok

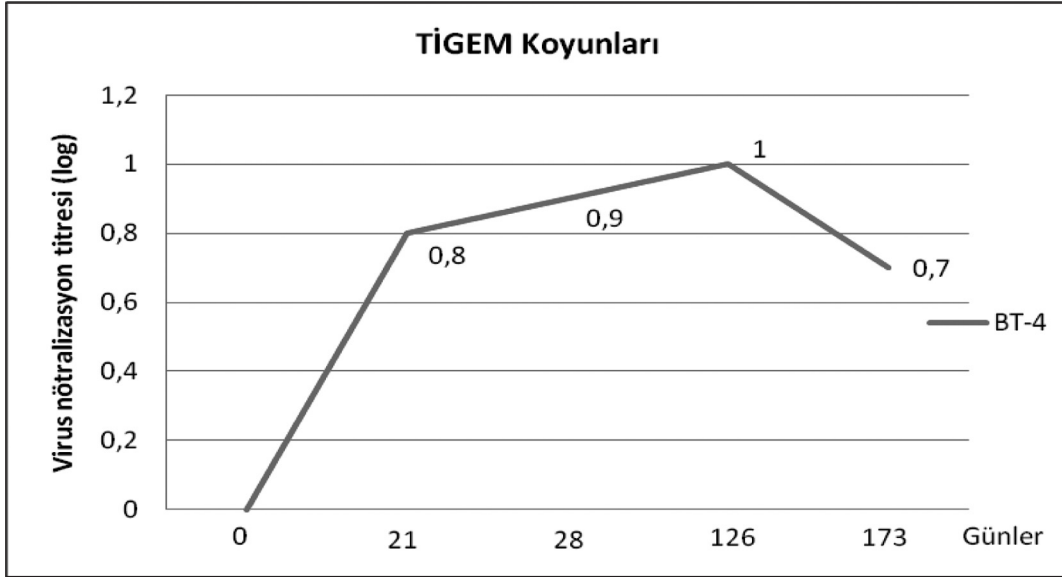
Etkinlik ve potens testi: Enstitü deneme hayvan ünitesinde 3 ml subkutan monovalan BT-4 aşısı uygulaması yapılan koyunlarda immunizasyonu takiben hepsinde 14. günden itibaren nötralizan ve ELISA ile antikorlarının geliştiği ve 6. aya kadar bu antikorların varlığını sürdürdüğü tespit edilmiştir. Deri altı yolla ve 2 ml hacimde aşılama 10 adet koyundan 6 adedinde 28. günde koruyucu düzeyde nötralizan antikorlar tespit edildi. Keçilerde yapılan 2 ml aşısı inokulasyonu sonucu 10 keçinin hepsinde 28.günde koruyucu düzeyde antikor varlığı tespit edildi. Aşısı inokule edilen 3 sığırdaki 28. günde serum örnekleri alındı ve hepsinde koruyucu düzeyde antikor tespit edildi. Elde edilen sonuçlar inokule edilen aşılarda immunojen olduklarını göstermektedir. Sonuçlar Tablo 3, Grafik 1 ve 2 de özetlenmiştir.

Tablo 3. İnaktif mavidil aşısı deneme üretim etkinlik ve potens test sonuçları.

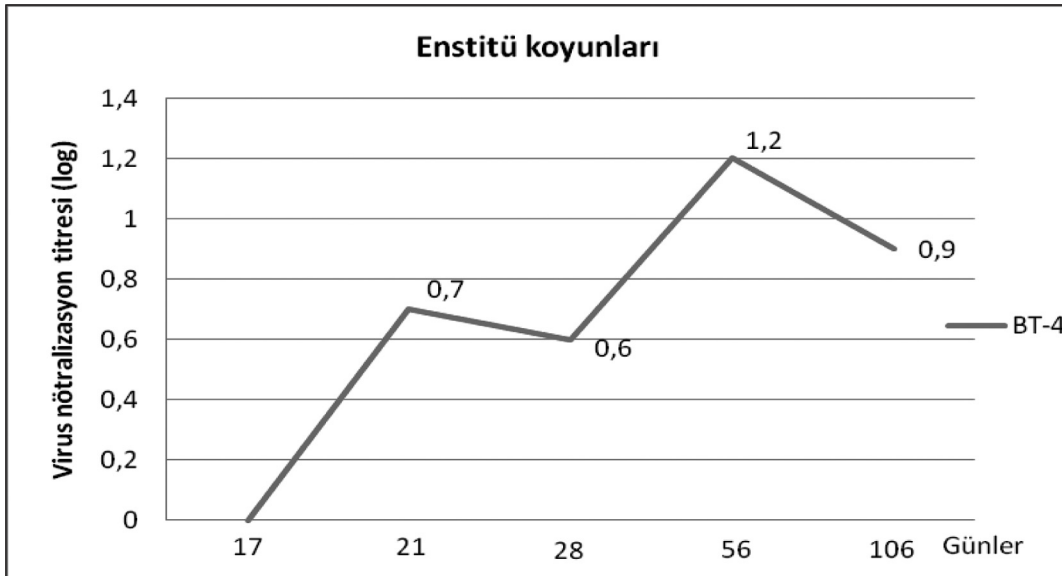
Sayı / Hayvan	Aşısı serileri	Doz/miktar ml/deri altı	Aşılama öncesi BT antikor SN50 (N=<1/4)	Aşılama sonrası reaksiyon		Aşılama sonrası 28.gün BT antikor SN50 (P>=1/4)
				lokal	genel	
10 Koyun	Monovalan BT4	2 ml	10	Y	Y	6
2 koyun	Monovalan BT4	3 ml	2	Y	Y	2
10 keçi	Monovalan BT4	2 ml	10	Y	Y	10
3 sığır	Monovalan BT4	5 ml	3	Y	Y	3
1sığır,7 koyun,5 keçi	Aşısız kontrol	-	13	Y	Y	-

Y:Yok

Grafik 1. İnaktif mavidil aşısı deneme üretimindeki serotip 4, ile aşılama sonrası TİGEM koyunlardaki nötralizan antikor titreleri



Grafik 2. İnaktif mavidil aşısı deneme üretimindeki serotip 4 ile aşılama sonrası Enstitü koyunlarındaki nötralizan antikor titreleri



Tartışma

Bu çalışma sonucunda deneysel olarak üretilen adjuvanlı inaktif BTV-4 aşısı güvenli, etkili ve OIE Manual of standards of diagnostic tests and vaccines (18) ve European pharmacopea (1, 2, 3) gereksinimlerini karşılamaktadır. Aşılama sonrası hayvanlarda beden ısısı yükselmesi dahil herhangi bir klinik bulgu ve inokulasyon bölgelerinde lokal reaksiyon gözlenmemiştir. Aşının final konsantrasyonda %0.2

olacak şekilde beta propiolactone (v/v) ile inaktive edilmesinin güvenli ve yeterli olduğu bu çalışma ile teyit edilmiş oldu. Capodici ve ark. (6) HIV aşısı üretiminde inaktivan olarak beta propiolactone kullanmışlardır. Sofer ve ark. (25), ile diğer araştırmacıların (9) yaptıkları çalışmalarla beta propiolactone'un proteinler üzerine olan kimyasal etkisi çok iyi belirlenmiş ve viral inaktivan olarak etkisi kanıtlanmıştır. Beta propiolactonun aşıda kalıntı inaktivan maddelerin güvenli seviyede olmaları açısından da

yapılan çalışmalarda (9, 25) inaktivasyon sırasında karışımın uzun süre +37°C'de PH 7.00 ± 0.05 de tutulması ile hidrolizasyon gerçekleştiği ve bir isomer olan lactate ile beta-propionic asit derivatlarına ayrıldığı ve dolayısı ile beta propiolactonun kalıntı olarak güvenli olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada da final konsantrasyonda %0.2 beta propiolactone kullanıldığında virusun tam inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. İnaktivasyonun başarılı olduğu *in vivo* ve *in vitro* kontrol testleri ile doğrulanmıştır. İnaktivasyon yönteminin virusun antijenik karakterine, özellikle kapsitte bulunan VP2 proteini nötralizan antijen üzerinde (6) herhangi bir olumsuz etki yapmadığı sığır, koyun ve keçilerde gelişen nötralizan antikorların varlığı ile ortaya konulmuştur. Enstitümüz deneme koyunlarına 3 ml aşı inokule edilmesi sonucu hepsinde yüksek titrede nötralizan antikor tespit edilmiş ve bu antikorlar çalışmamızın devam ettiği 6 ay boyunca koruyucu düzeyde devam etmiştir. Lalahan Merkez Hayvancılık Araştırma Enstitüsündeki sığırlara 5 ml ve keçilere 2 ml aşı inokule edilmiş 28. günde hepsinde koruyucu düzeyde nötralizan antikorlar tespit edilmiştir. Benzer şekilde Karacabey Tarım İşletmesinde bulunan koyunlara 2 ml inokulasyon yapılmış, aşı yapılan hayvanların %67'sinde koruyucu düzeyde nötralizan antikorlar gelişmiştir. Aşılardan hayvanların %33'ünde yeterli bağışıklığın gelişmemesini, antijen konsantrasyonunun yapılmamış olmasına ve dozun 2 ml'ye düşürülmesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Yapılan çalışmalarla aşının immunojenik aktivitesinin antijen ve adjuvant miktarına göre arttığı bildirilmiştir (12, 26). Yeterli bir immün yanıt alınabilmesi için inaktive edilmiş antijenler mutlaka adjuvantlarla karıştırılmalıdır. Adjuvantlar, aşının etkinliğinin artırılması ve uzun süre bağışıklık sağlaması amacıyla kullanılan immunostimulan özellikteki ajanlardır. Çalışmamızda Parker ve ark. (19), bildirdiği gibi yağlı adjuvant kullanımı tercih edilmiş olup, Barnett ve ark. (5), Di Emidio ve ark. (11), ile Savini ve ark. (23), kullandığı gibi yağ emülsiyonlu adjuvant olan Montanide ISA 206 kullanıldı. Hazır adjuvant özelliğinde olan Montanide ISA 206 W/O/W (water in oil) tipi emülsüyondur. Bu tip emülsüyonlarda antijen yağ damlacığının dış kısmında ve içinde yer almaktadır. Bu antijenlerin hemen faaliyet göstermesini sağlayan devamlı su fazının varlığı hızlı bir immün yanıt oluşturmayı; yağ damlacığının içindeki sulu fazda tutunan antijenlerde depo etkisi özelliği ile immün

yanıtın uzun süre devamını sağlamaktadır. Dış fazın sulu olması enjeksiyonu kolaylaştırmaktadır. Aynı zamanda farklı hayvan türlerinde kullanılabilir olması bu tip adjuvantların tercih edilmesine neden olmaktadır (5). Bu çalışmada da Montanide ISA 206 adjuvantı ile hazırlanan aşı kombinasyonları farklı türler olan sığır, koyun ve keçilerde etkili olmuş kısa sürede immün yanıt alınmış ve çalışmanın devam ettiği 6 ay boyunca koruyucu düzeyde antikorlar varlığını sürdürmüşlerdir. Uygulama yapılan hayvanlarda lokal ve genel reaksiyon görülmemesi adjuvantın kolay enjekte edilebilir özellikte ve güvenli olduğunu göstermiştir. Test edilen tüm türlerde (sığır, koyun ve keçi) ilk aşılardan sonra seropozitiflik bulunması, Murray ve ark. (16), Parker ve ark. (19), Di Emidio ve ark. (11), ile Savini ve ark. (23, 24) bulgularını teyit etmektedir. Keçilerde daha yüksek titrede immün yanıt alınması Di Emidio ve ark. (11), bulguları ile paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada tercih edilen inaktivasyon metodu ve adjuvant ile deneysel üretilen inaktif mavidil aşısının güvenli ve elde edilen immün yanıtın yeterli olduğu görülmüştür. Bundan sonraki aşamada daha büyük hayvan grubunda çalışmalar planlanıp, minimal aşı dozun belirlenmesi ve farklı adjuvantlarla çalışmalar yapılması hedeflenmektedir.

Kaynaklar

1. **Anonim**, (1991). *European Commission Directive 91/412/EEC of 23 July 1991 laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice for veterinary medicinal products*. Off J. L228, p. 70-73.
2. **Anonim**, (1981). *European Council. Council Directive 81/852/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to analytical, pharmacotoxicological and clinical standards and protocols in respect of the testing of veterinary medicinal products*. Off J. L 317, p. 53-98.
3. **Anonim**, (2001). *European Pharmacopoeia. Addendum No. 0016*. Council of Europe, Strasbourg, p. 1657-1661.
4. **Bachmann MF, Bast C, Hengartner H, Zinkernagel RM**, (1994). *Immunogenicity of a viral model vaccine after different inactivation procedures*. Med Microbiol Immunol. 183(2), 95-104.
5. **Barnett PV, Pullen L, Willams L, Doel TR**, (1996). *International Bank for Foot and Mouth Disease Vaccine: Assessment of Montanide ISA 25 and ISA 206 two commercially available oil adjuvant*. Vaccine. 14, 1187-1198.
6. **Berry LJ, Osburn BI, Scott JL, Farver T, Heron B, Patton W**, (1981). *Inactivated Bluetongue Virus Vaccine in Lambs: Differential Serological Responses Related to Breed*. Vet Res Comm. 5(3), 289-293.

7. Bréarda E, Belbis G, Hamers C, Moulind V, Lilin T, Moreau F, Millemann Y, Montange C, Sailleau AC, Durand B, Viarougea C, Hoffmann B, Desmidt H, Goutebrozec S, Hudelet P, Zientara S, (2011). *Evaluation of humoral response and protective efficacy of two inactivated vaccines against bluetongue virus after vaccination of goats*. Vaccine. (In pres).
8. Campbell CH, Barber TL, Knudsen RC, Swaney LM, (1985). *Immune response of mice and sheep to bluetongue virus inactivated by gamma irradiation*. Prog Clin Biol Res. 178, 639-647.
9. Capodici J, Maigetter R, (2006). *Large-scale beta propiolactone inactivation of HIV for vaccines*. Bioprocess International. Febr. p. 36-41.
10. Caporale V, Giovannini A, (2010). *Bluetongue control strategy, including recourse to vaccine: a critical review*. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 29(3), 573-591.
11. Di Emidio B, Nicolussi P, Patta C, Ronchi GF, Monaco F, Savini G, Ciarelli A, Caporale V, (2004). *Efficacy and safety studies on an inactivated vaccine against bluetongue virus serotype 2*. Vet Ital. 40 (4), 640-644.
12. Francis MJ, (1990). *Pepdide vaccines for viral disease*. Sci Progress Oxford. 74, 115-130.
13. Goldsmit L, Barzilai E, Tadmor A, (1975). *The comparative sensitivity of sheep and chicken embryos to bluetongue virus and observations on viraemia in experimentally infected sheep*. Aust Vet J. 51 (4), 190-196.
14. Lobato ZIP, Coupar BEH, Gray CP, Lunt R, Andrew ME, (1997). *Antibody Responses and Protective Immunity to Recombinant Vaccinia Virus-expressed Bluetongue Virus Antigens*. Vet Immunol Immunopathol. 59, 293-309.
15. Monaco F, Camma C, Serini S, Savini G, (2006). *Differentiation between field and vaccine strain of Bluetongue virus serotype 16*. Vet Microbiol. 116, 45-52.
16. Murray PK, Eaton BT, (1996). *Vaccines for Bluetongue*. Aust Vet J. 73, 207-210.
17. Odeon AC, Gerswin LJ, Osburn BI, (1999). *IgE responses to bluetongue virus (BTV) serotype 11 after immunization with inactivated BTV and challenge infection*. Comp Immun Microb Infec Disease. 22, 145-162.
18. OIE, (2000). *Office International des Epizooties Bluetongue*, Chapter 2.1.9. Manual of standards of diagnostic tests and vaccines, Paris, p. 153-167.
19. Parker J, Hernimann KAJ, (1975). *An experimental inactivated vaccine against bluetongue*. Vet Rec. 96, 284-287.
20. Ramakrishnan MA, Pandey AB, Singh KP, Singh R, Mehrotra ML, (2005). *Immune response and protective efficacy of binary ethylenimine (BEI) inactivated bluetongue virus vaccines in sheep*. Vet Res Comm. 29
21. Ramakrishnan MA, Pandey AB, Singh KP, Singh R, Mehrotra ML, (2005). *Immune response and protective efficacy in sheep immunised with hydroxylamine-inactivated bluetongue virus vaccine*. Vet Ital. 41(3), 149-155.
22. Roy P, (1992). *Bluetongue virus proteins*. J Gen Virol. 73, 3051-3064.
23. Savini G, Ronchi GF, Leone A, Ciarelli A, Migliaccio P, Franchi P, Mercante MT, Pini A, (2007). *An inactivated vaccine for the control of bluetongue virus serotype 16 infection in sheep in Italy*. Vet Microbiol. 124, 140-146.
24. Savini G, Hamers C, Conte A, Migliaccio P, Bonfini B, Teodori L, Ventura MD, Hudelet P, Schumacher C, Caporale V, (2009). *Assessment of efficacy of a bivalent BTV-2 and BTV-4 inactivated vaccine by vaccination and challenge in cattle*. Vet Microbiol. 133, 1-8.
25. Sofer G, Lister CD, Boose JA, (2003). *Inactivation Methods Grouped by virus*. BioPharm International's April. p. 37-42.
26. Stott JL, Barber TL, Osburn BI, (1985). *Immunologic response of sheep to inactivated and virulent bluetongue virus*. Am J Vet Res. 6(5), 1043-1049.
27. Zientara S, Maclachlan NG, Calistri P, Vizcaino JMS, Savini G, (2010). *Bluetongue vaccination in Europe*. Expert Revi Vaccines. 9(9), 989-991.