

Attenu mavidil serotip-4 aşısının farklı stabilizatörler ile üretilmesi

Ahmet Burak GÜNGÖR, Özden KABAKLI, Elvin ÇALIŞKAN

Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Viral Aşı Üretim Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

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

Özet: Bu çalışma ile attenu mavidil serotip-4 aşısının halihazırda kullanılmakta olan embriyo ekstraktı ve yumurta sarısından oluşan stabilizatörünün yerine farklı stabilizatörlerin kullanılması ve bunların liyofilizasyon ve raf ömrüne etkileri araştırıldı. Bu amaçla Ankara Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Viral Aşı Üretim Laboratuvarı bünyesinde bulunan ve Vero hücrelerinde üretilen SA BT/4 attenu suşu kullanıldı. Hazırlanan ham aşı sırasıyla; Lactalbumin hydrolysate %5 -sucrose %10 (LH), Weybridge Medium (%2.5 lactalbumin hydrolysate , %5 sucrose ve %1 Sodium glutamate) (WBM), Lactalbumin hydrolysate %5 -Mannitol %10 (LM), Jelatin sorbitol (hidrolize jelatin %3.5- D-sorbitol %3.5) (JS), distile suda %5 oranında Trehalose hidrate (TD) ile hazırlanan değişik stabilizatörlerle karıştırılıp liyofilizasyona tabi tutuldu. Liyofilizasyon sonucunda ortaya çıkan final ürünün kalite kontrol testleri ve raf ömrü çalışmaları gerçekleştirildi. Bu testler sonucunda; liyofilizasyon sonucunda aşı virusunda meydana gelen infeksiyözdeki kayıp, denenen bütün stabilizatörler için kabul edilir düzeydeydi. Denemesi yapılan stabilizatörlerle hazırlanan aşılarda zararsızdı. Raf ömrü çalışmalarında en iyi performansı Lactalbumin hydrolysate %5 -sucrose %10 (LH) ile hazırlanan aşı gösterdi.

Anahtar sözcükler: Aşı, bağışıklık, mavidil serotip 4, raf ömrü, stabilizatör.

Production of attenuated live bluetongue serotype-4 vaccine with different stabilizers

Summary: In this study, effects of different stabilizers other than embryo extract and egg yolk used at present on lyophilisation and shelf life of attenuated lyophilized Bluetongue serotype-4 vaccine was investigated. For this purpose, SA BT/4 attenuated vaccine strain present at Etlik Central Veterinary Control and Research Institute Viral Vaccine Production Laboratory produced in Vero cell line is used. Bulk vaccine was mixed with 5% lactalbumin hydrolysate 10% sucrose (LS), Weybridge Medium (2.5% lactalbumin hydrolysate , 5% sucrose and 1% Sodium glutamate) (WBM), 5% lactalbumin hydrolysate -10% Mannitol (LM), Gelatin sorbitole (3.5% hidrolised gelatine - 3.5% D-sorbitole) (JS) and 5% Trehalose hidrate (TD) in distilled water respectively as stabilizer. At the end of lyophilisation, quality control tests and shelf life studies of the vaccines were carried out. Results indicated that; the loss of infective titre of the vaccine virus after lyophilisation procedure was acceptable for all stabilizers, all the vaccines prepared with mentioned stabilizers were harmless, the vaccine, prepared with 5% lactalbumin hydrolysate-10% sucrose (LS) stabilizer had the best performance amongst in shelf life studies.

Key words: Bluetongue serotype 4, vaccine, stabilizer, immunity, shelf life.

Giriş

Mavidil, ruminantların bulaşıcı olmayan, enfeksiyöz ve vektörler ile nakledilen bir virus hastalığıdır. Hastalık, *Reoviridae* ailesi içerisinde yer alan *Orbivirus* genusuna dahil mavidil virusu tarafından oluşturulur (5). Günümüzde BTV'un, aralarında çapraz bağışıklık bulunmayan 24 farklı serotipi tespit edilmiştir (5).

Mavidil virusunun bilinen tüm ruminant türlerini enfekte edebildiği düşünülmektedir. Enfeksiyon sığır ve vahşi ruminantlarda genellikle asemptomatiktir (11). Bununla birlikte koyunlarda özellikle de yüksek verime sahip ırklarda, yüksek ateş, nazal

akıntı baş bölgesinde ödem, oral mukozalarda hiperemi ve ülserasyon, dilde siyanoz ve ayak lezyonları ile seyreden klinik tablo oluşturur. Ayrıca döl veriminde azalma, abort ve konjenital anomalilere de neden olmaktadır (10, 12).

Hastalık duyarlı bireyler arasında *Culicoides* spp. türü sokucu sinekler tarafından nakledilmektedir (4).

Enfekte sığırlar, 12-14 haftaya kadar uzayabilen viremi dönemi ile mavidil epidemiyolojisinde önemli rezervuarlardır. Bu rezervuarlarda kış aylarında varlığını devam ettiren virus, kış sonunda sokucu sinekler yolu ile duyarlı konaklardaki yayılımına devam eder (5, 10, 12).

Mavidil enfeksiyonu, Uluslararası Salgınlar Ofisi'nin düzenlediği A grubu hastalıklar listesinde yer almaktadır. Mavidil virusu uygun koşulları yakaladığı dönemlerde hızlı bir şekilde yayılma özelliğine sahiptir. Tüm bunlarla birlikte salgın meydana gelen ülke hayvan ve hayvansal ürünlerde uygulanan ambargolar sonucunda ciddi sosyo-ekonomik problemleri de beraberinde getirmektedir (3, 10, 14).

Ülkemizde mavidil virusunun varlığı ilk olarak 1944 yılında Hatay bölgesinde bildirilmiştir. Bunu takiben 1978 ve 1979 yılları arasında Yoncuç ve ark.(21), tarafından ikinci bir mavidil salgını rapor edilmiş ve etken serotip 4 olarak tanımlanmıştır. Daha sonra enfeksiyon, sinek popülasyonunun aktif olduğu dönemlerde Ege ve Akdeniz bölgelerine yayılmıştır. Türkiye'de halen tip 4, 9 ve 16 olmak üzere 3 farklı serotipinin bulunduğu bildirilmektedir (6).

Modifiye canlı aşılarda üretiminde, embriyolu tavuk yumurtası (ETY) ya da farklı bir türe ait hücre kültürlerinde tekrarlanan seri pasajlar ile elde edilen attenüe tohum suşları kullanılmaktadır (1, 5, 7, 11). Tek bir serotipe özgü aşı ile genellikle diğer serotiplere karşı koruyucu bağışık yanıt düzeyine ulaşamaz (5). Bununla birlikte segmentli virusların doğası gereği farklı serotipler arasında çeşitli genetik alışverişlerin varlığı da bilinmektedir (6, 7). Modifiye canlı aşılarda yapılan aşılama çalışmalarında sahada sirküle eden serotipin belirlenerek, kullanılan aşılarda bunlara uygunluk göstermesi tavsiye edilmektedir (3, 8, 9, 13).

Modifiye canlı aşılarda üretiminde, embriyolu tavuk yumurtası (ETY) ya da farklı bir türe ait hücre kültürlerinde tekrarlanan seri pasajlar ile elde edilen attenüe tohum suşları kullanılmaktadır (8, 13). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, mavidil aşısının ve diğer orbivirusların aşılarda liyofilizasyon aşamasında kullanılan geleneksel bir stabilizatör olan embriyo ekstraktı ve yumurta sarısı yerine değişik ve daha güvenli stabilizatörlerin etkileri araştırılmakta ve kullanılmaktadır (2, 11, 16, 17, 20, 21). Bu çalışmada attenüe mavidil serotip-4 aşısının halihazırda kullanılmakta olan embriyo ekstraktı ve yumurta sarısından oluşan stabilizatörünün yerine farklı stabilizatörlerin kullanılması ve bunların liyofilizasyon ve raf ömrüne etkileri araştırıldı.

Materyal ve Metot

Virus ve hücre kültürü: Ankara Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Viral Aşı Üretim Laboratuvarı bünyesinde bulunan SA BT/4 attenüe virus suşu kullanıldı. Hücre kültürü olarak; CIRAD-EMVT laboratuvarından temin edilen, kalite kontrol testleri tamamlanmış 157. pasajdaki monolayer Vero hücre hattı kullanıldı.

Vasatlar: %10 fetal dana serumlu (FCS) Minimum essential medium Eagle (EMEM), hücre ve virus üretme vasatı olarak kullanıldı.

Stabilizatörler: Lactalbumin hydrolysate %5 -sucrose %10 (LH) , Weybridge Medium (%2.5 lactalbumin hydrolysate , %5 sucrose ve %1 Sodium glutamate), Lactalbumin hydrolysate %5 -Mannitol %10 (LM), Jelatin sorbitol (hidrolize jelatin %3.5-D-sorbitol %3.5) (JS), Trehalose hidrate (TD) distile suda %5 kullanıldı.

Hiperimmün Serum: Mavi dil serotip 4 için tip spesifik ticari olarak temin edilen hiperimmün serum kullanıldı.

Deneme Hayvanı: Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü bünyesindeki deneme hayvanları bölümünde bulunan 24 adet fare, 8 adet kobay ve 6 adet koyun kullanıldı. Çalışmalar Yerel Etik Kurul kararına uygun olarak gerçekleştirildi.

Ana Tohum ve Çalışma Tohum Suş Üretimi: Ana tohum ve çalışma tohum suşları, Vero hücrelerinde 3 kez pasajı yapılarak Vero hücrelerine adaptasyonu sağlanan SA BT/4 attenüe virus suşu ile hazırlandı. Bu amaçla, 175cm²'lik hücre kültürü şişelerinde, %10 FCS ihtiva eden EMEM vasatı ile üretilen, %90 monolayer ekime hazır vero hücreleri kullanıldı. 0.01 moi. oranında virus ile adsorbsiyonlu ekim yöntemi kullanıldı. Adsorbsiyon süresinin sonunda, hücre kültürü şişelerine %2 FCS'lu EMEM besiyeri konularak, 37°C'de inkubasyona bırakıldı. Hücreler her gün mikroskopta incelenerek, %90-100 sitopatik etki (CPE) görülen şişeler +4°C'ye kaldırıldı. Toplanan viruslar kullanılmaya kadar +4°C'de saklandı. Üretilen virusun kalite kontrol testleri OIE Terrestrial Manual, chapter 1.1.9'a göre yapılarak, ham ürün üretiminde kullanıldı.

Ham Ürünün Elde Edilmesi: Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Viral Aşı Üretim Laboratuvarının üretmekte olduğu BLU-T4

ETVAC isimli attenüe Mavidil tip-4 aşısı protokolüne göre gerçekleştirildi.

Ham Aşının Stabilizatörlerle Karıştırılması ve Liyofilizasyon: Hazırlanan ham ürün eşit hacimde, sırasıyla Lactalbumin hydrolysate %5 -sucrose %10 (LS serisi), Weybridge Medium (%2.5 lactalbumin hydrolysate, %5 sucrose ve %1 Sodium glutamate) (WBM serisi), Lactalbumin hydrolysate %5 -Mannitol %10 (LM serisi), Jelatin sorbitol (hidrolize jelatin %3.5- D-sorbitol %3.5) (JS serisi), Trehalose hidrate distile suda %5 ile karıştırıldı (TD serisi). Bunu takiben her bir seri 5 ml hacimdeki aşısı şişelerine 1 ml miktarında taksim edildi ve liyofilizasyon işlemine tabi tutuldu. Alüminyum kapakları kapatıldıktan sonra kalite kontrol, bağışıklık ve raf ömrü testleri yapılmaya kadar -20°C muhafaza edildi.

Raf Ömrünün Belirlenmesi: Sterilite, vakum ve nem kontrollerinde uygun bulunan her bir aşısı serisi için; liyofilizasyon sonrası titresini saptamak amacıyla 4 ayrı mikrotitrasyon testi gerçekleştirildi ve ortalama titre değerleri tespit edildi. Ham ürünün ve liyofilizasyon sonrası elde edilen aşısı serilerinin enfektif titrelerinin tespiti amacıyla OIE Manual of standards of diagnostic tests and vaccines (15) de belirtilen mikrotitrasyon test yöntemi kullanıldı.

Daha sonra; A. Her bir aşısı serisi 37°C de 1 hafta bekletmek suretiyle hızlı raf ömrü çalışması gerçekleştirildi. Bunun için her bir aşısı serisi 37°C inkübatörlerde 1 hafta bekletildi. Süre sonunda örnekler alındı ve her bir aşısı serisi için ayrı ayrı 4 adet mikrotitrasyon testi uygulandı, ortalama titre değerleri saptandı ve liyofilizasyon sonrası titre değerleri ile karşılaştırıldı. B. 4°C de gerçek zamanlı raf ömrü çalışması gerçekleştirildi. Bunun için hızlı raf ömrü çalışmasında en iyi performansı gösteren aşısı serisi 4°C'de depolanarak belli zaman aralıklarında örnekler alınarak ve ortalama titre değerini saptamak için 4 adet mikrotitrasyon testi uygulandı.

Liyofilize aşılarda kalite kontrol testleri: Raf ömrü çalışmalarında en iyi performansı gösteren aşısı serileri zararsızlık, potens ve immüjenite gibi kalite kontrol testlerine alındı.

Zararsızlık: Bu amaçla, kobay ve fareler kullanıldı.

- Denemesi yapılan her bir stabilizatör için 4 adet kobaya intraperitoneal olarak 2 ml inokule edildi, 4 adet kobay ise kontrol olarak bırakıldı.

- Aynı şekilde, denemesi yapılan her bir stabilizatör için 12 adet ise fareye intraperitoneal olarak 0,5ml inokule edildi, 12 adet fare kontrol olarak bırakıldı.

Kobay ve fareler uygulamadan sonra 14 gün boyunca klinik gözlem altında tutuldu.

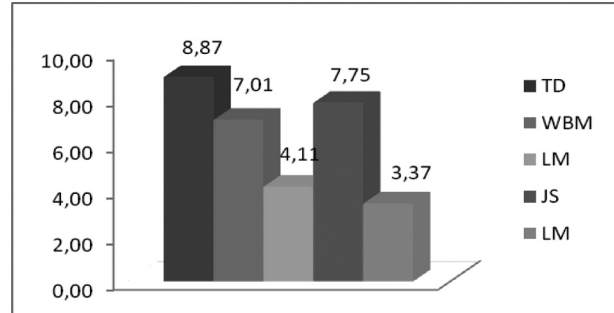
Potens ve İmmünojenite: Mavidil antikorları yönünden seronegatif koyunlar kullanıldı. Hayvanlar, aşılarda verilmesini takiben klinik belirtiler yönünden 28 gün süre ile takip edildi ve günde iki defa beden ısıları alındı. Sürenin bitiminde hayvanlardan kan serum örnekleri alınarak mavidil virusuna karşı antikor varlığı yönünden test edildi.

Bulgular

Sterilite: Denemesi yapılan tüm aşısı serileri, liyofilizasyon sonrasında yapılan testler sonucunda steril bulundu.

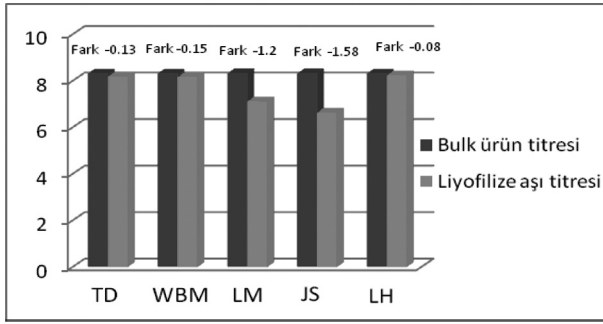
Vakum: Denemesi yapılan tüm aşısı serilerinde liyofilizasyon sonrasında vakum oranı %100 olarak bulunmuştur.

Nem: Denemesi yapılan TD, WBM, LM, JS ve LH aşısı serilerinde ortalama nem oranı sırasıyla %8.87, %7.01, %4.11, %7.75 ve %3.37 olarak bulunmuştur (Şekil 1).



Şekil 1. Denemesi yapılan aşısı serilerinde ortalama nem oranları.

Ham ürün ile Liyofilize aşısı serileri arasındaki titre farkları: TD, WBM, LM, JS ve LH aşısı serileri için üretilen Ham ürünün titresini ortalama Log 10^{8.3} DKID₅₀/ml olarak belirlendi. Liyofilizasyon işleminden sonra elde edilen liyofilize aşısı serileri için ortalama titre değerleri sırasıyla Log 10^{8.17}, 10^{8.15}, 10^{7.1}, 10^{6.62} ve 10^{8.22} DKID₅₀/ml olarak belirlendi (Şekil 2).



Şekil 2. Denemesi yapılan aşı serilerinde Ham ürün ve liyofilize ürünlerin arasındaki ortalama titre değişimleri.

Raf ömrü çalışmaları

37°C de 1 hafta bekletmek suretiyle hızlı raf ömrü çalışması: Denemesi yapılan her bir aşı serisinin liyofilizasyon sonrasında tespit edilen titre değerleri ve bunu takiben gerçekleştirilen hızlı raf ömrü çalışmalarında elde edilen sonuçlar, her bir aşı serisi için aşağıda verilmiştir.

A.1. TD Aşı Serisi: Bu seri için liyofilizasyon sonrasında yapılan 4 seri mikrotitrasyon testinde ortalama titre değeri $\text{Log } 10^{8.17}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$ ($\text{Log } 10^{8.3}$, $10^{8.2}$, $10^{8.0}$, $10^{8.2}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$) olarak belirlendi. Bunu takiben gerçekleştirilen hızlı raf ömrü çalışmalarında ise; yapılan 4 seri mikrotitrasyon testinde ortalama titre değeri $\text{Log } 10^{6.32}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$ ($\text{Log } 10^{6.2}$, $10^{6.3}$, $10^{6.3}$, $10^{6.5}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$) olarak belirlendi. Titre değerindeki düşüş ise, $\text{Log } 10^{1.85}$ olarak belirlendi.

A.2. WBM Aşı Serisi: Bu seri için liyofilizasyon sonrasında yapılan 4 seri mikrotitrasyon testinde ortalama titre değeri $\text{Log } 10^{8.15}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$ ($\text{Log } 10^{7.9}$, $10^{8.1}$, $10^{8.3}$, $10^{8.3}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$) olarak belirlendi. Bunu takiben gerçekleştirilen hızlı raf ömrü çalışmalarında ise; yapılan 4 seri mikrotitrasyon testinde orta-

lama titre değeri $\text{Log } 10^{6.92}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$ ($\text{Log } 10^{6.8}$, $10^{6.8}$, $10^{7.1}$, $10^{7.0}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$) olarak belirlendi. Titre değerindeki düşüş ise, $\text{Log } 10^{1.23}$ olarak belirlendi.

A.3. LM Aşı Serisi: Bu seri için liyofilizasyon sonrasında yapılan 4 seri mikrotitrasyon testinde ortalama titre değeri $\text{Log } 10^{7.10}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$ ($\text{Log } 10^{7.0}$, $10^{7.2}$, $10^{7.1}$, $10^{7.1}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$) olarak belirlendi. Bunu takiben gerçekleştirilen hızlı raf ömrü çalışmalarında ise; yapılan 4 seri mikrotitrasyon testinde ortalama titre değeri $\text{Log } 10^{6.37}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$ ($\text{Log } 10^{6.8}$, $10^{6.8}$, $10^{7.1}$, $10^{7.0}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$) olarak belirlendi. Titre değerindeki düşüş ise, $\text{Log } 10^{0.73}$ olarak belirlendi.

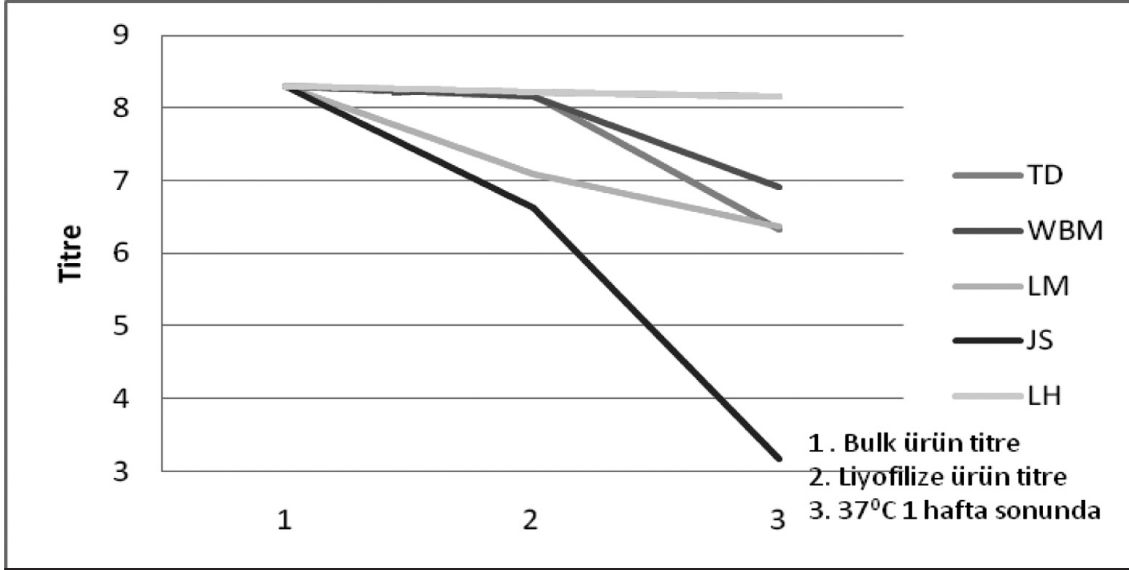
A.4. JS Aşı Serisi: Bu seri için liyofilizasyon sonrasında yapılan 4 seri mikrotitrasyon testinde ortalama titre değeri $\text{Log } 10^{6.62}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$ ($\text{Log } 10^{6.7}$, $10^{6.6}$, $10^{6.8}$, $10^{6.4}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$) olarak belirlendi. Bunu takiben gerçekleştirilen hızlı raf ömrü çalışmalarında ise; yapılan 4 seri mikrotitrasyon testinde ortalama titre değeri $\text{Log } 10^{3.17}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$ ($\text{Log } 10^{3.1}$, $10^{3.0}$, $10^{3.3}$, $10^{3.3}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$) olarak belirlendi. Titre değerindeki düşüş ise, $\text{Log } 10^{3.45}$ olarak belirlendi.

A.5. LH Aşı Serisi: Bu seri için liyofilizasyon sonrasında yapılan 4 seri mikrotitrasyon testinde ortalama titre değeri $\text{Log } 10^{8.22}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$ ($\text{Log } 10^{8.3}$, $10^{8.2}$, $10^{8.1}$, $10^{8.3}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$) olarak belirlendi. Bunu takiben gerçekleştirilen hızlı raf ömrü çalışmalarında ise; yapılan 4 seri mikrotitrasyon testinde ortalama titre değeri $\text{Log } 10^{8.15}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$ ($\text{Log } 10^{8.0}$, $10^{8.2}$, $10^{8.2}$, $10^{8.2}$ $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$) olarak belirlendi. Titre değerindeki düşüş ise, $\text{Log } 10^{0.07}$ olarak belirlendi.

Denemesi yapılan tüm aşı serilerinin hızlı raf ömrü çalışmalarında gösterdikleri performans Tablo 1 ve Şekil 3'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Denemesi yapılan aşı serilerinde Ham ürün, Liyofilize ürün ve hızlı raf ömrü çalışması sonunda elde edilen titre değişimleri.

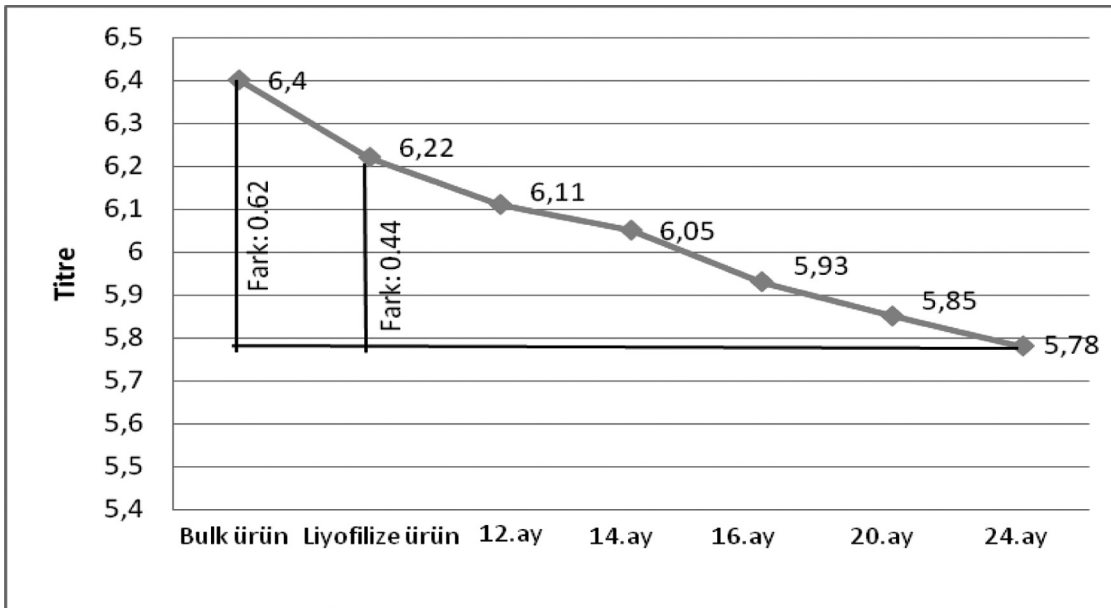
Aşı serileri	Ham ürün titre (Log_{10} $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$)	Liyofilize ürün titre (Log_{10} $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$)	37°C de 1 hafta sonunda titre (Log_{10} $\text{DKID}_{50}/\text{ml}$)
TD	8,3	8,17	6,32
WBM	8,3	8,15	6,92
LM	8,3	7,10	6,37
JS	8,3	6,62	3,17
LH	8,3	8,22	8,15



Şekil 3. Denemesi yapılan aşı serilerinin ham ürün aşamasında, liyofilize ürün formunda ve liyofilize ürünün 37°C de 1 hafta (hızlı raf ömrü çalışması) sonunda ortalama titreleri.

4°C’de gerçek zamanlı raf ömrü çalışması: Gerçek zamanlı raf ömrü çalışmalarına daha önceden başlanan LH aşı serisi için elde edilen final ürün 4°C’de depolandı ve 24 ay süresince belirli zaman aralıklarında örnek alınarak titrasyon testine tabi tutuldu. Üretilen ham aşının titresi $\text{Log } 10^{6.4}$ DKID₅₀/ml bulundu. LH ile liyofilizasyondan sonra ise bu titre $\text{Log } 10^{6.22}$ DKID₅₀/ml olarak tespit edildi. Bun-

dan sonra liyofilize ürün 4°C’de depolandı ve 12, 14, 16, 20 ve 24 üncü aylarda örnekler alınarak titrasyon testleri sonucunda liyofilize aşının zaman içerisindeki titreleri sırasıyla $\text{Log } 10^{6.11}$, $10^{6.05}$, $10^{5.93}$, $10^{5.85}$ ve $10^{5.78}$ DKID₅₀/ml olarak bulundu. LH aşı serisinin gerçek zamanlı raf ömrünün belirlenmesi sırasında elde edilen titre değerleri Şekil 4’de özetlenmiştir.



Şekil 4. LH aşı serisinin gerçek zamanlı raf ömrünün belirlenmesi sırasında zaman içerisinde elde edilen titre değerleri.

Zararsızlık, potens ve immünojenite: Gerçek zamanlı raf ömrü çalışması tamamlanan LH aşısı serisinin zararsızlık testlerinde aşının inokulasyonu yapılan fare ve kobaylarda 14 gün boyunca her hangi bir klinik bulgu gözlenmedi. Potens ve immünojenite çalışmalarında ise daha önce BT antibody ELISA testi ile negatif olduğu belirlenen 4 koyun (1 adedi kontrol olarak) kullanıldı. Aşısı uygulamasını takiben hayvanlarda hafif bir beden ısısı artışı (ilk 5 gün 0.3-0.5 derece) dışında herhangi bir klinik bulgu gözlenmedi. 28 gün boyunca gözlem altında tutulan hayvanlardan, süre sonunda kan alındı ve mavidil antikorları yönünden test edildi. Yapılan BT antibody ELISA testi sonucunda aşılama yapılan tüm hayvanlarda mavidil antikorları tespit edildi.

Tartışma ve Sonuç

Bu araştırmamızda Vero hücrelerinde 3 kez pasajı yapılarak Vero hücrelerine adaptasyonu sağlanan SA BT/4 attenüe virus suşu kullanılarak değişik stabilizatörlerle hazırlanan liyofilize atenüe mavidil aşılarının raf ömürleri incelendi.

Günümüzde, her ne kadar mavidil attenüe liyofilize aşılarının farklı stabilizatörlerle deneme çalışmaları fazla olmasa da, veteriner kullanımda olan liyofilize aşılardan gerek stabilitesini artırmak ve gerekse raf ömrünü uzatmak amacıyla değişik stabilizatörler araştırılmıştır (11, 16, 17).

Çalışmamızın ana hattını, değişik stabilizatörlerle (TD, WBM, JS, LM ve LH) hazırlanan mavidil serotip-4 aşılarının, gerek liyofilizasyon işlemi sırasında, gerekse liyofilizasyon işleminden sonra kalite kontrol testleri açısından ve daha sonra da raf ömrünün uzunluğu açısından değerlendirilmesi oluşturmıştır.

Denemesi yapılan aşısı serilerinin, liyofilizasyon işleminden sonra yapılan nem kontrollerinde, en fazla nem oranının TD, JS ve WBM (sırasıyla %8.87, %7.75, %7.01) aşısı serilerinde olduğu gözlemlendi (Şekil1). Sparkes ve Fenje (19), liyofilize aşılarda %6 ve üzerindeki oranındaki nem oranının aşının stabilitesi üzerine olumsuz etkisi olduğunu vurgulamışlardır. Nitekim TD, JS ve WBM kullanılan aşısı serilerinin hızlı raf ömrü çalışmalarında en büyük titre düşüşüne sahip oldukları (TD için Log $10^{1.85}$ DKID₅₀/ml, JS için Log $10^{3.45}$ DKID₅₀/ml ve WBM için Log $10^{1.23}$ DKID₅₀/ml) tespit edildi. Nem oranlarının yüksek olmasının sebebinin, kullanılan

stabilizatörlerde kuru madde oranının nispeten daha az olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Stabilizatör olarak LH ve LM kullanılan aşısı serilerinde nem oranının daha düşük olmasının (sırasıyla %3.37 ve %4.11) bunların hızlı raf ömrü çalışmalarında daha stabil olmalarını sağlamış olma olasılığı vardır. Yukarıda bahsedilenleri doğrular şekilde nem oranı en düşük olan (%3.37) LH aşısı serisi hızlı raf ömrü çalışmalarında en iyi performansı göstermiştir (Log $10^{0.07}$ DKID₅₀/ml).

Mariner ve ark. (10), LH, JS ve LGS gibi farklı stabilizatörlerle termostabil sığır vebası aşısı üretimini denemiş ve araştırma sonunda iyi bir performans gösteren LH stabilizatörü önermiştir. Benzer şekilde Sarkar ve ark. (18), PPR aşısı üretiminde LH, WBM, JS ve TD gibi farklı stabilizatörler denemiş, LH ve TD stabilizatörü uygun bulmuşlardır.

Çalışmada stabilize açısından uygun bulunduğu LH aşısı serisi gerçek raf ömrü çalışmalarına alındı. Bu çalışmalarda da iki senelik zaman aralığı içerisinde söz konusu aşısı serisinin enfektif titresinde Log $10^{0.44}$ DKID₅₀/ml oranı gibi hafif bir düşüş gözlemlendi.

Aynı zamanda hazırlanan bu aşının zararsızlık, potens ve immünojenite çalışmaları yapıldı. Bu testler sonucunda da kobay ve farelerde zararsız olduğu tespit edildi. Koyunlarda yapılan potens ve immünojenite çalışmalarında ise herhangi bir patojenite veya alerjik reaksiyon oluşturmadığı ve aşılama yapılan tüm hayvanlarda yeterliği bağışıklığı sağladığı ortaya konmuştur.

Araştırmamızın sonunda elde edilen bulgular ve diğer araştırmaların ışığında, attenüe Mavidil Serotip-4 liyofilize aşısının geleneksel stabilizatörü olan embriyo ekstraktı ve yumurta sarısının yerine, Lactalbumin hydrolysate %5 -sucrose %10 (LH) karışımından oluşturulmuş stabilizatörün güvenle kullanılabileceği ortaya konmuştur. Bu yeni stabilizatörle hazırlanan aşılardan da raf ömrünün 2 yıla kadar uzayabileceği tespit edilmiştir.

Bunun yanı sıra, bu stabilizatörün kullanılmasıyla; mavidil tip 4 aşısında kullanılan yumurta sarısı ve embriyo ekstraktının hazırlanması ve uygulanması zor olduğundan, aşısı üretim aşamalarında kontaminasyon riski ve buna bağlı ekonomik kayıpların azalacağı, buna bağlı olarak da üretimin daha güvenli, hızlı ve ekonomik olacağı kanısındayız.

Kaynaklar

1. Alexander RA, Haig DA, (1951). *The use of egg attenuated bluetongue virus in the production of a polyvalent vaccine for sheep*. Onderstepoort J Vet Res, 26, 3-15.
2. Anonim, *Bluetongue vaccine, method of producing same and method of immunizing ruminants therewith*. Erişim adresi: <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?IA=US1983000052&DISPLAY=DESC>, Erişim tarihi: 03.03.2011
3. Anonim, *European Commission Health Consumer Protection Directorate General (Sanco/C3/AH/R19/2000) Possible use of vaccination against Bluetongue in Europe*. Scientific Committee on animal health and animal welfare. Adopted 27 June 2000.
4. Bréard E, Sailleau C, Coupier H, Mure-Ravaud K, Hammoumi S, Gicquel B, Hamblin C, Dubourget P, Zientara S, (2003). *Comparison of genome segments 2, 7 and 10 of bluetongue viruses serotype 2 for differentiation between field isolates and the vaccine strain*. Vet Res. 34, 777-789.
5. Erasmus BJ, (1990). *Bluetongue virus*. Dinter Z, Morein B. eds. *Virus Infections of Ruminants*. Elsevier Science Publishers. Chapter 21, p. 227-237.
6. Ertürk A, Tatar N, Kabaklı O, İncöğlü S, Çizmeçi SG, Barut FM, (2004). *The current situation of bluetongue in Turkey*. Vet Ital. 40 (3), 137-140.
7. Hammoumi S, Breard E, Sailleau C, Russo P, Grillet C, Cetre-Sossah C, Albina E, Sanchis R, Pepin M, Guibert J, Zientara S, (2003). *Studies on the Safety and Immunogenicity of the South African Bluetongue Virus Serotype 2 Monovalent Vaccine: Specific Detection of the Vaccine Strain Genome by RT-PCR*. J Vet Med. 50, 316-21.
8. Kirkland PD, Hawkes RA, (2004). *A comparison of laboratory and wild strains of bluetongue virus- is there any difference and dose it matter?* Vet Ital. 40 (4), 448-455.
9. Mann N, Mann S, Singh KP, Samuel AR, Mertens P, (2004). *Development of reverse transcriptase-polymerase chain reaction-based assays and sequencing for typing European strains of bluetongue virus and differential diagnosis of field and vaccine strains*. Vet Ital. 40 (4), 552-561.
10. Mellor PS, Wittmann EJ, (2002). *Bluetongue virus in the mediterranean basin 1998-2001*. Vet J. 164(1), 20-37.
11. Mariner JC, House AE, Sollod C, Mebus CA, (1990). *Comparison of the effect of various stabilizers and lyophilization cycles on the thermostability of a Vero Cell-adapted rinderpest vaccine*. Vet Microbiol. 21(3), 195-209.
12. Monaco F, Camma C, Serini, Savini G, (2006). *Differentiation between field and vaccine strain of bluetongue virus serotype 16*. Vet Microb. 166, 45-52.
13. Murphy FA, Gibbs JEP, Horzineck CM, Studdent MJ, eds., (1999). *Veterinary Virology*. Third Edition. Raven Press Ltd. New York.
14. Murray PK, Eaton BT, (1996). *Vaccines for bluetongue*. Aust Vet J. 73(6), 207-210.
15. OIE, (2000). *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines Bluetongue*. Erişim adresi: http://www.oie.int/norms.MMANUAL/A_00026.htm. Erişim tarihi: 03.03.2011.
16. Ozawa Y, Bahrami S, (1968). *Effects of Freezing on African Horse Sickness Virus*. Arc Virol. 26(2), 201-210.
17. Rashid A, Asim M, Chaudhary H, (2008). *Effect of various stabilizers on titre of lyophilized live-attenuated Peste Des Petits Ruminants (PPR) vaccine*. Pakistan Vet J. 28(4), 203-204.
18. Sarkar J, Sareenivasa BP, Singh RP, Dhar P, Bandyopadhyay SK, (2003). *Comparative efficiency of various chemical stabilizers on the thermostability of a live-attenuated Peste de Petits Ruminants (PPR) vaccine*. 21, 4728-4735.
19. Sparkes JD, Fenje P, (1972). *The effect of residual moisture in lyophilized smallpox vaccine on its stability at different temperatures*. Bull World Health Organ. 46 (6), 729-734.
20. Wittmann E, Mellr P, Baylis M, (2001). *Using climate data to map the potential distribution of Culicoides imicola (Diptera: Ceratopogonidae) in Europe*. Rev Sci Tech. 20 (3): 731-740.
21. Yonguç AD, Taylor WP, Csontos L, Worrall E, (1982). *Bluetongue in Western Turkey*. Vet Rec Aug. 111, 144-146.