

Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi

<http://e-dergi.atauni.edu.tr/index.php/VBD>



Günümüzde Biyoteknolojik Bakteriyel Aşılar

Özlem BÜYÜKTANIR¹

1. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun

ÖZET: Aşılama enfeksiyon hastalıklardan korunmak için en önemli ve maliyeti düşük yöntemlerden biridir. İnaktif ve atenüe aşılar, ekonomik öneme sahip hayvancılık sektörüne özgü ve zoonotik enfeksiyonlarla mücadelede etkin araçlardır. Ancak, moleküler biyoloji ve immunolojide gerçekleştirilen gelişmelere bağlı olarak daha etkin ve güvenilir aşıların geliştirilmesine yönelik önemli çalışmalar yapılmakta ve yeni teknolojilere dayalı ürünler ticari kullanıma sunulmaktadır. Bu çerçevede, son yıllarda geliştirilen biyoteknolojik aşılar; natif ve rekombinant protein subunit, DNA ve vektör aşılarıdır. Subunit aşıların koruyucu immun yanıtı etkin uyarabilmesi için diğer inaktif aşılar gibi uygun adjuvantlara ihtiyaç duyulmakta ve birden fazla immunojenden oluşan çok komponentli aşıların kullanımı önerilmektedir. DNA aşıları daha güçlü hücresel immun yanıt oluşturmada ve genel olarak adjuvant ilavesi olmaksızın kullanılabilir. Rekombinant subunit, DNA ve vektör aşıları etkindir ve daha az yan etkilidir, ayrıca marker olarak kullanım potansiyeline sahiptir. Marker aşıların en önemli yararları kontrol-eradikasyon programlarında aşı ve enfekte hayvanların ayırımı sağlayabilmeleridir. Özellikle, endemik seyreden enfeksiyonlarla mücadelede yeni teknolojilere dayalı koruyucu antijenler ve aşılar ile adjuvantlar günümüz ve gelecek on yılın en önemli bilimsel, teknolojik ve ekonomik faaliyet alanlarından birini oluşturmaktadır. Bu çerçevede, yeni teknolojilere dayalı etkin, güvenilir, kolay uygulanabilir ve düşük maliyetli aşı geliştirme ve üretim çalışmaları veteriner hekimlik ve halk sağlığı açısından büyük öneme sahiptir.


Anahtar kelimeler: Bakteriyel aşılar, DNA aşı, marker aşı, subunit aşı, vektör aşı

Current Biotechnological Bacterial Vaccines

ABSTRACT: Vaccination is one of the most important and cost-effective methods used for prevention from the infectious diseases. Inactivated and live-attenuated commercial vaccines are efficient tools to combat infections specific to both the industry of animal husbandry having a financial importance and the zoonotic diseases. However recently, important investigations for the development of more effective and safe vaccines due to the progress in molecular biology and immunology have been performed and products based on the new technologies are presented to the commercial use. In this frame, biotechnological vaccines developed in the last years are native and recombinant protein subunit, DNA and vector vaccines. Subunit vaccines like the other inactivated ones require appropriate adjuvants for efficient induction of the protective immune response and multi-component vaccines consisting of more than one immunogens are recommended. DNA vaccines induce stronger cell-mediated immune response and generally can be used without adjuvant addition. Recombinant subunit, DNA and vector vaccines are efficient with low reactogenicity and have the potential of being used as marker. The most important benefits of the marker vaccines are their ability to insure discrimination of the vaccinated and infected animals in control-eradication programmes. In particular, protective antigens, vaccines and adjuvants based on the new technologies to combat endemic infections constitute one of the most important scientific, technological and economical scopes of today and future decades. In this sense, vaccine development and production activities of efficient, safe, easily applicable and cost-effective vaccines are very important for both veterinary medicine and public health.

Key words: Bacterial vaccines, DNA vaccine, Marker vaccine, Subunit vaccine, Vector vaccine.

 Sorumlu yazar / Corresponding author;

 0533 6339073,

 ozlemb@omu.edu.tr

GİRİŞ

Aşılar insan ve hayvanlarda infeksiyon hastalıklarının kontrolünde ve koruyucu hekimlikte önemli role sahiptir. Aşılama ilk olarak 18. yüzyılda Edward Jenner'ın çiçek aşısını keşfi ile başlamıştır (Shams, 2005; Tollis, 2006; Meeusen ve ark., 2007). İnsanlarda çiçek hastalığının eradike edilmiş olması, infeksiyon hastalıklara karşı mücadelede aşılamanın önemini göstermektedir (Shams, 2005). Aynı doğrultuda, hayvan hastalıklarının kontrolü ve eradikasyonunu hedefleyen veteriner aşilar yalnız hayvan sağlığı açısından değil aynı zamanda zoonotik infeksiyon hastalıklarla mücadele bakımından da halk sağlığını doğrudan ilgilendiren öneme sahiptir (Shams, 2005; Tollis 2006).

Veteriner aşiların kuvvetli ve uzun süreli bağışıklık sağlayabilen, güvenilir, biyolojik kararlılığa sahip, en az yan etkili, ucuz ve kolay uygulanabilir özellikte olmaları tercih edilir (Shams, 2005). Sürü hayvancılığında aşılamanın temel amacı bireysel bağışıklıktan çok popülasyondaki bağışıklığı artırmaktır ve aşı etkinlikleri sürü bağışıklığı ile ölçülür. Sürülerdeki bağışıklık oranının yüksekliği infeksiyonun yayılma hızını azaltır. Evcil hayvan aşilarında, insan aşilarında olduğu gibi bireysel hayvan sağlığı ön plandadır (Shams, 2005; Meeusen ve ark., 2007). Maksimum düzeyde koruyuculuğun sağlanması için uygun aşiların ve bağışıklama protokollerinin seçilmesi önemlidir.

Günümüzde dünya çapında hayvancılıkta kullanılan aşiların çoğu inaktif veya atenüe aşilarıdır (OIE, 2009). Uzun yıllardan beri kullanılan bu aşilar, yaygın infeksiyon hastalıklarla mücadelede hayvan ve insan sağlığı açısından önemli katkılar sağlamıştır. Atenüe aşilarla karşılaştırıldıklarında, inaktif bakterin aşilar (tüm hücre aşısı) saha koşullarında kararlı, düşük maliyetli ve çoğunlukla güvenli olmalarına karşın daha az etkindir ve kısa süreli bağışıklık sağlarlar. Zayıf immunojeniteye sahip olmaları, koruyucu bağışıklığın oluşumunda adjuvant ve rapel doz uygulamasını gerekli kılmaktadır (Perrie ve ark., 2008). Ayrıca, rapel gerektiren aşilar hayvanlarda stres etkisi yaratmakta

ve verim düşüklüğüne neden olmaktadır. Bu tür aşiları endotoksinler (lipopolisakaritler vb) gibi istenmeyen komponentlere bağlı olarak da yan etkiler oluşabilmektedir. Toksoid aşilar humoral immunitiyi uyarmasına karşın hücresele immunitiyi çok az uyarmakta veya hiç uyarılmamaktadır (Shams, 2005). Atenüe aşilar ise, genel olarak güçlü humoral ve hücresele immun yanıt uyarılmakla birlikte patojen özellikleri yeniden kazanma ve immun yetmezliği olan hayvanlarda doğrudan patojen etki gösterme riski taşımaktadır.

Son yıllarda, moleküler biyoloji, immünoloji ve biyoteknolojide gerçekleştirilen ilerlemeler, daha etkin, güvenilir ve yüksek kalitede aşiların geliştirilmesini sağlamıştır. Yeni bağışıklama stratejileri ve aşı formülasyonları geliştirilmesi aşiların immünojenik özelliklerini artırmayı amaçlamaktadır. Son yıllarda natif (doğal) veya rekombinant antijenlere dayalı subunit aşilar, DNA aşiları, bakteriyel ve viral vektör aşilar ile aşı ve infekte hayvanların ayırımını yapabilmeye yönelik marker aşiların geliştirilmesi ön planda yer almaktadır. Bakteriyel infeksiyonlarla mücadele amaçlı olarak son yıllarda geliştirilen aşı ve aşılama stratejileri ile aşı etkinliklerini arttırmaya yönelik yeni tip adjuvantlar bu makalenin genel çerçevesini oluşturmaktadır.

NATİF VE REKOMBİNANT SUBUNIT AŞILAR

Bir patojene ait çok sayıda antijen bulunmasına karşın bunların ancak bir kısmı koruyucu immun yanıt oluşturma (bağışıklayıcı) özelliğine sahiptir. Aşı antijenlerinin seçiminde ilk ve en kritik basamak, infeksiyon etkenlerinin yapısal ve biyolojik açıdan korunmuş (conserved) ve koruyucu özelliklere sahip antijenlerinin belirlenmesidir. Koruyucu antijen özelliklerinin belirlenmesinde, poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE), Western blot, amino asit ve gen dizi analizleri ile in vivo deneysel immünolojik çalışmalar yaygın olarak kullanılmaktadır (Henderson, 2005). Bu tür immünolojik tekniklerle belirlenen potansiyel aşı antijenlerinin mümkün olan en yüksek saflıkta elde edilmeleri kritik bir basamağı oluşturur. Bu

doğrultuda, natif veya rekombinant antijenlerin saflaştırılmaları amacıyla farklı ekstraksiyon işlemlerini (ısı, kimyasal, sonikasyon, mekanik gibi) takiben jel filtrasyon, iyon değişim, affinite, immunoaffinite gibi kromatografik ayırıştırma teknikleri kullanılmaktadır (Liljeqvist ve Stahl, 1999, Al-Mariri ve ark., 2001, Özcengiz ve ark., 2004, Vanniasinkam ve ark., 2005). Söz konusu tekniklerle saflaştırılan antijenik moleküllerin saflık kontrolleri 1 ve 2 boyutlu elektroforez (1-2D PAGE) ve Western blot gibi tekniklerle yapılmaktadır.

Saf olarak elde edilen koruyucu özellikli natif veya rekombinant antijenlere dayalı subunit aşılarda klasik aşılara göre bazı önemli avantajlara sahiptir: Bu tür aşılarda, i) koruyucu yanıt oluşturmeyen farklı antijenik moleküller içermemeleri nedeniyle immun yanıtın yalnız koruyucu nitelikli saf antijenlere yönlendirilmesini, ii) aşı içeriklerinin bağışıklığı baskılayıcı veya zararlı yan etkiler oluşturan komponentlerden arı olmasını, iii) standart antijen üretiminin güvence altına alınmasını ve iv) aşı etkinliğinin takibine yönelik spesifik tanı testlerinin geliştirilmesini sağlamaktadır. Bu avantajlara karşılık subunit aşılarda özellikle atenue aşılara göre dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlar arasında, in vivo replikasyon ve kolonizasyon kabiliyetinde olmadıkları için genel ve lokal immun yanıt ile sitotoksik T hücre yanıtını daha sınırlı ölçüde uyarması sayılabilir (Henderson, 2005). Ayrıca, sınırlı sayıda antijen içermesi nedeniyle uzun süreli ve antijenik varyasyonlar gösteren infeksiyon etkenlerine karşı etkin koruyuculuk sağlayamama riski taşırlar. Bu nedenle birden fazla koruyucu antijenden veya çok tekrarlı antijenik determinant içeren natif ve rekombinant moleküllerden hazırlanan subunit aşılarda, humoral ve hücrel immun yanıtı daha etkili olarak uyardıkları için tercih sebebi olmaktadır. Natif ve rekombinant antijenlerle hazırlanan subunit aşılarda yanında, sentetik peptid bazlı subunit aşılarda da son yıllarda önem kazanmıştır. Sentetik peptid üretiminde hayvan orijinli hiçbir içerik kullanılmadığı için zararsızlık açısından önemli bir avantaj ortaya çıkmaktadır (Liljeqvist ve Stahl, 1999).

Farklı patojenlere karşı koruyucu bağışıklığı uyarma düzeyleri laboratuvar hayvanı deneylerinde ve doğal konakçılarda gösterilen çok sayıda prototip aşı olmasına karşın, günümüzde yaygın olarak kullanılan az sayıda subunit aşı örneği vardır. *Haemophilus influenzae* tip B (Hib) konjuge aşı, hücresiz boğmaca ve yüzey antijenine (HBsAg) dayalı hepatit B aşılarda en çok bilinenlerdir (Guris ve ark., 1997; Lucas ve Reason, 1999; Koff, 2002).

Natif subunit aşılarda üretiminde hedef mikroorganizmanın geniş hacim kültürünün yapılması ve riskten arındırılmamış bir yöntem olması nedeniyle, rekombinant DNA teknolojisine dayalı aşı antijenleri üretimi ön plana çıkmaktadır. Günümüzde, aşı antijeni adayları rekombinant proteinler üzerine araştırmalar çok yaygınlaşmıştır. Rekombinant subunit aşının üretiminde temel prensip, subunit antijeni kodlayan genin ekspresyon vektörlerine klonlanması ve devamında patojen özellikte olmayan bakteri, maya veya memeli hücrelere aktararak bu hücrelerde yüksek miktarlarda sentezlenmesini sağlamaktır (Liljeqvist ve Stahl, 1999). Rekombinant antijenler her üretimde aynı standartta elde edilmesine karşın, mikroorganizmaların farklı parti (batch) ve pasajlarında oluşabilecek varyasyonlar veya mutasyonlardan dolayı natif antijen standardizasyonu sağlanamamaktadır.

İlk rekombinant subunit aşı *Saccharomyces cerevisiae*'da üretilen rekombinant Hepatit B virus yüzey antijeni aşısıdır ve beşeri hekimlikte yaklaşık olarak son 20 yıldan beri başarıyla kullanılmaktadır (Valenzuela ve ark., 1982). Veteriner hekimlikte subunit aşı kullanımı ise henüz çok yenidir. Domuz bulaşıcı plöropnömonisine neden olan *Actinobacillus pleuropneumonia*'ya karşı biri natif protein diğeri ise rekombinant protein tabiatlı antijen birleşimi ile geliştirilen subunit aşının tüm serotiplere karşı belli oranda çapraz koruma sağladığı belirtilmektedir (Meeusen ve ark., 2007). Klamidyal rekombinant antijenlerden maltozu bağlayan major dış membran proteini (MOMP), ribonükleotid redüktaz kısa zincir proteini (NrdB) ve TC0512 dış membran proteininden (Omp85) oluşan

kombine aşının koallalarda Chlamydia'ya spesifik hücresel yanıt ve IgG antikor yanıtı oluşturduğu bildirilmiştir (Carey ve ark., 2010).

Rekombinant L7/L12 ribozomal proteinin farelerde *Brucella abortus* enfeksiyonuna karşı (Oliveira ve Splitter, 1996) ve *Brucella melitensis*'e ait rekombinant bp26 periplazmik protein ve trigger faktör (tF) proteinleri ile immunize edilen farelerde koruyucu immun yanıt oluşturulduğu belirlenmiştir (Yang ve ark., 2007). Humoral yanıtın düşük düzeyde kalmasına rağmen, dış membran proteinlerinden Omp31 rekombinant proteini ile bağışıklanan farelerde CD8⁺ T hücre yanıtının yüksek düzeyde uyarıldığı ve farelerin *B. melitensis* ve *B. ovis* enfeksiyonuna karşı korunduğu tespit edilmiştir (Cassataro ve ark., 2005). Benzer şekilde, rekombinant P39 proteini CpG oligodeoksinükleotid adjuvant ile birlikte uygulandığında farelerde hücresel ve antikor yanıtın uyarıldığı ve virulent *Brucella melitensis* suşuna karşı kısmi koruma sağlandığı bildirilmektedir (Al-Mariri ve ark., 2001)

DNA AŞILARI

DNA aşılı, memeli hücre promotörü ve koruyucu antijen kodlayan genleri içeren rekombinant bakteri plazmidlerinin memeli hücrelere integrasyonu esasına dayanır. Konak hücrelere integre olan plazmidler yapısal memeli promotörler marifetiyle klonlanan kodlayıcı genin "in situ" ekspresyonunu sağlarlar (Henderson, 2005). Sınıf I ve II antijen işleme yolu ile immun sisteme sunulan hedef antijenler CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre yanıtını uyarır. Bu mekanizma sayesinde, DNA aşılı hem humoral hem de hücresel yanıtın gelişmesine yol açar (Gurunathan ve ark, 2000, Dunham, 2002). İmmun sistemi yönlendirmesi istenen sitokinleri daha aktif kılmak amacıyla hazırlanan DNA aşılı, hedef sitokin ve antijenleri kodlayan genlerin aynı ekspresyon plazmidlerine klonlanması ile daha güçlü ve uygun immun yanıt tipini uyarıcı özellik taşımaktadır (Henderson, 2005).

DNA aşılı çok karardır ve aşılının taşınması sırasında soğuk zincire gerek duyulmaz. Bu

avantajlara ek olarak, DNA aşılı antijen ekspresyonu ve immun yanıtın devamlı uyarılmasını sağlayarak koruyucu bağışıklığın uzun süreli olmasına yol açar. Ayrıca, özellikle yeni doğmuş hayvanlarda maternal antikorların nötralizan etkilerine maruz kalmaksızın koruyucu yanıtın hızlı gelişimi de sağlanabilmektedir (Dunham, 2002; Gurunathan ve ark., 2002; Henderson 2005; Dhama ve ark, 2008). Metillenmemiş sitozin-fosfat-guanosin (CpG) dinükleotid dizileri içeren rekombinant plazmidlere dayalı DNA aşılı geliştirilerek immunojenik kapasitesi yüksek aşılarda elde edilmektedir. Güçlü adjuvant özellikte olan CpG-oligodeoksinükleotidler, immun sistemin temel komponentleri olan monositler/makrofajlar, dendritik hücreler ile B ve T hücrelerini doğrudan uyararak doğal bağışıklık mekanizmasını da işlevsel hale getirmektedir (Dunham, 2002; Gurunathan ve ark., 2002; Dhama ve ark., 2008). Bu çerçevede, *Listeria* immunodominant antijenlerinden listeriolizin ve p60 antijenlerini kodlayan genler ile immunostimülatör CpG oligodeoksinükleotidleri içeren DNA aşılının farelerde etkin koruyucu bağışıklık kazandırdığı gösterilmiştir (Fensterle ve ark., 1999).

Dünyada ve ülkemizde de bir çok bölgede endemik olarak seyreden Brusellozis'e karşı etkili korunma sağlamaya yönelik DNA aşılı geliştirme faaliyetleri son yıllarda hız kazanmıştır. Farelere kas içi olarak uygulanan L7/L12 geni ile *Brucella abortus* Cu, Zn süperoksid dismutaz (SOD) antijenini kodlayan geni içeren DNA aşılının spesifik antikor ve hücresel yanıtı uyarıldığı belirtilmiştir (Kurar ve Splitter, 1997; Onate ve ark, 2003). L7/L12, süperoksid dismutaz ve BCSP31 antijenlerini kodlayan genlerden oluşturulan kombine DNA aşılının farelerde yüksek düzeyde IgG antikor ve T hücre yanıtı ile *B. abortus*'a karşı koruyucu yanıt oluşturduğu eprüvasyonla gösterilmiştir (Yu ve ark., 2007). *Brucella melitensis* periplazmik proteini bp26 ve trigger faktörü (tF) kodlayan genlere dayalı DNA aşılının farelerde önemli düzeyde koruma sağladığı kanıtlanmıştır (Yang ve ark., 2005).

Staphylococcus aureus clumping faktör A (ClfA) gen bazlı hazırlanan DNA aşısının sığırlarda stafilokokal mastitise, ısı şoku proteini antijenini (HSP-65) eksprese eden DNA aşısının paratuberküloza karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (Nour El-Din ve ark., 2006; Sechi ve ark., 2006). *Rhodococcus equi* VapA virulens proteinini kodlayan DNA aşısının taylarda spesifik IgG antikor ve Th1 immun yanıtı uyardığı saptanmıştır (Vanniasinkam ve ark., 2005). *Mycoplasma hyopneumoniae*'nin neden olduğu domuz enzootik pnömonisine karşı P97 adhezini tekrarlanan bölgesini içeren DNA aşısının farelerde immunojen olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark., 2006). *Bacillus anthracis* PA83 koruyucu antijenini kodlayan gene dayalı DNA aşısı geliştirilmiş ve aşı uygulanan koyunlarda anti-PA83 antikor titrelerinin rekombinant protein aşılarına kıyasla daha uzun süre yüksek kaldığı gösterilmiştir (Hahn ve ark., 2006).

MARKER AŞILAR

Etkili kontrol ve eradikasyon programlarında kullanıma yönelik Marker aşı geliştirme çabaları son yıllarda yoğunluk kazanmaktadır. Marker aşılar, aşılama sonucu oluşan antikor yanıtı ile saha suşlarının neden olduğu enfeksiyon kaynaklı antikor yanıtının ayırımı sağlayabilen aşılardır (Henderson, 2005). Klasik olarak atenüe aşıların çoğu in vitro kültür ortamlarında ve hayvanlarda pasajlama yoluyla apatojen hale dönüştürülen ve bir diğer kısmı ise doğal koşullarda kendiliğinden apatojen forma dönüşmüş mikroorganizmalara dayanmaktadır. Örneğin, sığır brusellozu ile mücadelede uzun yıllardan beri kullanılan *Brucella abortus* S19 aşısı doğal atenüe bakteri aşısıdır. S19 atenüe aşısı ile bağışıklanmış sığırlarda aşı veya enfeksiyon kaynaklı anti-*Brucella* antikorlar düzeyinde ayırım yapılamamasına karşın, klasik bakteriyolojik veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleriyle saha ve aşı suşu ayırımı yapılabilmektedir. Bu ayırım, PCR yöntemiyle *eryC-D* genlerinde 702 baz çiftlik delesyonun S19 aşı suşunda varolduğunun, fakat yaban tip saha

suşlarında bulunmadığının gösterilmesine dayanmaktadır (Sangari ve ark., 1994). Diğer bir örnek ise rifampisin dirençli R koloni mutanlığı *B. abortus* RB51 suşu orijinli atenüe aşısıdır. RB51 suşu lipopolisakkaritin (LPS) O zinciri minimal düzeyde sentezlenebildiğinden RB51 ile aşılanmış hayvanlarda immunodominant özellikteki bu polimerik yapıya karşı antikor yanıtı minimal veya saptanamayacak düzeydedir (Schurig ve ark., 2002). Oysa ki, yaban tip saha suşları ile enfekte hayvanların hemen hepsi yüksek düzeyde anti-LPS antikor yanıtı vermektedir. Bu nedenle, LPS'ye dayalı anti-*Brucella* antikor tespiti ile enfeksiyon kaynaklı antikor yanıtı saptanabilmektedir.

Genetik mühendisliği kaynaklı marker bakteriyel aşılar henüz pazarda bulunmamasına karşın veteriner alanda yaygın olarak kullanılan rekombinant marker viral aşılar bulunmaktadır. Sığır herpesvirus 1 (BHV1) yapısal gE glikoproteinini kodlayan genin delesyonuyla geliştirilmiş IBR (Strube ve ark., 1996), kanarya çiçeği-vektörlü köpek distemper, tavuk çiçeği vektörlü Newcastle ve vaccinia vektörlü kuduz aşıları bunlara örnek olarak verilebilir (Henderson 2005). Yakın zamanda, *B. melitensis* Rev-1 aşı suşunda *bp26* ve *omp31* genleri delesyonu yapılarak marker Rev-1 aşı suşu elde edilmiştir. Bu suş ile immunize edilen koyunlarda korunma sağlanabildiği ve BP26 ve Omp31 antijenlerine dayalı immunolojik testler ile aşı ve enfekte hayvanların ayırımının yapılabilmesinin mümkün olduğu gösterilmiştir (Clockaert ve ark., 2004; Jacques ve ark., 2007). Sonuç olarak, doğal veya genetik olarak modifiye edilmiş atenüe marker aşılar, atenüe aşıların sahip olduğu bağışıklama avantajlarını korurken, eradikasyon programlarının etkin kılınmasına da olanak sağlamaktadır (Henderson, 2005).

CANLI VEKTÖR AŞILAR

Canlı rekombinant vektör aşılar, farklı bir mikroorganizmaya ait bir veya birden fazla koruyucu gen eksprese edebilen apatojen veya genetik olarak modifiye edilmiş mikroorganizmalardan

oluşmaktadır. Bu vektörlerin orijinal virulent suş dönüşme riski yoktur ve aşırı duyarlı hayvanlarda bile patojen etki göstermemektedirler. Bu nedenlerle güvenirlikleri yüksektir ve replike olabilmek özelliklerini kaybetmemiş olmaları nedeniyle de humoral ve hücresele yanıtı uzun süreli uyararak etkin koruyucu bağışıklık sağlarlar. Bu aşılarda diğere bir avantajı ise maternal antikolar ile nötralize edilmemeleridir (Capozzo ve ark., 2004; Henderson, 2005). Rekombinant BCG aşısı suşu ve genetik olarak modifiye mutant *Salmonella* Typhi ve Typhimurium suşları bakteriyel canlı vektör aşılarda olarak *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium tetani* infeksiyonlarına karşı bağışıklama amaçlı kullanılmıştır (Nayak ve ark., 1998; Grode ve ark., 2002; Capozzo ve ark., 2004). *L. monocytogenes* p60 antijenini kodlayan genin salgılanan veya bakteri membranı yüzeyinde ekspresyonuna imkan veren BCG vektör aşısının farelerde listerioza karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (Grode ve ark., 2002). *Streptococcus pneumoniae* yüzey protein A (PspA) antijenik molekülünü kodlayan genin integre edildiği rekombinant avirulent *Salmonella* Typhimurium aşısı ile oral yolla immunize edilen farelerin virulent *S. pneumoniae* suşlarına bağışık oldukları belirlenmiştir (Nayak ve ark., 1998). Vaccinia ve herpes virüsleri de canlı aşısı vektörleri olarak kullanılmaktadır. Ankara suşu yüksek düzey atenue olmuş aşısı suşu olup immun yeterli ve yetersiz hayvanlarda replike olamamaktadır. Buna karşın, Ankara suşunun yaban tip suşlara kıyasla aynı düzeyde rekombinant protein ekspresyonu gerçekleştirme özelliğini kaybetmediği belirlenmiştir (Sutter ve Moss, 1992). Bu nedenle, Ankara suşu yüksek düzey güvenilir canlı vektör aşısı olarak kullanılabilir. Bu doğrultuda, Hepatit B, influenza, herpes simplex, kuduz ve şap hastalığı virüsleri hedef genleri vaccinia virusu integre edilerek canlı vektör aşılarda elde edilmiştir. Canlı rekombinant vektör organizmalar için potansiyel riskler, doku veya konak tropizminin ve virulensin değişmesi, yaban tip suşları ile rekombinasyonu ve çevreye yayılmasıdır. Ayrıca, bu vektörlere yabancı bir genin entegre olmasıyla vektörün biyolojik

özelliklerinin değişme riski de bulunmaktadır (Henderson, 2005)

ADJUVANTLAR

Adjuvantlar bir antijene karşı non-spesifik immun yanıt oluşumunu sağlayan maddeler ve formülasyonlardır. Adjuvantların sahip olması gereken özellikler, zayıf antijenlerin immunojenitesi ile immun yanıtın hızını ve süresini artırmaları, yalnızca minimal lokal ve sistemik yan etkilere neden olmaları, stabilite ve üretim kolaylığı ile çok çeşitli aşılara uygulanabilir olmalarıdır (Shams, 2005). Adjuvantların etkili olabilmeleri, organizmanın doğal savunma sistemine ait antijen sunan hücreler (dendritik hücreler ve makrofajlar) ile T ve B lenfositlerini uyarabilme özelliklerine bağlıdır (Perrie ve ark., 2008). Adjuvantlar etki mekanizmalarına göre iki sınıfa ayrılır: aşısı salınım sistemleri ve immunostimulatör adjuvantlar. Aşısı salınım sistemleri genel olarak partikül özellikli adjuvantlardır; emulsiyonlar, mikropartiküller, ISCOMS ve lipozomlar gibi. İmmunostimulatör adjuvantlar ise, lipopolisakkarit (LPS), monofosforil lipid A (MLA), sitokinler, saponinler (Quil A) ve CpG gibi çeşitli tabiatlı moleküllerdir (Singh ve O'Hagan, 2003; Shams, 2005)

Veteriner alanda yaygın olarak kullanılan alüminyum hidroksit ve alüminyum fosfat ile mineral yağ emulsiyon adjuvantları partiküllü antijen salınım sistemleridir (Barnett ve ark., 1996; Lindblad, 2004). Biyolojik olarak degrade olabilmek özelliğinde olan polyeşterler ve polilaktid-ko-glikolid tabiatlı mikropartiküller, içlerine hapsedilen antijenlerin yavaş salınımlarını sağlayarak adjuvant etki gösterirler (Eldridge ve ark., 1991; O'Hagan ve ark., 2001). İmmunostimulatör adjuvantlardan son yıllarda üzerinde en fazla çalışma yapılan metillenmemiş CpG oligodinükleotidler spesifik olarak dendritik hücreler veya makrofajların Toll-like reseptörlerine bağlanarak sitokin ekspresyonunu uyarırlar. Eksprese edilen sitokinler uygun transkripsiyon faktörlerini aktive ederek Th hücre farklılaşmasının yönünü belirleyerek immun yanıtın humoral veya hücresele ağırlık kazanmasına yol

açarlar (O'Hagan ve ark., 2001, Dunham, 2002; Dhama ve ark., 2008, Bae ve ark., 2009).

SONUÇ

İnfeksiyon hastalıklar yalnız veteriner hekimlik ve hayvancılık sektörünü değil aynı zamanda zoonotik infeksiyonlar nedeniyle halk sağlığını da doğrudan ilgilendirmektedir. Ekonomik önemi de göz önüne alındığında, hayvanların bakteri kökenli infeksiyon hastalıklarıyla mücadelede en etkin korunma önlemlerinin başında aşılama gelmektedir. Uzun yıllardan beri oldukça başarılı sonuçlar veren aşılar genel olarak toksoid veya inaktif ve atenüe bakteri aşılardır. İnaktif ve toksoid aşılardan koruyucu etkileri sınırlı veya kısa süreli olduğundan belirli zaman aralıklarıyla rapel aşılama ihtiyacı vardır. Koruyucu immün yanıtı daha iyi uyarmalarına karşın, atenüe aşılardan çevreye yayılma ve apatojen aşı suşunun yeniden patojen özelliğini kazanma riski bulunmaktadır. Söz konusu riskleri taşımayan, tekrarlanan aşılamalara ihtiyaç duyurmayan ve yan etkilerden arı yeni tip aşı modelleri geliştirme faaliyetleri son yıllarda önem kazanmıştır.

Günümüz bilimsel kazanımlarının aşı teknolojilerine yansımaları sonucunda son yıllarda çeşitli yeni aşı modelleri hayata geçirilmeye başlanmıştır. Yenilikçi nitelikli olan bu modeller aşağıda belirtilen bilimsel-teknolojik birikimler temelinde geliştirilmiştir: i) koruyucu özellikli immunojenik moleküllerin belirlenmesi, ii) bu moleküllerin rekombinant antijenler olarak üretilmesi, iii) son yıllarda geliştirilen saflaştırma teknikleriyle immunojenik natif veya rekombinant antijenlerin yüksek saflıkta eldesi, iv) virulens faktörleri kodlayan genlerin moleküler biyolojik yöntemlerle iptali ile geri dönüşüm riski taşımayan apatojen ve immunojen atenüe aşı suşlarının eldesi, v) geri dönüşüm riski taşımayan bazı atenüe mikroorganizmalara heterojen gen transferleri ile vektör aşı suşlarının geliştirilmesi, vi) immunojenik molekülleri kodlayan rekombinant ekspresyon vektörlerine dayalı DNA aşılardan ve bunlara ek olarak, bağışıklama etkinliğini arttıran

immunostimülatör ve immunomodülatör özellikli yeni tip adjuvantların geliştirilmesi.

Bilgi çağı olarak adlandırılan 21. yüzyılda sürdürülebilir ekonomik kalkınma ve refahın tüm insanlığa yaygınlaştırılmasına yönelik stratejik hedeflerden biri beşeri ve hayvancılık dünyasını doğrudan ilgilendiren infeksiyon hastalıklarıyla mücadeledir. Bu çerçevede, günümüz bilimsel-teknolojik gelişmelerinin infeksiyon hastalıklarıyla mücadelede esas unsur olan koruyucu hekimliğe yansıtılması ileri teknolojilere dayalı etkin, güvenilir, kolay uygulanabilir ve düşük maliyetli aşılar ile mümkün olabilecektir.

TEŞEKKÜR

Dr. Nevzat Yurdusev'e (OMÜ, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD) makalenin içeriğine yönelik tavsiyeleri dolayısıyla teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

- Al-Mariri A., Tibor A., Mertens P., Bolle XD., Michel P., Godefroid J., Walravens K., Letesson JJ., 2001. Protection of BALB/c Mice against *Brucella abortus* 544 Challenge by Vaccination with Bacterioferritin or P39 Recombinant Proteins with CpG Oligodeoxynucleotides as Adjuvant. *Infect. Immun.*, 69, 4816-4822.
- Anonim. 2009. OIE, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/Eng/normes/mmanual/A_index.htm [Erişim tarihi: 02.06.2010].
- Barnet PV., Pullen L., Williams L., Doel T., 1996. International bank for foot-and-mouth disease vaccine: assessment of Montanide ISA 25 and ISA 206, two commercially available oil adjuvants. *Vaccine*, 14, 1187-1196.
- Bae KD., Choi JY., Jang YS., Ahn SJ., Hur BK., 2009. Innovative vaccine production technologies: The evolution and value of vaccine production technologies. *Arch. Pharm. Res.* 32, 465-480.
- Capozzo AVE., Cuberos L., Levine MM., Pasetti MF., 2004. Mucosally Delivered *Salmonella* Live Vector Vaccines Elicit Potent Immune Responses against a Foreign Antigen in

- Neonatal Mice Born to Naive and Immune Mothers. *Infect. Immun.*, 72, 4637–4646.
- Carey AJ., Timms P., Rawlinson G., Brumm J., Nilsson K., Harris JM., Beagley KW., 2010. A multi-subunit Chlamydial vaccine induces antibody and cell-mediated immunity in immunized Koalas (*Phascolarctos cinereus*): Comparison of three different adjuvants. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 63, 161-172.
- Cassataro J., Velikovskiy CA., Barrera S., Estein SM., 2005. A DNA vaccine coding for the *Brucella* outer membrane protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response. *Infect. Immun.* 73, 6537-6546.
- Chen AY., Fry SR., Forbes-Faulkner J., Daggard G., Mukkur TK., 2006. Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice. *J. Med. Microbiol.*, 55, 923–929.
- Cloekaert A., Jacques I., Grilló MJ., Marín CM., Grayon M., Blasco JM., Verger JM., 2004. Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the *bp26* and *omp31* genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine*, 22, 2827-2835.
- Dhama K., Mahendran M., Gupta PK., Rai A., 2008. DNA vaccines and their applications in veterinary practice: current perspectives *Vet. Res. Commun.*, 32, 341–356.
- Dunham SP., 2002. The application of nucleic acid in veterinary medicine. *Res.Vet. Sci.*, 73, 9-16.
- Eldridge JH., Staas JK., Meulbroek JA., Tice TR., Gilley RM., 1991. Biodegradable and biocompatible poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. *Infect. Immun.* 59, 2978–2986.
- Fensterle J., Grode L., Hess J., Kaufmann SH., 1999. Effective DNA vaccination against listeriosis by prime/boost inoculation with the gene gun. *J. Immunol.* 163, 4510–4518.
- Grode L., Kursar M., Fensterle J., Kaufmann SHE., Hess, J., 2002. Cell mediated immunity induced by recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin strains against an intracellular bacterial pathogen: importance of antigen secretion or membrane-targeted antigen display as lipoprotein for vaccine efficacy. *J. Immunol.*, 168, 1869-1876.
- Guris D., Strebel PM., Jafari H., Wharton M., Hadler SC., 1997. Pertussis vaccination: Use of acellular pertussis vaccines among infants and young children CDC, *MMWR*, 46, 1-25.
- Gurunathan S., Wu CY., Freidag BL., Seder RA., 2000. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 12, 442–447.
- Hahn UK., Aichler M., Boehm R., Beyer W., 2006. Comparison of the immunological memory after DNA vaccination and protein vaccination against anthrax in sheep. *Vaccine*, 24, 4595–4597.
- Henderson LM., 2005. Overview of marker vaccine and differential diagnostic test technology. *Biologicals*, 33, 203-209.
- Jacques I., Verger JM., Laroucau K., Grayon M., Vizcaino N., Peix A., Cortade F., Carreras F., Guilloteau LA., 2007. Immunological response and protective efficacy against *Brucella melitensis* induced by *bp26* and *omp31* *B. melitensis* Rev.1 deletion mutants in sheep. *Vaccine*, 25, 794-805.
- Koff RS., 2002. Immunogenicity of hepatitis B vaccines: implications of immune memory. *Vaccine*. 20: 3695-3701.
- Kurar, E. and Splitter, G.A., 1997. Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response. *Vaccine*, 15, 1851–1857.
- Liljeqvist S, Stahl S., 1999. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J. Biotechnol.*, 73, 1–33.
- Lindblad EB., 2004. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol. Cell. Biol.*, 82, 497-505.
- Lucas AH. , Reason DC., 1999. Polysaccharide vaccines as probes of antibody repertoires in man. *Immunol. Rev.*, 171: 89-104.
- Meeusen ENT.,Walker J., Peters A., Pastoret PP., Jungersen G., 2007. Current status of veterinary vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20, 489-510.
- Nayak AR., Tinge SA., Tart RC., McDaniel LS., Briles DE.,Curtiss R. III., 1998. A live Recombinant avirulent oral *Salmonella* vaccine expressing pneumococcal surface protein A induces

- protective responses against *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun., 66, 3744-3751.
- Nour El-Din AN., Shkreta L., Talbot BG., Diarra MS., Lacasse P., 2006. DNA immunization of dairy cows with the clumping factor A of *Staphylococcus aureus*. Vaccine, 24, 1997–2006.
- O’Hagan DT, MacKichan ML, Singh M., 2001. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases Biomol. Engineer., 18, 69–85.
- Oliveira SC., Splitter GA., 1996. Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. Vaccine, 14, 959-962.
- Onate AA., Cespedes S., Cabrera A., Rivers R., Gonzalez A., Munoz C., Folch H., Andrews E., 2003. A DNA vaccine encoding Cu,Zn Superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. Infect. Immun. 71:4857-4861.
- Özcengiz E., Kılınç K., Büyüktanır Ö., Günalp A. 2004. Rapid purification of pertussis toxin (PT) and filamentous hemagglutinin (FHA) by cation-exchange chromatography. Vaccine, 22, 1570-1575.
- Perrie Y., Mohammed AR., Kirby DJ., McNeil SE., Bramwell VW., 2008. Vaccine adjuvant systems: Enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens Int. J. Pharm., 364, 272–280.
- Sangari FJ., Garcia-Lobo JM., Agüero J., 1994. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. FEMS. Microbiol. Lett. 121, 337-342.
- Schurig GG., Sriranganathan N., Corbel MJ., 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. Vet. Microbiol. 90, 479–496.
- Sechi LA., Mara L., Cappai P., Frothingam R., Ortu S., Leoni A., Ahmed N., Zanetti S., 2006. Immunization with DNA vaccines encoding different mycobacterial antigens elicits a Th1 type immune response in lambs and protects against *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection. Vaccine, 24, 229–235.
- Shams H., 2005. Recent developments in veterinary vaccinology. Vet. J. 170, 289–299.
- Singh M, O’Hagan DT., 2003. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. Int. J. Parasitol., 33, 469–478.
- Strube W., Auer S., Block W., Heinen E., Kretzdorn D., Rodenbach C., Schmeer N., 1996. A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs. Vet. Microbiol., 53, 181-189.
- Sutter G., Moss B., 1992. Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. PNAS-USA 89, 10847-10851.
- Tollis M., 2006. Standardization or tailorization of veterinary vaccines: a conscious endeavour against infectious disease of animals Ann. Ist. Super. Sanità, 42, 446-449.
- Valenzuela P., Medina A., Rutter W.J., Ammerer G., Hall BD., 1982. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. Nature 298, 347-350.
- Vanniasinkam, T., Barton, M.D. and Heuzenroeder, M.W., 2005. Immune response to vaccines based upon the VapA protein of the horse pathogen, *Rhodococcus equi*, in a murine model. International Journal of Medical Microbiology, 294, 437–445
- Yang X., Hudson M., Walters N., Bargatze RF., Pascual DW., 2005. Selection of protective epitopes for *Brucella melitensis* by DNA vaccination. Infect Immun., 73, 7297-7303.
- Yang X., Walters N., Robison A., Trunkle T., Pascual DW., 2007. Nasal immunization with recombinant *Brucella melitensis* bp26 and trigger factor with cholera toxin reduces *B. melitensis* colonization. Vaccine, 25, 2261-2268.
- Yu DH., Hu XD., Cai H., 2007. A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and L7/L12 confers high protection against *Brucella abortus* 2308 by inducing specific CTL responses. DNA Cell Biol. 26, 435-43.