

ÖZET

SİĞIRLARIN GANGRENLİ NEZLESİ İÇİN AŞI VE AŞININ ÜRETİM YÖNTEMİ

5 Buluş, sığırların gangrenli nezlesi virüsü enfeksiyonuna (MCF, Malignant Catarrhal Fever, Coryza Gangrenosa Bovum) karşı tedavisini sağlayan ve koruyucu bağışıklık oluşturan autolog ve homolog pulverize mukozal aşı ve bu aşının üretim yöntemi ile ilgilidir.

10

15

20

25

30

İSTEMLER

1. Sığırların gangrenli nezlesi için aşı üretim yöntemi olup, özelliği;

- Enfekte olmuş hayvanların burun, göz korneası ve konjunktiva akıntısı deşarjlarından steril pamuk çubukları ile numune alınması,
 - Virüsün inaktivasyonu için 5 ml %96 etanol içeren bir cam tüp içerisine konulması,
 - Cam tüp içerisindeki örneklerin 3000 devir/dakika hızında vorteks mikseri ile 10 dakika boyunca kesintisiz olarak çalkalanması,
 - Çalkalanan karışımın, +4°C’ de muhafaza edilerek virüsün inaktivasyonunun devamı amacıyla gün içinde her bir saatte bir defa 5 dakika vortex ile çalkalanması,
 - Bir gece boyunca aynı sıcaklıkta muhafaza edilmesi,
 - 1 ml %96 etanol ve inaktive edilmiş virüs içeren sıvının (stok solüsyonun) 1/10 seyreltik solüsyon elde edilebilmesi amacıyla 9 ml etanol içeren bir cam tüp içine aktarılması,
 - 3000 d/dk hızında, 5 dakika vortex ile iyice karıştırılıp homojenize edilmesi,
 - Aynı işlemin, toplamda 9 defa seyreltme elde etmek amacıyla, ilk sefer haricinde için 8 kez daha tekrarlanması,
 - Son dilüsyondan 1 ml alınması ve üzerine 9 ml % 96 etanol eklenip 3000 d/dk hızında 5 dakika vortex ile karıştırılması,
 - Karıştırılan preparattan 7,5 ml solüsyonun, kahverengi renkli pulverizasyon aparatlı cam şişeye aktarılması,
 - 42,5 ml distile su ile 25 mg kitosan çözeltisinin karışıma ilave edilmesi,
 - Nihai çözeltinin, 3000 d/dk hızında vortex ile 5 dakika daha karıştırılması
- aşamalarıyla karakterizedir.

2. Sığırların gangrenli nezlesi için aşı olup, özelliği; içeriğinde etanol ile inaktive edilmiş virüs, hacmen %15 etanol, hacmen %4 ve 25 mg/total (0,5 mg/ml) olacak şekilde kitosan, hacmen %1 ve 15 µg/ml antijen olacak şekilde (inaktive virüs WIV) ve %80 distile su içermesiyle karakterizedir.

TARİFNAME

SİĞIRLARIN GANGRENLİ NEZLESİ İÇİN AŞI VE AŞININ ÜRETİM YÖNTEMİ

TEKNİK ALAN

5 Buluş, sığırların gangrenli nezlesi virüsü enfeksiyonuna (MCF, Malignant Catarrhal Fever, Coryza Gangrenosa Bovum) karşı tedavisini sağlayan ve koruyucu bağışıklık oluşturan autolog ve homolog pulverize mukozal aşı ve bu aşının üretim yöntemi ile ilgilidir.

10 ÖNCEKİ TEKNİK

Sığırların gangrenli nezlesi virüsü (MCF, Malignant Catarrhal Fever, Coryza Gangrenosa Bovum), ruminantların herpes virüsler tarafından meydana getirilen, ağız ve üst solunum yolu mukozasının yangılanması, ülserasyonu, eksudasyonu bazen göz lezyonları, ishal ve sinir sistemi bozuklukları ile karakterize çoğunlukla ölümle son bulan bir enfeksiyonudur. Malignant catarrhal fever hastalığında tedavinin yapılamadığı ve aşısının günümüze kadar üretilmediği literatürlerde sabittir. MCF virüsleri, Herpesviridae ailesinin Gammaherpesvirinae alt ailesinin Rhadinovirus sınıfında yer almaktadır. İki yüz yıldır bilinen bir hastalıktır. İlk olarak 1700'lerde tanımlanmıştır. MCF'nin iki önemli epidemiyolojik formu tanımlanmıştır. Bunlar Afrika formu olarak tanımlanan değişik antilop türleri tarafından bulaştırılan wildebeest-associated MCF (WA-MCF), ve evcil koyunlarda yaygın olarak bulunan sheep-associated MCF (SA-MCFV) yada Ovine herpesvirus-2 OvHV-2 olarak isimlendirilen formudur (Mushi ve ark, 1981, Russell ve ark, 2007).

Hastalığın inkubasyon süresi oldukça değişkendir. Deneysel çalışmalarda bu sürenin 7-70 gün arasında değiştiği düşünülmektedir (Li ve ark, 2006; Berezowski ve ark, 2005). MCF'nin her iki formu da burun ve göz sekresyonları yoluyla saçılmaktadır. Hastalığa sebep olan viruslar doğada taşıyıcı konumunda olan koyun ve keçi gibi ruminant türlerinde subklinik enfeksiyon olarak bulunmakta ve aynı ortamda bulunan sığırlara bulaşmaktadır. Fakat son yıllarda yapılan araştırmalar, koyun ya da antilop türleri gibi herhangi bir taşıyıcının yokluğunda da klinik vakaların ortaya çıktığını göstermektedir. Çoğu tartışma bu konu çevresinde yoğunlaşmış olup, duyarlı türler arasındaki bulaşma şekillerinin (insektlerden horizontal bulaşmaya kadar) çeşitliliğini akla getirmektedir (Berezowski ve ark, 2005).

MCF'nin klinik belirtileri, perakuttan kroniğe kadar çok değişken olup, hastalık süreci uzadıkça semptomlar daha belirgin olarak görölmektedir. MCF'nin klinik tablosu Gotze ve Lies (1929) tarafından 1) perakut, 2) baş ve göz, 3) intestinal ve 4) ılımlı ya da hafif semptomlarla karakterize (mild) olmak üzere 4 değişik form içerisinde incelenmiştir.

- 5 Hastalık başlangıç semptomları ile birlikte aniden ortaya çıkar. Sığırlardaki tipik semptomlar 41-42°C'ye ulaşan ani ateş, süt veriminin düşmesi, durgunluk, göz ve burunda seröz akıntı, dil, sert damak, dişeti ve yanak papillerinin uç kısımlarında erozyonlar ile birlikte hiperemiye bağlı salivasyon erken klinik belirti olarak görölebilmektedir. Başlangıç semptomlarının ilk bir-iki gününde çevreden merkeze
- 10 doğru ilerleyen bir korneal ödem şekillenmekte olup episkleral damarlaşma, göz kapaklarında şişkinlik ve ışığa duyarlılık yaygındır. Generalize enfeksiyon olgularında eklemler de etkilenir. Sığırlarda sıklıkla preskapuler ya da inguinal nodüller olmak üzere tüm lenf yumrularında şişlik görülebilir. İshal sığırlarda yaygın değildir fakat bizon ve geyiklerde çok sık ve genellikle kanlı ishal şeklinde görülür. Hemorajik sistitis yaygın
- 15 olduğundan idrar kanlı olabilir (OIE, 2008).

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

- Buluş, sığırların gangrenli nezlesi virüsü enfeksiyonuna (MCF, Malignant Catarrhal Fever, Coryza Gangrenosa Bovum) karşı tedavisini sağlayan ve koruyucu
- 20 bağışıklık oluşturan enfekte olmuş hayvanların burun, göz korneası ve konjuktiva akıntısı deşarjlarından alınan numunelerin etanol kullanımı ile inaktivasyonunun sağlanarak elde edilen autolog ve homolog pulverize mukozal aşı ve bu aşının üretim yöntemi ile ilgilidir.

BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI

- Buluşa konu sığırların gangrenli nezlesinin tedavisi amaçlı aşı üretim yönteminin ilk adımı, enfekte olmuş hayvanların burun, göz korneası ve konjuktiva akıntısı deşarjlarından steril pamuk çubukları ile alınan numunenin, virüsün inaktivasyonu için 5 ml %96 etanol içeren bir cam tüp içerisine konulmasıdır. Daha sonra cam tüp
- 30 içerisindeki örnekler 3000 devir/dakika vorteks mikseri ile 10 dakika boyunca kesintisiz çalkalanmaktadır. Bahsedilen karışım, +4°C' de muhafaza edilir ve virüsün inaktivasyonu devam prosedüründe olduğu gibi gün içinde her bir saatte bir defa 5 dakika vortex ile çalkalanır. Bir gece boyunca aynı sıcaklıkta muhafaza edilir. %96 etanol ve inaktive edilmiş virüs içeren sıvı (stok solüsyon) MCF virüsü enfeksiyonunu

tedavi ve hastalığa karşı koruyucu bağışıklık oluşturulması için mukozal pulverize autolog ve homolog aşı hazırlanması için kullanılır. İlk adımda 1/10 seyreltik solüsyon elde edilebilmesi amacıyla 1 ml stok solüsyon 9 ml %96 etanol içeren bir cam tüp içine aktarılır. 3000 d/dk hızında, 5 dakika vortex ile iyice karıştırılıp homojenize edilir. Aynı işlem, toplamda 9 defa seyreltme elde etmek amacıyla, ilk sefer haricinde 8 kez daha 5 10 tekrarlanır. Son dilüsyondan 1 ml alınır ve üzerine 9 ml % 96 etanol eklenir ve 3000 d/dk hızında 5 dakika vortex ile karıştırılır. Bu preparattan 7,5 ml solüsyon kahverengi renkli pulverizasyon aparatlı cam şişeye aktarılır ve 42,5 ml distile su ile 25 mg (0,5 mg/ml) kitosan çözeltisi karışıma ilave edilir. İnaktive virüs, 7,5 ml etanol (%15 hacmen), 25 mg 10 kitosan ve 42,5 ml distile su içeren nihai çözelti tam homojenizasyon sağlanması için 3000 d/dk hızında vortex ile 5 dakika daha karıştırılır. Aşı kullanıldığı sürece +4°C' de muhafaza edilir. Yöntemi anlatılan ürünün içeriği; nihai çözeltide, inaktive virüs, %15 etanol (hacmen), 25 mg kitosan ve distile su şeklindedir.

Yukarıda yöntemi ve içeriği verilen ürün, hasta hayvanlarda autolog tedavi ve 15 hastalığa karşı koruyucu bağışıklık oluşturmak amacıyla aynı ahırda bulunan diğer hayvanlarda homolog pulverize mukozal aşı olarak sabah akşam kullanılmıştır. Doz oranı; erişkinlerde 1 ml, buzağılarda ise 0,6 ml olarak 4-12 hafta boyunca pulverize edilerek kullanılır. Tedavi edici dozda hastalık belirtileri 7-10 gün içinde gerilemekle beraber, en az 4 hafta daha kullanılması gereklidir. 12 hafta kullanımında daha uzun 20 süreli bir koruyuculuk sağlamaktadır.

Aşının üretimi için kullanılan inaktivasyon parametreleri daha önceki yıllarda araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Virüsün % 0.1 - 0.25'lik BPL (β -Propiolactone) konsantrasyonu ile inaktivasyonu 18-24 saat boyunca 4 ° C'de ayarlanır, süreler arasındaki farklılık patojenlerin farklılığından kaynaklanmaktadır. (Lawrence 2000). Elde 25 edilen son ürün ise bütün olarak inaktive edilen virüs aşısı olarak tarif edilir ve virosome aşı olarak adlandırılırlar (Whole Inactivated Virus-WIV). (Herzog et al. 2009).

Çoğu bulaşıcı ajan, mukozal yüzeylerde vücuda girer ve bu nedenle mukozal immün tepkiler ilk savunma hattı olarak işlev görür. Koruyucu mukozal immün yanıtlar 30 ağız, burun, rektum veya vajinal yollarla mukozal immünizasyon ile en etkili şekilde indüklenir, ancak bugün kullanılan aşılarda büyük çoğunluğu enjeksiyon yoluyla verilir. Bizim inovasyonumuz olan mukozal pulverize aşı yöntemi mukoza dokularının fonksiyonu ve mukozal yüzeylerde bağışıklık korunması ile sonuçlanan doğal ve uyarlanabilir immün yanıtların etkileşimi hakkında yeni bilgiler sağlamaktadır.

Autolog ve homolog tedavinin ve hastalığa karşı koruyucu bağışıklık oluşturma yolları virüsün temel yapısal birimleri olan nükleokapsid kompleksine dayanır. % 96 etanol, proteinler ve lipidlere nüfus ederek nükleokapsid kompleksini etkiler. Nükleokapsid kompleksinin yıkımı ile virülens azalır. Etanol ile virüsün inaktivasyonu daha önce farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. İnaktivasyon için etanol kullanımı uygun bir yöntemdir, hayvanlar tarafından hekimlik amacıyla yenilebilir, tolere edilebilir ve güvenlidir. % 15 etanol (hacmen) içeren nihai seyrelti elde edildiğinde hayvana verilen terapötik günlük doz maksimum 1 ml' ye ulaşır ve bu miktar hayvanlar için güvenlidir. Seyreltilmiş pulverize mukozal aşı solusyonu, inaktive edilmiş viral nükleokapsid kompleksi içererek nazal ve oral mukozadan pulverizasyon aşılama sonrası epitelyum hücrelerinde ilk immün yanıt oluşumunu uyarır. Salgısal immünoglobülin A (S-IgA) üretiminin uyarılması sığırların gangrenli nezlesine yol açan virüsün epitel doku hücrelerine yapışmasını önleyebilmek amacıyla temel hedeflerden birisidir. Sığırların gangrenli nezlesi virüsü enfeksiyonuna karşı koruyucu bağışıklığın oluşturulması için mukozal immün yanıt oluşumu uyarılarak hücresel Th1 (sitotoksik ve yardımcı T hücreleri) yanıtının gelişimi sağlanır. Pulverize inaktif virüs içeren mukozal aşı ile sığırların gangrenli nezlesi virüsü enfeksiyonuna karşı CD8, sitotoksik ve yardımcı T hücreleri salgıları uyarılarak sığırların hücresel immün yanıtının arttırılması ve sonunda artmış T hücresi aktivitesinin oluşumu sağlanır. Sığırların gangrenli nezlesi virüsü enfeksiyonuna karşı autolog ve homolog tedavi edici aşılama ile uyarılmış ve gelişen hücresel immün yanıtın devamında, B hücreleri ve plazma hücresi aktivitesini içeren gelişmiş bir humoral yanıt ve antikor üretiminde artış sağlanmaktadır.

Bütün olarak inaktive edilen virüs (WIV) aşılarının immünolojik açıdan bireylerin bağışıklık tepkilerini bölünmüş virüs veya viral alt birim aşılardan daha güçlü indüklediği bildirilmiştir, (Beyer ve diğerleri 1998; Nicholson ve ark.1979).