

LİYOFİLİZE STANDART DİFTERİ-TETANOZ-BOĞMACA AŞILARI GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI

DEVELOPMENT STUDIES OF LYOPHILIZED STANDARD DIPHTHERIA-TETANUS-PERTUSSIS VACCINES

**Erkan ÖZCENGİZ¹, Derya ÜNVER¹, H. Hüseyin ÇAYAN¹
Pınar ATAKAN ABLAY¹, Esin KANIK¹**

ÖZET: Bu çalışmada, difteri, tetanoz, boğmaca aşı komponentleri, difteri-tetanoz-boğmaca (DTB), difteri-tetanoz/çocuk tipi (DT), difteri-tetanoz/yetişkin tipi (Td) ve tetanoz toksoidi (TT) formülasyonlarında adsorbe ve liyofilize edilerek standardize edilmiştir. Alhidrojelle (alimünyum hidroksit jeli) adsorbe edilen ve stabil edici maddeler içeren bu preparatların uygun liyofilizasyon işleminden sonra, her aşıda tüm komponentlerin immünojenite testleri in vivo ve in vitro olarak yapılmıştır. Tetanoz komponenti potens değeri her aşıda "letal challenge" testi ile saptanmış ve liyofilize adsorbe (LA)-DTB aşısında 144.86 IU/ml, LA-DT aşısında 116.5 IU/ml, LA-Td aşısında 98.25 IU/ml ve LA-TT aşısında 96.2 IU/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca bu aşılarla bağışıklanan farelerden alınan serum örneklerinde anti-tetanoz IgG ve anti-difteri IgG ELISA değerleri yüksek bulunmuştur. Boğmaca yönünden de, anti-*B.pertussis* fimbria IgG antikor düzeyleri ELISA ünitesi olarak yüksek değerde saptanmış ve boğmaca mikroaglutinasyon titresi de yüksek bulunmuştur. Bu preparatların adsorbe sıvı aşılarla karşılaştırılmaları da yapılmış ve bu yöntemle hazırlanan liyofilize formülasyonlarda komponentlerin korunduğu görülmüştür. Bu çalışmada elde edilen preparatların, Dünya Sağlık Örgütü standartlarına karşı kalibre edilerek standart aşı olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Difteri, tetanoz, boğmaca, aşı, standart.

ABSTRACT: In this study, diphtheria, tetanus and pertussis vaccine components were prepared as the formulations of diphtheria-tetanus-pertussis (DTP), diphtheria-tetanus (DT) for children, diphtheria-tetanus (Td) for adults, and tetanus toxoid (TT), respectively. Alhydrogel-adsorbed vaccines prepared to contain the stabilizing substances were lyophilized and the immunogenicity tests were carried out both in vivo and in vitro. The potencies of the tetanus component of the vaccines were obtained by the lethal challenge test in mice. The values were found as 144.86 IU/ml for lyophilized adsorbed (LA)-DTP, 116.5 IU/ml for LA-DT, 98.25 IU/ml for LA-Td and 96.2 IU/ml for LA-TT. Anti-tetanus IgG and anti-diphtheria IgG levels determined by ELISA method were found high in the sera taken from the mice immunized with the above -mentioned vaccines. Anti-*B.pertussis* fimbria IgG antibody levels were also high by both ELISA and microagglutination tests. The test preparations were then compared to adsorbed liquid vaccines and it was shown

¹ Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Aşı Serum Üretim ve Araştırma Bölümü, Ankara. (erozcengiz@yahoo.com)

that the components were quite stable in the lyophilized formulations. It was concluded that the formulations prepared in this study can be used as standard vaccines after being calibrated against World Health Organization standards.

Key words: Diphtheria, tetanus, pertussis, vaccine, standard.

GİRİŞ

1919 yılında, tıbbi kimyasallardan farklı olarak “aşılar, serumlar, toksinler, antitoksinler ve benzeri biyolojik ürünler” ile ilgili ilk Amerikan düzenlemeleri belirlenmiştir. Pek çok biyolojik üründe görülen doğal çeşitlilik ve onların biyolojik test yöntemleri ve bu gibi saf olmayan ürünlerdeki potens ölçümü için ortak sistemlerin yokluğu, o tarihlerde kalite kontrol testlerinde kullanım için uluslararası standartların ve referans reaktiflerin oluşturulmasına yol açmıştır. İlk biyolojik standart 1923 yılında insülin için geliştirilmiştir. 20. yüzyılın başlarında önemi fark edilen “uluslararası biyolojikler standardizasyonu” konusunda halen Dünya Sağlık Örgütü’nün (DSÖ) çalışan bir komitesi bulunmaktadır¹.

Standartlar ve referans materyaller lisanslama ve kalite kontrol işlemlerinde önemli olup, aşılarda toksisite ve immünojenite testlerinde belirleyici bir rol oynar. Bu standartlar, aşı antijenlerine karşı bağışık yanıtın belirlenmesinde olduğu kadar, aşılarda değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerin standardizasyonunda da önem taşır. Standartların aynı zamanda, elde edilen sonuçların laboratuvarlar arası ve klinik çalışmaların uluslararası karşılaştırılmasında hayati önemi vardır. Buna ek olarak, ulusal düzenleyici otoriteler ve üreticiler kendi ulusal veya çalışma standartlarını her ürünün kalitesini tespit etmek için oluşturabilir ve bunu bir uluslararası standarda karşı kalibre edebilirler. Dünya Sağlık Örgütü’nün (DSÖ) uluslararası standardı genel olarak referans olarak kullanılmaktadır. Çoklu standart preparatların artışı önlemek için ise, bölgesel çalışma standartları büyük kapasitede belli bir yerde üretilebilir. Örneğin, Avrupa Konseyi ilaç kalite bölümü aşılarda çalışma standartlarını DSÖ’nün uluslararası standartlarına karşı kalibre ederek oluşturmaktadır².

Bu çalışmada adsorbe tetanoz toksoidi (TT) ve difteri-tetanoz-boğmaca (DTB), difteri-tetanoz/çocuk (DT), difteri-tetanoz/yetişkin (Td) kombine aşılarda üretim kalite kontrol testlerine yönelik çalışmalarda kullanılmak üzere liyofilize standart aşılarda hazırlanması amaçlanmıştır. Bunlar liyofilize formda geliştirilerek DTB, DT, Td ve TT aşılarda hazırlanmış ve bu aşı komponentlerinin immünojenik özellikleri, hayvan deneyleri ve in vitro yöntemlerle belirlenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Adsorbe Aşılarda Hazırlanması: Difteri-tetanoz-boğmaca aşısı (DTB), 0.5 ml’de 25 Lf difteri toksoidi, 7.5 Lf tetanoz toksoidi ve 10 milyar jerm ısı inaktif *B.pertussis* hücreleri olacak şekilde alhidrojele adsorbe edilerek hazırlandı. Difteri-tetanoz aşısı (DT), 25 Lf difteri toksoidi, 7.5 Lf tetanoz toksoidi/0.5 ml olacak şekilde alhidrojele adsorbe edilerek; yetişkin difteri-tetanoz aşısı (Td), 7.5 Lf tetanoz toksoidi ve 2.5 Lf difteri toksoidi /0.5 ml olacak şekilde alhidrojele adsorbe edilerek ve tetanoz toksoid aşısı (TT), 7.5 Lf tetanoz toksoidi/0.5 ml şeklinde alhidrojele adsorbe edilerek hazırlandı.

Liyofilizasyon: Yukarıda belirtilen kompozisyonlardaki adsorbe DTB, DT, Td ve TT aşılara, liyofilizasyon öncesi son konsantrasyonda %5 sükröz, %1 tripton, %1 monosodyum glutamat olacak şekilde bu maddeler ilave edildi ve liyofilizasyon şişelerine 0.5 ml miktarlarda steril olarak dağıtıldı. Derin dondurucuda dondurulan materyal liyofilizasyon cihazında vakum altında kurutuldu.

Liyofilize Adsorbe (LA-DTB, LA-DT, LA-Td, LA-TT) Aşılarında Tetanoz Potensi "Letal Challenge" Testi: Hazırlanan liyofilize adsorbe LA-DTB aşısı ve karşılaştırılmalı olarak kullanılan sıvı adsorbe DBT- India (EU 430 422-C) aşısı seri olarak sulandırıldı (1/25, 1/50, 1/100, 1/200) ve her sulandırımından 10'ar adet her biri 17-22 gr olan farelerin derialtına 0.5 ml enjekte edildi. Liyofilize adsorbe DT, Td, TT aşıları testinde ise karşılaştırılmalı olarak sıvı adsorbe TT (RSHM TT0001) aşısı kullanıldı. Bu aşılar seri olarak sulandırıldı (1/20, 1/40, 1/80, 1/160) ve her sulandırımından 10'ar adet her biri 17-22 gr olan farelerin derialtına 0.5 ml enjekte edildi. Bağışıklanmayan 10 adet fare toksin kontrolü için kullanıldı. Bu enjeksiyonlardan 40 gün sonra farelere standart tetanoz toksininin (TA-4B, JICA-Japonya) 100 LD₅₀/0.5 ml "challenge" dozu derialtı yolla enjekte edilerek fareler bir hafta süresince gözlemlendi. Bir hafta içinde, her gün tetanoz semptomları ve ölüm durumu gözlenerek skor kaydı yapıldı³⁻⁵. Sonuçlar "Paralel Line" metoduna göre IU olarak hesaplandı⁶.

LA-DTB, LA-DT, LA-Td Aşılarında Difteri-Boğmaca-Tetanoz Komponentleri İmmünojenite Testi: Liyofilize adsorbe LA-DTB, sıvı adsorbe SA-DBT-India (EU 430 422-C) aşısı ve sıvı adsorbe deneysel SA-DTB aşımız, 0.25 ml olarak 6 adet her biri 17-22 gr olan fareye derialtı yolla enjekte edildi ve farelerden 15 gün sonra alınan serum örneklerinde ELISA ile anti-*B.pertussis* fimbria IgG, anti-tetanoz IgG ve anti-difteri IgG antikor düzeyleri araştırıldı.

Liyofilize adsorbe LA-DT, LA-Td, sıvı adsorbe DT-India (EU 20404-A) ve sıvı adsorbe Td-India (EU 40311-B) aşıları, sulandırılmadan ve 1/2 ile 1/10 sulandırımında, 5'er adet her biri 17-22 gr olan farelere 0.5 ml derialtı yolla enjekte edildi. Farelerden 30 gün sonra alınan serum örneklerinde anti-tetanoz IgG ve anti-difteri IgG antikor düzeyleri belirlendi. Bağışıklanmayan 5 adet fare serumu negatif kontrol olarak kullanıldı.

ELISA Yöntemi: Bu yöntem, Gueirard ve arkadaşlarının⁷ tanımladığı şekilde uygulandı. Kısaca; düz tabanlı mikropleyt çukurları 0.05 M NaHCO₃, pH 9.6 kaplama solüsyonu içinde, pürifiye difteri toksini (5 µg/100 µl), pürifiye tetanoz toksoidi (5 µg/100 µl) ve *B.pertussis* Saadet suşu fimbria proteini (1 µg/100 µl) ile 100 µl hacimde 24 saat oda ısısında bekletilerek kaplandı. Daha sonra yıkama çözeltisi (%0.05 Tween 20+%0.85 NaCl) ile üç kez yıkandı. Çukurlara %2 fetal dana serumu içeren dilüsyon çözeltisi kondu ve test serumları, karşılaştırma serumları ile negatif kontrol serumunun 1/100 dilüsyonlarından birinci çukurlara 100 µl konularak seri sulandırılmaları yapıldı. Oda ısısında iki saat bekletildikten sonra üç kez yıkandı ve 1/15.000 dilüsyonda konjugat (alkaline phosphatase- anti-mouse IgG) her bir çukura 100 µl ilave edilerek oda ısısında iki saat inkübe edildi. Tekrar üç kez yıkama işleminden sonra çukurlara 100 µl substrat (0.5 mM MgCl₂ içeren %10 etanolamin pH

9.8 içinde hazırlanan paranitrophenyl phosphate; 1 mg/ml) ilave edildi. 15-20 dakika sonra 50 µl 1M NaOH eklenerek reaksiyon durduruldu ve sonuçlar 405/630 nm dalga boyunda okunarak değerlendirildi.

Boğmaca Komponenti Mikroaglütinasyon Testi: B.pertussis Saadet suşunun formaldehit inaktif 40 milyar jerm/ml süspansiyonu antijen olarak kullanıldı. U tabanlı mikropleytlerde tüm çukurlara 0.05 ml fosfat klorür tamponu, pH 7.2 (PBS) konuldu ve her sıradaki ilk çukura liyofilize adsorbe DTB ve karşılaştırmalı olarak sıvı adsorbe DBT-India (EU 430 422-C) ve sıvı adsorbe deneysel tam hücre boğmaca aşılarna karşı elde edilen bağışık serumdan 0.05 ml konarak seri sulandırılmaları yapıldı. Daha sonra her sırada bulunan tüm çukurlara 0.05 ml antijen ilave edildi ve 37°C'de bir gece inkübasyondan sonra, sonuçlar aglütinasyon titre değeri olarak kaydedildi⁸.

BULGULAR

Liyofilize adsorbe aşilar ile bağışıklanan farelerde tetanoz potensi Tablo 1'de görüldüğü gibi belirlenmiştir.

Tablo 1. Liyofilize Adsorbe Aşılarda Tetanoz Komponentinin “Letal Challenge” Test Değerleri

Liyofilize Adsorbe Aşilar	Tetanoz Potensi (IU/ml)
LA-DTB	144.86
LA-DT	116.5
LA-Td	98.25
LA-TT	96.2

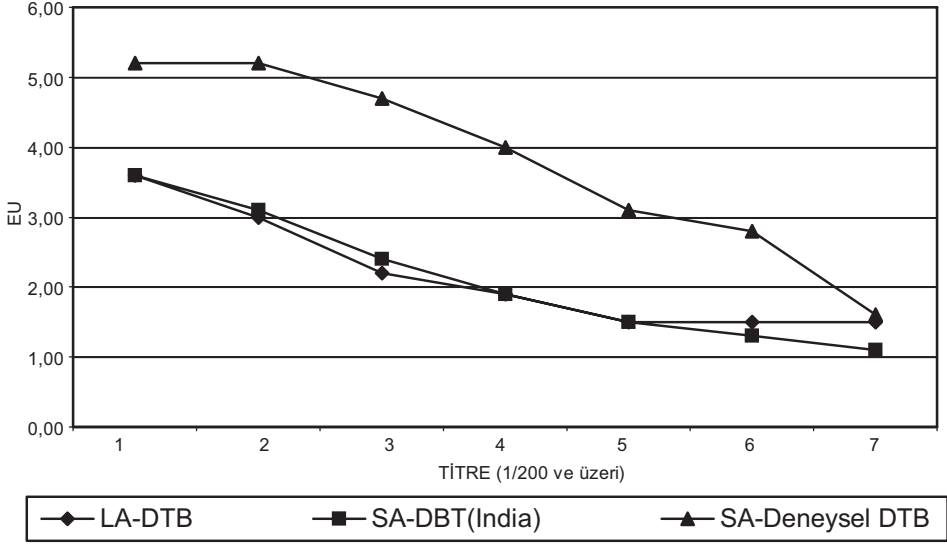
Liyofilize adsorbe LA-DTB, LA-DT, LA-Td aşiları ve sıvı adsorbe aşilarla bağışıklanan farelerden alınan serum örnekleri ELISA yöntemi ile karşılaştırıldığında, liyofilize aşiların yüksek değerlerde anti-tetanoz IgG, anti-difteri IgG ve anti-*B. pertussis* fimbria IgG antikor titreleri oluşturduğu görülmüştür.

Liyofilize adsorbe LA-DTB aşısı, sıvı adsorbe SA-DBT-India (EU 430 422-C) aşısı ve sıvı adsorbe deneysel SA-DTB aşısı ile bağışıklanan fare serumlarında ELISA yöntemi ile saptanan anti-difteri IgG düzeyleri Şekil 1'de, anti-tetanoz IgG değerleri ise Şekil 2'de görülmektedir.

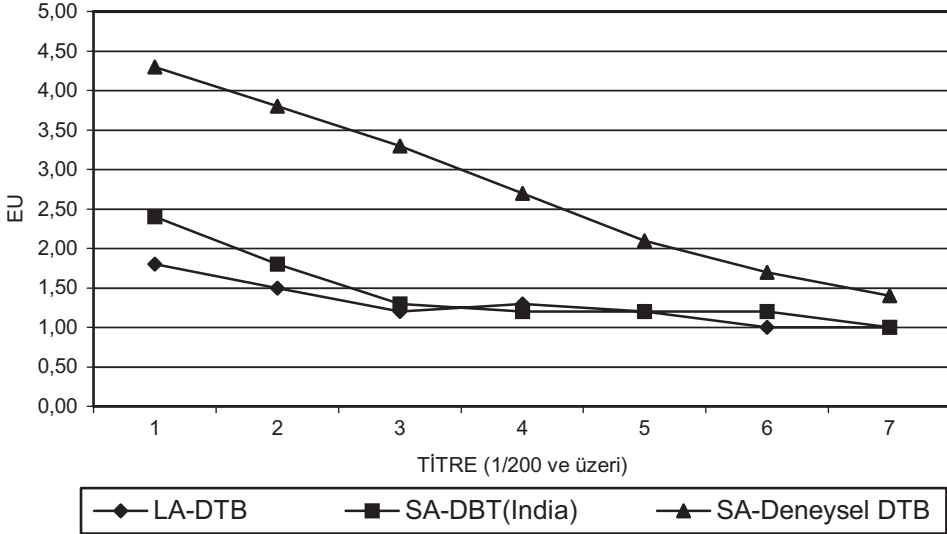
LA-DTB aşısı, SA-DBT-India (EU 430 422-C) aşısı ve SA-Deneysel Tam Hücre Boğmaca aşısı ile bağışıklanan fare serumlarında ELISA yöntemi ile anti-*B.pertussis* fimbria IgG değerleri Şekil 3'de görüldüğü gibi belirlenmiştir.

LA-DT aşısı ve SA-DT-India (EU 20404-A) aşısı ile bağışıklanan fare serumlarında ELISA yöntemi ile belirlenen anti-difteri IgG değerleri Şekil 4'de, anti-tetanoz IgG değerleri ise Şekil 5'de verilmiştir.

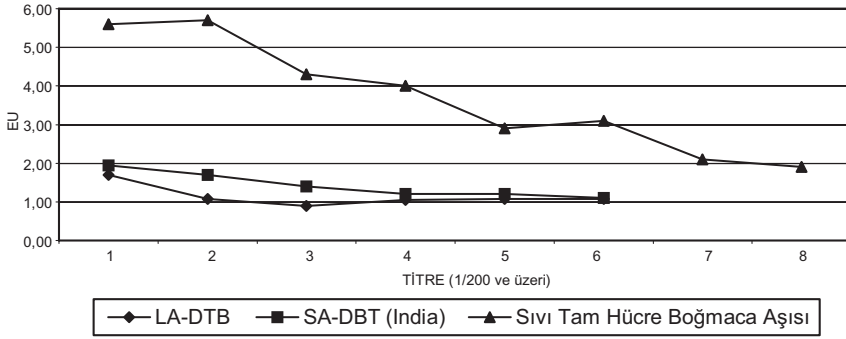
LA-Td aşısı ve SA-Td-India (EU 40311-B) aşısı ile bağışıklanan fare serumlarında ELISA yöntemi ile anti-tetanoz IgG değerleri Şekil 6'da, anti-difteri IgG değerleri ise Şekil 7'de görüldüğü gibi belirlenmiştir.



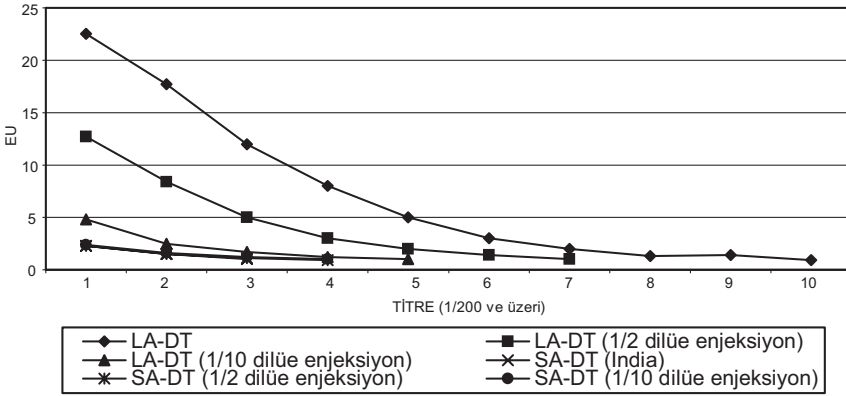
Şekil 1. Liyofilize adsorbe LA-DTB aşısı, sıvı adsorbe SA-DBT- India aşısı ve SA-deneysel DTB aşısı ile bağışıklanan fare serumlarında anti-difteri IgG değerleri.



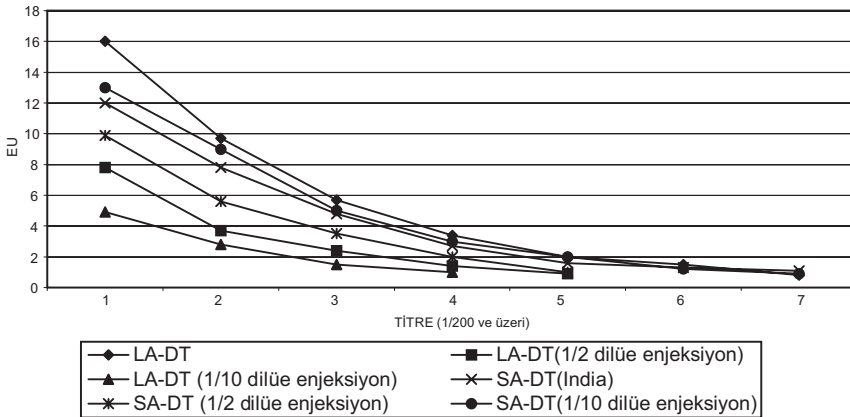
Şekil 2. LA- DTB aşısı, SA-DBT- India aşısı ve SA-Deneysel DTB aşısı ile bağışıklanan fare serumlarında anti- tetanoz IgG değerleri.



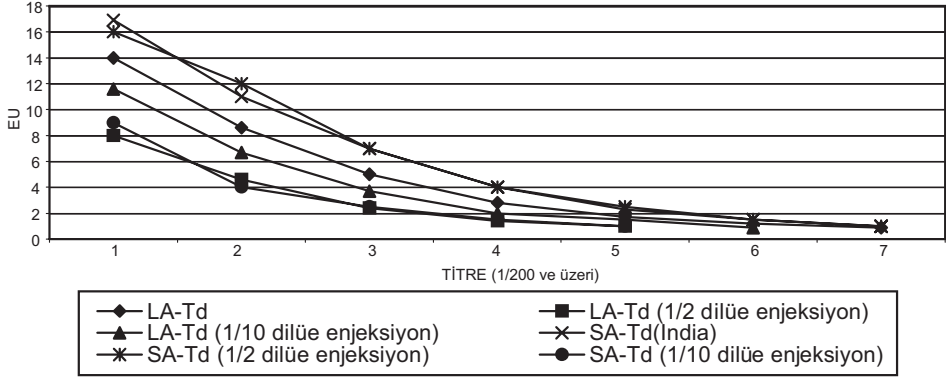
Şekil 3. LA-DTB aşısı, SA-DBT-India aşısı ve SA-Deneysel Tam Hücre Boğmaca aşısı ile bağışıklanan fare serumlarında anti-*B.pertussis* fimbria IgG değerleri.



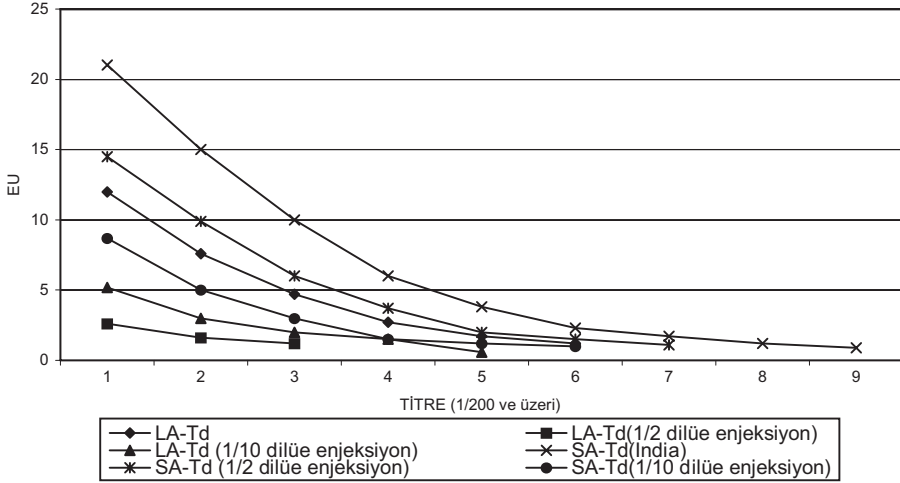
Şekil 4. LA-DT aşısı ve SA-DT-India aşısı ile bağışıklanan fare serumlarında anti-difteri IgG değerleri.



Şekil 5. LA-DT aşısı ve SA-DT-India aşısı ile bağışıklanan fare serumlarında anti-tetanoz IgG değerleri.



Şekil 6. LA-Td aşısı ve SA-Td-India aşısı ile bağışıklanan fare serumlarında anti-tetanoz IgG değerleri.



Şekil 7. LA-Td aşısı ve SA-Td-India aşısı ile bağışıklanan fare serumlarında anti-difteri IgG değerleri.

LA-DTB aşısı, SA-DBT-India (EU 430 422-C) aşısı ve SA-deneysel tam hücre boğmaca aşısı ile bağışıklanan fare serumlarında boğmaca komponenti için mikroaglutinasyon titre değerleri Tablo II'de gösterilmiştir.

Tablo II. LA-DTB, SA-DBT-India ve SA-Deneysel Tam Hücre Boğmaca Aşısı ile Bağışıklanan Fare Serumlarında *B.pertussis* Mikroaglutinasyon Titre Değerleri

Aşılar	Titre
Liyofilize Adsorbe LA-DTB	1/64
Sıvı Adsorbe SA-DBT- India	1/256
Sıvı Adsorbe Deneysel Tam Hücre Boğmaca	1/16384

TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), insan hastalıklarının önlenmesi, tedavisi ve teşhisi için kullanılan biyolojik maddeler için uluslararası biyolojik referans standartları oluşturmaktadır. Tüm dünyada ölçümlerin tutarlılığını sağlamak üzere bu maddelerin aktiviteleri ortak bir uluslararası ünite olarak belirlenir. Uluslararası biyolojik referans standartlar sınırlı miktarlarda buldukları için, rutin kullanım olarak değil ancak bölgesel, ulusal veya laboratuvar standartlarının karakterizasyonu ve kalibrasyonu için temin edilebilir^{9,10}. Bu referans standartların listeleri, DSÖ tarafından zaman zaman gözden geçirilerek yenilenmekte, ilave ve değişiklikler Biyolojik Standardizasyon Uzman Komitesinin yıllık raporlarında (DSÖ Teknik Rapor Serileri) yayınlanmaktadır¹⁰.

Özellikle aşılarda potens ölçümlerinde, üretim işleminin devamlılığını sağlamak için bu tip standartlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda liyofilize adsorbe aşılarda hazırlanması amaçlanmıştır. Geliştirilen yöntemle hazırlanan çeşitli preparatlarla yapılan bağışıklama çalışmalarında, yüksek düzeyde antikor yanıtı olduğu saptanmıştır. Liyofilize adsorbe DTB, LA-DT, LA-Td, LA-TT kombine formdaki aşılarda, tetanoz komponenti yönünden yapılan "letal challenge" testlerinde, potens değerleri sırasıyla 144.86 IU/ml, 116.5 IU/ml, 98.25 IU/ml ve 96.2 IU/ml olarak bulunmuş; yüksek değerlerde elde edilen bu in vivo potens sonuçlarının, in vitro deneylerle de uyumlu olduğu görülmüştür. Bağışık fare serumları ile yapılan ELISA testlerinde de yüksek düzeyde anti-IgG antikorları saptanmıştır. Özellikle LA-DTB aşısının SA-DBT-India aşısı ile hemen hemen aynı değerleri vermesi (Şekil 1,2,3), hatta LA-DT aşılarının sıvı aşıya göre daha iyi görünmesi (Şekil 4,5), liyofilize preparatların standart aşı olarak kullanıma çok uygun olduğunu göstermiştir. Böylece adsorbe sıvı aşılarda yapılan karşılaştırmalarda, hazırlanan liyofilize formülasyonların her bir komponent potensinin iyi olduğu ve komponentlerin iyi derecede korunduğu saptanmıştır. Sonuç olarak hazırlanan liyofilize aşılarda DSÖ standartlarına karşı kalibre edilerek standart aşı olarak kullanılabilirliği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Milstien JB. Regulation of vaccines: strengthening the science base. J Public Health Policy 2004; 25: 173-89.
2. World Health Organization. Technical Report Series, Guidelines for nonclinical evaluation of vaccines. Annex 1, No.822, 2003.
3. World Health Organization. Technical Report Series, Requirements for diphtheria toxoid, pertussis vaccine, tetanus toxoid and combined vaccines. Annex 1, No. 638, 1979.
4. World Health Organization. Technical Report Series, Requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines. Annex 2, No. 800, 1990.
5. World Health Organization. Manual of Laboratory Methods, Traditional methods for testing the potency of vaccines containing adsorbed diphtheria and tetanus toxoids. Part III. WHO/VSQ/97.04.
6. World Health Organization. Manual of Laboratory Methods, Parallel line analysis. Part IV. WHO/VSQ/97.04.
7. Gueirard P, Minoprio P, Guiso N. Intranasal inoculation of *Bordetella bronchiseptica* in mice induces longlasting antibody and T cell mediated immune responses. Scand J Immunol 1996; 43: 181-92.

8. Rose NR, Friedman H, Fahey JL. Manual of Clinical Laboratory Immunology, pp: 388-94. 1986, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington DC.
9. World Health Organization. Technical Report Series, Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international biological reference standards. Part A. 2004.
10. UNIDO, Model Programme for the production of vaccines in developing countries. UC/GLO/84/120. Terminal Report, 1984.