

ÖZET

SIĞIR TÜRLERİNDE ARTIRILMIŞ BAĞIŞIKLIK YANITI

Mevcut buluş, sığırlar türlerinin bir üyesinde antijen spesifik olmayan bağışıklık yanıtını ortaya çıkarılması için etkili olan bir bağışıklık aktivasyon yöntemi ile ilgilidir. Yöntem, sığırlar türlerinin bir üyesinin bulaşıcı hastalıklardan korunması ve bulaşıcı hastalığa yakalanmış hayvanların tedavi edilmesi için özellikle etkilidir.

İSTEMLER

1. Sığırlarda *Mannheimia haemolytica*'dan kaynaklanan sığırtı solunum hastalığının (BRD) tedavisinde kullanıma yönelik bir immünomodülatör bileşimi olup, burada immünomodülatör bileşimi aşağıdakileri içermektedir:
 - 5 a. [1-[2-[9-(Z)-oktadesenoiloksi]etil]-2-[8](Z)-heptadesenil]-3-[2-hidroksietil]imidazolyum klorür (DOTIM) ve kolesterol içeren bir katyonik lipozom iletim aracı ve

la karşılaştırıldığında istatistiksel farklar ($P>0.10$) tespit edilmemiştir. Özellikle, 6 bakteriden elde edilmiş kodlayıcı olmayan bir DNA plazmid vektörüdür.
- 10 2. İstem 1'e göre kullanıma yönelik bileşim olup, burada lipozom iletim aracı multilameler vezikül lipidleri ve ekstrüde lipidlerden oluşan gruptan seçilen lipidleri içermektedir.
3. İstem 1 ile 2'ye göre kullanıma yönelik bileşim olup, burada akciğer lezyonlarının klinik belirtileri ve/veya şiddetini azaltmaktadır.
- 15 4. İstem 1 ile 3'e göre kullanıma yönelik bileşim olup, intravenöz yol, intramüsküler yol, intradermal yol, intraperitoneal yol, subkütan yol, sprey/aerosol yolu, oral yol, intraoküler yol, intratrakeal yol ve intranazal yoldan oluşan gruptan seçilen uygulamaya yöneliktir.
5. İstem 4'e göre kullanıma yönelik bileşim olup, burada immünomodülatör bileşimi
20 subkütan yolla sığırlara uygulanmaktadır.
6. İstem 4'e göre kullanıma yönelik bileşim olup, burada immünomodülatör bileşimi intramüsküler yolla sığırlara uygulanmaktadır.
7. İstem 1 ile 6'ya göre kullanıma yönelik bileşim olup, burada bileşim ayrıca bağışıklık sistemi arttırıcı proteinler, immünojenler, aşılarda, antimikrobiyaller ve
25 bunların herhangi bir kombinasyonundan oluşan gruptan seçilen bir biyolojik madde içermektedir.

8. İstem 1'e göre kullanıma yönelik bileşim olup, burada immünomodülatör bileşimi 8 nmol lipozom iletim aracı ile kombine halde 0.1 µg ila 10 µg kodlayıcı olmayan DNA plazmid vektörü içermektedir.
9. İstem 1 ila 8'den herhangi birine göre kullanıma yönelik bileşim olup, bir aşık uygulanan bir hayvanın kazanım şı bağ şıklık yan ıtın iyileştirilmesine yöneliktir.
10. İstem 9'a göre kullanıma yönelik bileşim olup, burada immünomodülatör bileşimi aşık ile birlikte uygulanmaktadır veya aşıdan sonra, aşıdan önce veya aşık ile karıştırlımş olarak uygulanmaktadır.

TARİFNAME

SIĞIR TÜRLERİNDE ARTIRILMIŞ BAĞIŞIKLIK YANITI

BULUŞUN ALANI

- Mevcut buluş, sığırcı türlerinin bir üyesinde bağışıklık aktivasyon yöntemi ile ilgilidir.
- 5 Özellikle mevcut buluş, hayvanlara uygulama ve bulaşıcı hastalığa karşı koruma için uygun olan, sistemik, spesifik olmayan ve antijen spesifik bağışıklık yanıtını ortaya çıkarılmasına yönelik yöntemleri içermektedir.

BULUŞUN ARKA PLANI

- Sığırcılar pek çok viral, bakteriyel ve parazit enfeksiyonunun temel hedefleridir. Et ve süt
- 10 ürünleri sektörlerindeki süttan kesme, sığırcı sevkiyatı, soğuk hava ve besin ihtiyaçları gibi modern üretim uygulamalarında hastalığın görülme oranını arttıran risk faktörleri olarak hizmet edebilmektedir. Sığırcı solunum hastalığı (BRD) ya da daha sıklıkla anidığı gibi sığırcı solunum hastalığı kompleksi, hem süt hem de et sığırcılarında görülmektedir ve dünya genelinde sığırcı sektöründeki ekonomik kayıpları başlıca
- 15 nedenlerinden biridir. Bu kayıplar morbidite, mortalite, kilo alımının düşmesi, tedavi ve önleme maliyetleri, süt üretimi kaybı ve karkas özellikleri üzerinde negatif etkilerden kaynaklanmaktadır.

- BRD patojenezinin yukarıda bahsedildiği gibi bulaşıcı ajanlarla birlikte sayısız çevresel ve fizyolojik stres faktöründen kaynaklandığı düşünülmektedir. *Mannheimia*
- 20 (*Pasteurella*) *haemolytica*, *Pasteurella multocida* ve *Histophilus somni* (daha önceden *Haemophilus somnus*), sığırcı üst solunum yolunun normal florasının bir parçası olarak düşünülmektedir. Bunun aksine, alt solunum yolu mikrobiyal girişin önlenmesini hedefleyen sayısız immünolojik yolağı koruduğu nispeten steril bir ortamdır. Sığırcılar çevresel ve fizyolojik stres faktörlerine maruz kaldığında, hayvanın doğuştan gelen ve
- 25 kazanılmış bağışıklık fonksiyonları riske atılarak yukarıda bahsedilen bu organizmaların çoğalmasına ve akabinde alt solunum yolunda kolonize olmasına izin verilmektedir. Örneğin bulaşıcı sığırcı rhinotracheitis virüsü (IBRV, IBR veya BHV 1), sığırcı viral diyare virüsü (BVDV), sığırcı solunum sinsityal virüsü (BRSV) ve parainfluenza tip 3 virüsü (PI3) gibi çeşitli sığırcı virüslerinin akciğerde immünosüpresif etkileri olduğu

bilinmektedir. Bununla birlikte, *Mannheimia haemolytica* BRD vakaları arasında açık ara en yaygın bakteriyel patojendir.

BRD'nin mevcut önlenmesi ve tedavisi, besi yerlerine geldikten sonra sığırcı popülasyonlarına antibiyotik uygulaması (yani metaflaksi), hasta sığırcı için antibiyotik tedavisi ve BRD virüslerine ve *M. Haemolytica* dahil bakterilere karşı aşılamadan oluşmaktadır.

Mevcut aşılama programları ve farmasötik tedavilerin, günümüzde sığırcılarda BRD'nin kontrol edilmesi için ideal olmaması farklı nedenleri vardır. İlk olarak, konak savunma sistemi sığırcılarda bulaşıcı hastalıkla mücadelede önemli bir rol oynamaktadır. Geleneksel tedaviler bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek veya kontrol etmek için antibiyotik uygulanmasını içermektedir. Ancak viral enfeksiyonlara karşı herhangi bir onaylanmış farmasötik tedavi mevcut değildir. BRD'de, çoğu durumda yalnızca bakteriyel enfeksiyon değil, aynı zamanda viral enfeksiyon da vardır. İkinci olarak, aşılama zamanı genellikle ideal altındadır. Bir respiratuvar aşı için optimum şekilde etkili olması için, ürünün stresten veya sevkiyattan 2-4 hafta önce uygulanması gerekmektedir ve bu, tipik olarak ticari sığırcı üretiminde uygulanabilir değildir. Aşılar, optimum olarak etkili olamayacak şekilde ya çok erken ya da çok geç uygulanmaktadır. US 2006/223769 A1 sayılı belge, bir memelinin kanser, alerjik inflamasyon ile bağlantılı bir hastalık, bir bulaşıcı hastalık veya self-antijenin zararlı aktivitesi ile bağlantılı bir durumdan korunması için bağışıklık aktivasyonuna yönelik bir aşı ve yöntem ile ilgilidir. WO 2005/079506 A2 sayılı belge, bir memelinin kanser, alerjik inflamasyonla bağlantılı bir hastalık ve bir bulaşıcı hastalıktan korunması için sistemik bağışıklık aktivasyonuna yönelik bir yöntemle ilgilidir.

Bu nedenle, bağışıklık sistemini uyarmak ve hastalığa neden olan organizmaları azaltmak veya ortadan kaldırmak üzere saldırgan bir yanıt oluşturmak üzere bir yöntemle yönelik bir ihtiyaç bulunmaktadır. Bu yöntemin uygulanması kolay olması tek başına ya da aşılarla kombinasyon halinde işe yaraması veya bu aşıları daha etkili hale getirilmesine yardımcı olması uzun bir süresi olması ya da bağışıklığı maksimize etmek için ek enjeksiyon gerektirmemesi önem arz etmektedir. Mevcut buluş, uygulanması kolay olan, tek başına ya da aşılarla kombinasyon halinde işe yarayan, bir veya daha fazla bulaşıcı ajana karşı koruyucu yanıtı başlatabilen, sığırcı türlerinde antijen

spesifik olmayan bağışıklık yanıtının ortaya çıkarılmasına ilişkin bir yöntem sağlamaktadır.

BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI

Mevcut buluşa ait sığırcı türlerinin bir üyesinde bağışıklık yanıtının ortaya çıkarılmasına ilişkin yöntem, sığırcı türlerinin üyesine, sığırcılarda *Mannheimia haemolytica*'nin neden olduğu sığırcı solunum hastalığı (BRD) tedavisinde kullanılmak üzere bağışıklık yanıtını ortaya çıkarmak için bir immünomodülatör bileşiminin etkili bir miktarının uygulanmasını içermektedir. İmmünomodülatör bileşimi, [1-[2-[9-(Z)-oktadesenoiloksi]etil]-2-[8](Z)-heptadesenil]-3-[2-hidroksietil]imidazolyum klorür (DOTIM) ve kolestorel içeren bir katyonik lipozom iletim aracı ve bir nükleik asit molekülü içermektedir, burada nükleik asit molekülü, gen eklentisi içermeyen izole, bakteriden elde edilmiş kodlayıcı olmayan bir DNA plazmid vektörüdür. İlaveten, immünomodülatör tek başına etkili olan ya da bir aşıdan önce uygulandığında, bir aşı ile birlikte uygulandığında, aşılamadan sonra uygulandığında veya aşı ile karıştırıldığında bir aşı gibi en az bir biyolojik maddenin işleyişini arttıran, antijen spesifik olmayan bağışıklık yanıtını ortaya çıkarmaktadır.

Yöntemler, sığırcı türlerini bulaşıcı hastalıklardan korumaya ve bulaşıcı hastalık taşıyan popülasyonları tedavi etmeye yönelik yeni tedavi stratejileri sağlamaktadır. Son olarak, mevcut buluşun yöntemi, immünomodülatör bir aşı ile kombinasyon halinde kullanıldığında bir hastalığa karşı daha hızlı, daha uzun ve daha iyi koruma sağlamaktadır.

1. Bileşim

a. İmmünomodülatör

Buluşun bir uygulamasında immünomodülatör bileşimi, [1-[2-[9-(Z)-oktadesenoiloksi]etil]-2-[8](Z)-heptadesenil]-3-[2-hidroksietil]imidazolyum klorür (DOTIM) ve kolestorel içeren bir lipozom iletim aracı ve bir nükleik asit molekülü içermektedir, burada nükleik asit molekülü, gen eklentisi içermeyen izole, bakteriden elde edilmiş kodlayıcı olmayan bir DNA plazmid vektörüdür.

Uygun bir lipozom iletim aracı, nükleik asit moleküllerini tedavi edilen deneğin dokularına iletebilen bir lipid bileşimini içermektedir. Bir lipozom iletim aracı tercihen, bir nükleik asit molekülünü ve/veya bir biyolojik maddeyi iletmek için yeterli bir süre boyunca bir denekte kararlı kalabilmektedir. Bir uygulamada lipozom iletim aracı alıcılarda denekte en az yaklaşık 5 dakika kararlıdır. Bir başka uygulamada lipozom iletim aracı alıcılarda denekte en az yaklaşık 1 saat kararlıdır. Bir başka uygulamada lipozom iletim aracı alıcılarda denekte en az yaklaşık 24 saat kararlıdır.

Mevcut buluşa ait bir lipozom iletim aracı bir nükleik asit molekülünü bir hücreye iletmek için bir hücrenin plazma membranıyla kaynaşabilen bir lipid bileşimini içermektedir. Bir uygulamada, iletildiğinde, mevcut buluşa ait bir nükleik asit: lipozom kompleksi, iletilen nükleik asidin her mikrogramı (μg) için toplam doku proteininin miligramı (mg) başına ifade edilen en az yaklaşık 1 pikogram (pg) proteindir. Bir başka uygulamada nükleik asit: lipozom kompleksinin transfeksiyon verimliliği, iletilen nükleik asidin her μg 'si için toplam doku proteininin mg ' başına ifade edilen en az yaklaşık 10 p proteindir; ve bir başka uygulamada iletilen nükleik asidin her μg 'si için toplam doku proteininin mg ' başına ifade edilen en az yaklaşık 50 pg proteindir. Kompleksin transfeksiyon verimliliği, iletilen nükleik asidin her μg 'si için toplam doku proteininin mg ' başına ifade edilen 1 femtogram (fg) protein kadar düşük olabilmektedir; yukarıdaki miktarlar daha fazla tercih edilmektedir.

Mevcut buluşa ait tercih edilen lipozom iletim aracı çap olarak yaklaşık 100 ile 500 nanometre (nm) arasında, bir başka uygulamada yaklaşık 150 ile 450 nm arasında ve bir başka uygulamada yaklaşık 200 ile 400 nm arasındadır.

Burada ayrıca, örneğin alanda uzman kişilerce bilinen gen iletim yöntemlerinde yaygın olarak kullanılanlar gibi herhangi bir lipozomu içeren uygun lipozomlar da açılmaktadır. Örneğin, lipozom iletim araçları multilameler vezikül (MLV) lipidleri ve ekstrüde lipidleri içermektedir. MLV'lerin hazırlanmasına yönelik yöntemler alanda iyi bilinmektedir. Diğer örnekler ise, bir polikationik lipid bileşimine sahip lipozomlar (örn. kationik lipozomlar) ve/veya polietilen glikole konjuge bir kolesterol omurgasına sahip lipozomlar içermektedir. Örnek kationik lipozom bileşimleri arasında sınıflama olmaksızın N-[1-(2,3-dioleiloksi)propil]-N,N,N-trimetilamonyum klorür (DOTMA) ve kolesterol, N-[1-(2,3-dioleiloksi)propil]-N,N,N-trimetilamonyum klorür (DOTAP) ve

kolesterol, 1-[2-(oleoiloksi)etil]-2-oleil-3-(2-hidroksietil)imidazolinyum klorür (DOTIM) ve kolesterol, dimetildioktadesilamonyum bromür (DDAB) ve kolesterol ve bunlar ın kombinasyonları yer almaktadır.

Burada ayrıca, uygun bir nükleik asit molekülü olarak, kodlayıcı veya kodlayıcı olmayan sekans ve DNA veya RNA gibi herhangi bir nükleik asit sekansı aç ıklanmaktadır. Kodlayıcı nükleik asit sekansları bir proteinin veya peptidin en az bir kısmını kodlarken, kodlayıcı olmayan sekans bir proteinin veya peptidin herhangi bir kısmını kodlamamaktadır. Mevcut buluşa göre “kodlayıcı olmayan” nükleik asitler, bir promotör bölgesi gibi bir transkripsiyon biriminin düzenleyici bölgelerini içerebilmektedir. “Boş vektör” ifadesi, “kodlayıcı olmayan” ifadesi ile değişimli olarak kullan ılabilmektedir ve özellikle bir gen eklentisi içermeyen bir plazmid vektörü gibi bir protein kodlayıcı kısım olmadan bir nükleik asit sekansını ifade etmektedir. Bir nükleik asit molekülü tarafından kodlanan bir proteinin ekspresyonu, antijen spesifik olmayan bağışıklık yanıtının ortaya çıkarılması için gerekli değildir; bu nedenle, nükleik asit molekülünün ille de bir transkripsiyon kontrol sekansına işlevsel olarak bağlı olması gerekli değildir. Bununla birlikte, bileşime bir immünojeni ve/veya bir sitokini kodlayan nükleik asit sekansını (DNA veya RNA) ekleyerek başka avantajlar elde edilebilmektedir (örn. antijen spesifik ve art ımlı bağışıklık).

Bir lipozomun bir nükleik asit molekülü ile kompleks hale getirilmesi, alanda standart olan veya 6,693,086 sayılı ABD patentinde açıklanan yöntemler kullanılarak elde edilebilmektedir. Bir lipozoma eklenecek nükleik asit molekülünün uygun konsantrasyonu, sistemik bir bağışıklık yanıtının ortaya çıkarılacağı şekilde bir deneğe nükleik asit molekülünün yeterli bir miktarını iletilmesi için etkili bir konsantrasyonu içermektedir. Bir uygulamada yaklaşık 0.1 µg ila yaklaşık 10 µg nükleik asit molekülü, yaklaşık 8 nmol lipozomla birleştirilmektedir, bir başka uygulamada yaklaşık 0.5 µg ila yaklaşık 5 µg nükleik asit molekülü yaklaşık 8 nmol lipozomla birleştirilmektedir ve bir başka uygulamada yaklaşık 1.0 µg nükleik asit molekülü yaklaşık 8 nmol lipozomla birleştirilmektedir. Bir uygulamada bir bileşimdeki nükleik asitlerin lipidlere oranı (µg nükleik asit: nmol lipid), ağırlıkça en az yaklaşık 1:1 nükleik asit: lipid (örn. 1 µg nükleik asit: 1 nmol lipid) şeklinde ve bir başka uygulamada en az yaklaşık 1:5 şeklinde ve bir başka uygulamada en az yaklaşık 1:10 şeklinde ve başka bir uygulamada en az

yaklaşık 1:20 şeklindedir. Burada ifade edilen oranlar, bileşimdeki toplam lipid miktarına göre değil de, bileşimdeki katyonik lipid miktarına göredir. Bir başka uygulamada buluşa ait bir bileşimdeki nükleik asitlerin lipidlere oranı, yaklaşık olarak yaklaşık 1:1 ile yaklaşık 1:80 nükleik asit: lipid şeklindedir ve bir başka uygulamada yaklaşık 1:2 ile yaklaşık 1:40 nükleik asit: lipid şeklindedir ve bir diğer uygulamada yaklaşık 1:3 ile yaklaşık 1:30 nükleik asit: lipid şeklindedir ve bir başka uygulamada yaklaşık 1:6 ile yaklaşık 1:15 nükleik asit: lipid şeklindedir.

b. Biyolojik madde

Buluşun bir başka uygulamasında immünomodülatör, bir lipozom iletim aracı bir nükleik asit molekülü ve en az bir biyolojik madde içermektedir.

Uygun biyolojik maddeler sığırtı hastalığının önlenmesinde veya tedavisinde etkili olan ajanlardır. Bu tür biyolojik maddeler arasında bağışıklık artırıcı proteinler, immünojenler, aşılarda, antimikrobiyaller veya bunların herhangi bir kombinasyonu yer almaktadır. Uygun bağışıklık artırıcı proteinler bağışıklık artırıcı bilinen proteinlerdir. Sınırlanmış olmayan bir örnek olarak protein ailesini içeren bir sitokin, bilinen bir bağışıklık artırıcı protein ailesidir. Uygun immünojenler, bir immünojenin bir deneye uygulanması deneyin dokular içerisinde karşılaşılan aynı veya benzer proteinlere karşı immünojen spesifik bir bağışıklık yanıtı başlatacağı şekilde hücrel ve/veya hücrel bağışıklık yanıtı ortaya çıkaran proteinlerdir. Bir immünojen, bir bakteri, bir virüs, bir parazit ve bir mantar tarafından eksprese edilen bir patojenik antijeni içerebilmektedir. Tercih edilen antijenler bir denekte bulaşıcı bir hastalığa neden olan antijenleri içermektedir. Mevcut buluşa göre bir immünojen, doğal oluşumlu veya sentetik olarak elde edilmiş olan, hücrel ve/veya hücrel bağışıklık yanıtı ortaya çıkaran bir proteinin herhangi bir kısmı olabilmektedir. Bu haliyle, bir antijenin veya immünojenin boyutu yaklaşık 5-12 amino asit kadar küçük ve tam boy bir protein kadar büyük olabilmektedir; bunların arasındaki boyutlar da dahildir. Antijen, bir multimer protein veya füzyon proteini olabilmektedir. Antijen, dokunulmamış veya rekombinant hücrelerden elde edilen saflaştırılmış peptid antijenleri olabilmektedir. Bağışıklık artırıcı proteinlerin ve immünojenlerin nükleik asit sekansları bir transkripsiyon kontrol sekansına işlevsel olarak bağlıdır, öyle ki immünojen bir deneyin dokusunda eksprese

edilmektedir ve böylece spesifik olmayan bağışıklık yanıtına ek olarak denekte immünojen spesifik bir bağışıklık yanıtını ortaya çıkarabilmektedir.

Buluşun bir başka uygulamasında biyolojik madde bir aşıdır. Aşı canlı, bulaşıcı, viral, bakteriyel veya parazit aşılara da öldürülmüş, etkisizleştirilmiş, viral, bakteriyel veya parazit aşılardan içerebilmektedir. Bir uygulamada canlı veya öldürülmüş viral aşılardan olmak üzere bir veya daha fazla aşı mevcut buluşun immünomodülatör bileşimi ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Uygun aşılardan seçilen türlerine yönelik alanda bilinen aşılardan içermektedir. Örnek aşılardan arasında sıklıkla olmaksızın bulaşıcı sıklıkla üst rhinotracheitis (IBR) (Tip 1 sıklıkla herpes virüsü (BHV1)), parainfluenza virüs tip 3 (PI3), sıklıkla solunum sinsityal virüsü (BRISV), sıklıkla viral diyare virüsü (BVDV Tip 1 ve 2), *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis* ve alanda bilinen diğer hastalıklara karşı koruma için alanda kullanılan aşılardan yer almaktadır. Örnek bir uygulamada *Mannheimia haemolytica*'ya karşı korumaya yönelik bir aşı, mevcut buluşun immünomodülatör bileşimi ile kombinasyon halinde kullanılabilir.

15 Buluşun bir başka uygulamasında biyolojik madde bir antimikrobiyaldir. Uygun antimikrobiyaller şunları içermektedir: kinolonlar, tercihen florokinolonlar, β -laktamlar ve makrolid-streptogramin-linkozamid (MLS) antibiyotikleri.

Uygun kinolonlar arasında benofloksasin, binfloksasin, sinoksasin, siprofloksasin, klinafloksasin, danofloksasin, difloksasin, enoksasin, enrofloksasin, fleroksasin, 20 gemifloksasin, ibafloksasin, levofloksasin, lomefloksasin, marbofloksasin, moksifloksasin, norfloksasin, ofloksasin, orbifloksasin, pazufloksasin, pradofloksasin, perfloksasin, temafloksasin, tosufloksasin, sarafloksasin, gemifloksasin ve sparfloksasin yer almaktadır. Tercih edilen florokinolonlar arasında siprofloksasin, enrofloksasin, moksifloksasin, danofloksasin ve pradofloksasin yer almaktadır. Uygun naftiridonlar 25 arasında nalidiksik asit yer almaktadır.

Uygun β -laktamlar arasında penisilinler, mesela benzatin penisilin, benzilpenisilin (penisilin G), fenoksimetilpenisilin (penisilin V), prokain penisilin, metisilin, oksasilin, nafsilin, kloksasilin, dikloksasilin, flukloksasilin, temosilin, amoksisilin, ampisilin, ko-amoksiklav (amoksisilin ve klavulanik asit), azlosilin, karbenisilin, tikarsilin, 30 mezlosilin, piperasilin; sefalosporinler, mesela sefalonyum, sefalekssin, sefazolin,

sefapiririn, sefkuinom, seftiofur, sefalotin, sefaklor, sefuroksim, sefamandol, defotetan, sefoksitin, seftriakson, sefotaksim, sefpodoksim, sefiksim, seftazidim, sefepim, sefpirom; karbapenemler ve penemler, mesela imipenem, meropenem, ertapenem, faropenem, doripenem; monobaktamlar, mesela aztreonam (Azactam), tigemonam, nokardisin A, tabtoksinin-B-laktam; ve klavulanik asit, tazobaktam, ve sulbaktam gibi β -laktamaz inhibitörleri yer almaktadır. Tercih edilen β -laktamlar arasında sefalosporinler, özellikle sefazolin yer almaktadır.

Uygun MLS antibiyotikleri arasında her türlü makrolid, linkomisin, klindamisin, pirlimisin yer almaktadır. Tercih edilen bir linkosamid pirlimisindir.

Diğer antimikrobiyaller arasında 2-piridonlar, tetrasiklinler, sülfonamidler, aminoglikozidler, trimetoprim, dimetridazoller, eritromisin, framisetin, furazolidon, çeşitli pleuromutilinler, mesela tiamulin, valnemulin, çeşitli streptomisin, klopidol, salinomisin, monensin, halofuginon, narasin, robenidin vb. yer almaktadır.

2. Yöntemler

15 a. Bağışıklık stimülasyon yöntemleri

Buluşun bir uygulamasında sığırcı türlerinin üyesine bir immünomodülatör bileşiminin etkili bir miktarını uygulanması yoluyla sığırcı türlerinin bir üyesinde bir bağışıklık yanıtı ortaya çıkarılmaktadır. Etkili miktar, sığırcı türlerinin üyesinde bağışıklık yanıtı ortaya çıkarmak için yeterlidir. İmmünomodülatör, bir lipozom iletim aracı ve bir nükleik asit molekülü içermektedir.

Bir uygulamada immünomodülatörün etkili miktarı, hayvan başına yaklaşık 1 mikrogram ile yaklaşık 1000 mikrogram arasındadır. Bir başka uygulamada immünomodülatörün etkili miktarı, hayvan başına yaklaşık 5 mikrogram ile yaklaşık 500 mikrogram arasındadır. Bir başka uygulamada immünomodülatörün etkili miktarı, hayvan başına yaklaşık 10 mikrogram ile yaklaşık 100 mikrogram arasındadır. Bir diğer uygulamada immünomodülatörün etkili miktarı, hayvan başına yaklaşık 10 mikrogram ile yaklaşık 50 mikrogram arasındadır.

Buluşun bir başka uygulamasında bir lipozom iletim aracı, bir izole nükleik asit molekülü ve bir biyolojik madde içeren bir immünomodülatörün etkili bir miktarının uygulanması yoluyla sığırcı türlerinin bir üyesinde bir bağışıklık yanıtı ortaya çıkarılmaktadır. Biyolojik maddenin immünomodülatörle karıştırılabilmesi veya birlikte uygulanması veya bundan bahşimsiz uygulanması düşünülmüştür. Bahşimsiz uygulama, immünomodülatörün uygulanmasından önce veya sonra olabilmektedir. Aynı zamanda artırımsız bağışıklığı uzatmak için immünomodülatörün veya biyolojik maddenin birden fazla uygulanması da düşünülmüştür. Ayrıca, birden fazla biyolojik madde immünomodülatörle birlikte uygulanabilmektedir, immünomodülatörden önce uygulanabilmektedir, immünomodülatörden sonra uygulanabilmektedir ve eş zamanlı olarak uygulanabilmektedir.

b. Hastalıklar

Buluşun yöntemleri, deneğin bağışıklık yanıtını ortaya çıkarmasına uygun olan bir hastalıktan korunacağı şekilde bir denekte bağışıklık yanıtı ortaya çıkarmaktadır. Burada kullanılan haliyle “bir hastalıktan korunma” ifadesi, hastalığın semptomlarını azaltması, hastalığın görülme oranını azaltması ve hastalığın klinik veya patolojik şiddetinin azaltılması veya bir hastalığa neden olan patojenin bulaşmasını azaltması ifade etmektedir. Bir deneğin korunması, bir deneğe uygulandığında mevcut buluşun terapötik bileşiminin hastalığın görülmesini önleme, hastalığın semptomlarını, klinik belirtileri, patolojiyi veya nedenleri sağaltma ve/veya hafifletme veya azaltma yeteneğini ifade etmektedir. BRD'nin klinik belirtilerinin örnekleri arasında akciğer lezyonları, sıdıklık artışı, depresyon (örn. anoreksiya, harici uyarılara yanıt verilebilirliğin azalması, sarkık kulaklar), burun akıntısı ve solunum karakteri (örn. solunum hızı, solunum eforu) yer almaktadır. Bu haliyle, sığırcı türlerinin bir üyesinin bir hastalıktan korunması hem hastalığın oluşmasını önlenmesini (profilaktik tedavi) hem de hastalığın taşıyan sığırcı türlerinin üyesinin tedavi edilmesini (terapötik tedavi) içermektedir. Özellikle, bir deneğin hastalıktan korunması, bazı durumlarda ayrıca aşırı aktif veya zararlı bağışıklık yanıtını bastırabilen, azaltabilen, inhibe edebilen veya bloke edebilen faydalı veya koruyucu bir bağışıklık yanıtını uyarması yoluyla sığırcı türlerinin üyesinde bağışıklık yanıtını ortaya çıkarılması ile gerçekleştirilmektedir. “Hastalık” terimi, sığırcı türlerinin bir üyesinin normal sağlığından her türlü sapmayı

ifade etmektedir ve hastalık semptomlarının mevcut olduğu bir durumun yanı sıra, bir sapmanın (örn. enfeksiyon, gen mutasyonu, genetik defekt vb.) meydana geldiği, ancak semptomları henüz kendini göstermediği durumları kapsamaktadır.

5 Buluşun yöntemleri, hastalığın önlenmesi, hastalığa karşı efektif hücre bağışıklığının uyarılmasını hastalığın giderilmesi, hastalığın hafifletilmesi ve bir primer hastalığın oluşmasından kaynaklanan bir sekonder hastalığın önlenmesi için kullanılabilir.

Mevcut buluş aynı zamanda, aşının kendisinin uygulanmasına karşı bir aş ile birlikte uygulandığında hayvanın kazanılmış bağışıklık yanıtını iyileştirebilmektedir. Genel olarak, bir aş uygulandıktan sonra, hayvan hemen korunmaktadır, çünkü kazanılmış bağışıklığın uyarılması zaman almaktadır. “İyileştirmek” terimi, mevcut buluşta, aşın hayvanı korumaya başlayana kadar hayvandaki doğuştan gelen bağışıklık yanıtının ortaya çıkarılmasını ve/veya kazanılmış bağışıklık aracılığıyla aş ile sağlanan koruma süresinin uzatılmasını ifade etmektedir.

15 Buluşun yöntemleri, çok çeşitli patojenlerin enjeksiyonuna karşı koruma sağlamak için bileşimin uygulanmasını içermektedir. Uygulanan bileşim spesifik bir yanıtı ortaya çıkarmak için spesifik bir antijen içerebilmekte veya içermeyebilmektedir. Buluşun yöntemlerinin, alıcı deneği sınırlama olmaksızın virüsler, bakteriler, mantarlar ve parazitler dahil olmak üzere bulaşıcı mikrobiyal ajanlardan kaynaklanan hastalıklardan koruyacağı düşünülmektedir. Örnek viral bulaşıcı hastalıklar arasında sınırlama

20 olmaksızın bulaşıcı sığırt rhinotracheitis (IBR) (Tip 1 sığırt herpes virüsü (BHV1)), parainfluenza virüsü tip 3 (PI3), sığırt solunum sinsityal virüsü (BRVS), sığırt viral diyare virüsü (BVDV Tip 1 ve 2), sığırt adenovirus, sığırt coronavirüs (BCV), sığırt kalisivirüs, sığırt parvovirüs, BHV4, sığırt reovirüs, sığırt enterovirüs, sığırt lösemi virüsü, rabies virüsü, Veziküler stomatit virüsü (VSV), bluetongue (Orbivirus), bunların

25 rekombinantları ve alanda bilinen diğer virüsler yer almaktadır. Örnek bakteriyel enfeksiyonlar arasında sınırlama olmaksızın gram pozitif ve negatif bakterileri ve Escherichia coli, Pasteurella multocida, Clostridium perfringens, Clostridium colinum, Campylobacter jejuni, Clostridium botulinum, Clostridium novyi, Clostridium chauveoi, Clostridium septicum, Clostridium hemolyticum, Clostridium tetani, Mannheimia

30 haemolytica, Ureaplasma diversum, Mycoplasma dispar, Mycoplasma bovis, Mycoplasma bovirhinis, Histophilus somni, Campylobacter fetus, Leptospira spp.,

Arcanobacterium pyogenes, Bacillus anthrax, Fusobacterium necrophorum, Fusobacterium spp., Treponema spp., Corynebacterium, Brucella abortus, Mycobacterium paratuberculosis, Mycobacterium spp., Histophilus spp., Moraxella spp., Muellerius spp., Mycoplasma spp., Salmonella spp., Bacillus anthracis gibi
5 Mikobakteriler ve alanda bilinen diğer bakterilerle enfeksiyondan kaynaklananlar yer almaktadır. Örnek mantar ve küf enfeksiyonları arasında sınırlama olmaksızın Actinobacterim spp., Aspergillus spp. ve Histomonas spp. ve alanda bilinen diğer bulaşıcı mantar veya küflerle enfeksiyondan kaynaklananlar yer almaktadır. Örnek parazitler arasında sınırlama olmaksızın Neospora spp., Trichostrongylus, Cooperia,
10 Anaplasma spp, Babesia spp, Chorioptes spp, Cysticercus spp, Dermatophilus spp, Damalinia bovis, Dictylocaulus spp, Eimeria spp, Eperythrozoon spp, Haemonchus spp,, Melophagus spp, Muellerius spp, Nematodirus spp, Oestrus spp, Ostertagia spp, Psoroptes spp, Sarcophages spp, Serpents spp, Strongyloides spp, Toxoplasma spp, Trichuris spp, Trichophyton spp, and Tritrichomas spp, Fascioloides spp, Anaplasma
15 marginale ve alanda bilinen diğer parazitler yer almaktadır.

c. Denekler

Buluşun yöntemleri, ister evcil ister yabani olsun sığırcı türlerinden herhangi bir deneğe veya üyeye uygulanabilmektedir. Özellikle damızlık, et veya süt üretimi için ticari olarak yetiştirilen deneklere uygulanabilmektedir. Uygun sığırcı türleri arasında sınırlama
20 olmaksızın antiloplar, bufalolar, tıbet öküzleri, sığırcılar ve bizonlar yer almaktadır. Bir uygulamada sığırcı türlerinin üyesi sığırcıdır. Sığırcı türleri arasında sınırlama olmaksızın inekler, boğalar, danalar, düveler, öküz, et sığırcı veya süt sığırcı yer almaktadır. Alanda uzman kişi, buluşun yöntemlerinin bulaşıcı ajana çevresel maruziyete özellikle açık olduklarından damızlık, et veya süt üretimi için yetiştirilen sığırcılar için büyük ölçüde
25 faydalı olduğunu anlayacaktır.

d. Uygulama

Çeşitli uygulama yolları mevcuttur. Seçilen özel biçim, elbette seçilen belirli biyolojik maddelere, deneğin yaşına ve genel sağlık durumuna, tedavi edilen belirli duruma ve terapötik etkinlik için gerekli olan dozaja bağlı olacaktır. Bu buluşun yöntemleri, klinik
30 olarak kabul edilebilir olmayan yan etkilere neden olmadan etkili bağışıklık yanıtı

seviyeleri üreten herhangi bir uygulama biçimi kullanılarak uygulanabilmektedir. Bileşimler uygun bir biçimde, birim dozaj formunda sunulabilmektedir ve alanda iyi bilinen herhangi bir yöntemle hazırlanabilmektedir.

- 5 Sığır türlerinin aşılınması her yaşta yapılabilmektedir. Aşırı intravenöz yolla, intramüsküler yolla, intradermal, intraperitoneal, subkütan yolla, sprey/aerosol yoluyla, oral yolla, intraoküler yolla, intratrakeal yolla, intranasal yolla veya alanda bilinen diğer yöntemlerle uygulanabilmektedir. Ayrıca, buluşun yöntemlerinin rutin aşılama programlarına göre kullanılması da düşünülmüştür. İmmünomodülatör de intravenöz yolla, intramüsküler yolla, subkütan yolla, sprey yoluyla, oral yolla, 10 intraoküler yolla, intratrakeal yolla, nazal yolla veya alanda bilinen diğer yöntemlerle uygulanabilmektedir. Bir uygulamada immünomodülatör subkütan yolla uygulanmaktadır. Bir başka uygulamada immünomodülatör intramüsküler yolla uygulanmaktadır. Bir başka uygulamada immünomodülatör sprey olarak uygulanmaktadır. Bir diğer uygulamada immünomodülatör oral yolla uygulanmaktadır.
- 15 Bir uygulamada immünomodülatör, yükleme (veya enfeksiyon) öncesinde hayvana kendi başına uygulanmaktadır. Bir başka uygulamada immünomodülatör, yükleme (veya enfeksiyon) sonrasında hayvana kendi başına uygulanmaktadır. Bir başka uygulamada immünomodülatör, yükleme (veya enfeksiyon) ile aynı anda hayvana kendi başına uygulanmaktadır. Bir diğer uygulamada immünomodülatör bileşimi, yükleme 20 öncesinde aşı ile aynı anda birlikte uygulanmaktadır. Bir başka uygulamada immünomodülatör bileşimi, yükleme (veya enfeksiyon) ile aynı anda aşı ile aynı anda birlikte uygulanmaktadır. Birlikte uygulama, aşı ve immünomodülatörün hayvanda aynı genel yerde birbirinin yanında iki farklı bölgede (örneğin hayvanın boynunda birbirinin yanında enjeksiyonlar), aynı genel yerde hayvanın karşıklı taraflarında (örneğin 25 boynun her tarafında) veya aynı hayvanın farklı yerlerinde uygulanması içerebilmektedir. Bir başka uygulamada immünomodülatör bileşimi, aşı ve yükleden önce uygulanmaktadır. Bir diğer uygulamada immünomodülatör bileşimi, aşılamadan sonra ancak yükleden önce uygulanmaktadır. Bir diğer uygulamada immünomodülatör bileşimi, yükleden (veya enfeksiyondan) önce aşı yapımı bir 30 hayvana yükleden sonra uygulanmaktadır.

Bir uygulamada immünomodülatör, yüklemekten yaklaşık 1 ila yaklaşık 14 gün önce veya yüklemekten yaklaşık 1 ila yaklaşık 14 gün sonra uygulanmaktadır. Bir başka uygulamada immünomodülatör, yüklemekten yaklaşık 1 ila yaklaşık 7 gün önce veya yüklemekten yaklaşık 1 ila yaklaşık 7 gün sonra uygulanmaktadır. Bir başka uygulamada immünomodülatör, yüklemekten 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 gün önce veya yüklemekten 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 gün sonra uygulanmaktadır.

Diğer iletim sistemleri, yavaş salınım, geciktirilmiş salınım veya uzatılmış salınım iletim sistemlerini içerebilmektedir. Bu tür sistemler bileşimlerin tekrar tekrar uygulanmasını önüne geçebilmekte, dolayısıyla uygunluğu artmaktadır. Salınım iletim sistemlerinin pek çok türü mevcuttur ve alanda olağan tecrübe sahibi kişilerce bilinmektedir. Bunlar poli(laktit-glikolid), kopolioksalatlar, polikaprolaktonlar, poliesteramidler, poliortoesterler, polihidroksibütirik asit ve polianhidritler gibi polimer bazlı sistemleri içermektedir. Yukarıda verilen polimerleri içeren ilaçları mikro kapsülleri örneğin 5,075,109 sayılı ABD patentinde açıklanmıştır. İletim sistemleri ayrıca, kolesterol, kolesterol esterleri ve yağ asitleri veya nötr yağlar, mesela mono-di ve tri-gliseritler gibi steroller içeren lipidler olan polimer olmayan sistemleri; hidrojel salınım sistemlerini; silastik sistemleri; peptid bazlı sistemleri; vaks kaplamaları; geleneksel bağlayıcılar ve eksipiyanlar içeren sıkıştırılmış tabletleri; kısımlen kaynaşmış implantlar ve benzerlerini içermektedir. Spesifik örnekler arasında sınırlama olmaksızın, buluşa ait bir ajanın 4,452,775, 4,675,189 ve 5,736,152 sayılı ABD patentlerinde açıklananlar gibi bir matris içinde bir formda bulunduğu erozyonel sistemleri ve bir aktif bileşenin 3, 854,480, 5,133,974 ve 5,407,686 sayılı ABD patentlerinde açıklanmış gibi bir polimerden kontrollü hızda geçtiği difüzyonel sistemleri içermektedir. İlave, pompa bazlı donanım iletim sistemleri kullanılabilmekte olup, bunların bazıları implantasyon için adapte edilmiştir.

Yukarıdaki bileşimde, ürünlerde ve yöntemlerde buluşun kapsamından uzaklaşmadan çeşitli değişiklikler yapılabileceğinden, yukarıdaki açıklamada ve aşağıda verilen örneklerde yer alan tüm konunun sınırlayıcı anlamda değil de açıklayıcı olarak yorumlanması amaçlanmıştır.

30 TANIMLAR

“Etkili miktar” terimi, istenen biyolojik etkiyi gerçekleştirmek için gerekli veya yeterli olan miktarı ifade etmektedir. Örneğin, bir bulaşıcı hastalığın tedavisine veya önlenmesine yönelik immünomodülatörün etkili miktarı, mikroba maruz kalınması sonrasında bağışıklık yanıtının gelişmesine neden olmak, böylece denekteki mikrop miktarının azalmasını ve tercihen mikrobun kökünü kazınmasını sağlamak için gerekli miktardır. Herhangi bir belirli uygulama için etkili miktar, tedavi edilen hastalık veya durum, deneğin büyüklüğü veya hastalığın veya durumun şiddeti gibi faktörlere göre değişiklik gösterebilmektedir. Alanda olağan tecrübe sahibi bir kişi, gereksiz deneyleri gerektirmeden immünomodülatörün etkili miktarını empirik olarak belirleyebilecektir.

10 “Sitokin” terimi, bağışıklık artıran protein ailesini ifade etmektedir. Sitokin ailesi, hematopoietik büyüme faktörünü, interlökinleri, interferonları, immünglobulin üst ailesi moleküllerini, tümör nekroz faktörü ailesi moleküllerini ve kemokinleri (örn. hücrelerin göçünü ve aktivasyonunu düzenleyen proteinler, özellikle fagositik hücreler) içermektedir. Örnek sitokinler arasında sıklıkla kullanılan interlökin-2 (IL-2),
15 interlökin -12 (IL12), interlökin-15 (IL-15), interlökin-18 (IL-18), interferon-a (IFN α) ve interferon- γ (IFN γ) yer almaktadır.

“Ortaya çıkarmak” terimi, aktive etmek, uyarmak, üretmek veya yukarıya regüle etmek terimleri ile değişimli olarak kullanılabilir.

Bir denekte “bağışıklık yanıtının ortaya çıkarılması” ifadesi, spesifik olarak bağışıklık yanıtının aktivitesinin kontrol edilmesini veya etkilenmesini ifade etmektedir ve
20 bağışıklık yanıtının aktive edilmesini, bağışıklık yanıtının yukarıya regüle edilmesini, bağışıklık yanıtının artırılmasını ve/veya bağışıklık yanıtının değiştirilmesini (mesela bir denekteki hakim bağışıklık yanıtı tipini, zararlı veya etkisiz olandan faydalı veya koruyucu olana değiştiren bir bağışıklık yanıtı tipinin ortaya çıkarılması yoluyla)
25 içerebilmektedir.

“İşlevsel olarak bağlı” ifadesi, bir nükleik asit molekülünün, molekülün bir konak hücreye transfekte edildiğinde (örneğin transforme edildiğinde, transdüse edildiğinde veya transfekte edildiğinde) eksprese edilebileceği şekilde bir transkripsiyon kontrol sekansına bağlanmasını ifade etmektedir. Transkripsiyonel kontrol sekansları
30 transkripsiyonun başlamasını, uzamasını ve sonlanmasını kontrol eden sekanslardır.

Özellikle önemli transkripsiyonel kontrol sekansları, örneğin promotör, artırdı, operatör ve represör sekansları gibi transkripsiyon başlamasını kontrol eden sekanslardır. Bu transkripsiyonel kontrol sekanslarının çeşitleri alanda uzman kişilerce bilinmektedir. Tercih edilen transkripsiyonel kontrol sekansları kuş, balık, memeli, bakteri, bitki ve böcek hücrelerinde işlev gösteren sekansları içermektedir. Buluşla herhangi bir transkripsiyonel kontrol sekansını kullanılabilmekle birlikte, sekanslar bir immünojeni veya bağışıklık uyarıcı proteini kodlayan bir sekansla doğal olarak bağlantı olan doğal oluşumlu transkripsiyon kontrol sekanslarını içerebilmektedir.

“Nükleik asit molekülü” ve “nükleik asit sekansı” ifadeleri değişimli olarak kullanılabilmektedir ve DNA, RNA’ya da DNA veya RNA’nın türevlerini içerebilmektedir. Bu terimler ayrıca oligonükleotidleri ve hem bir proteini veya bunun bir fragmanını kodlayan nükleik asit molekülleri hem de regülatör bölgelerini, intronları veya diğer kodlayıcı olmayan DNA veya RNA’yı içeren nükleik asit molekülleri dahil olmak üzere daha büyük sekansları içermektedir. Tipik olarak, bir oligonükleotid yaklaşık 1 ila yaklaşık 500 nükleotid arasında bir nükleik asit sekansına sahiptir ve daha tipik olarak en az yaklaşık 5 nükleotid uzunluğundadır. Nükleik asit molekülü memeliler, balık, bakteri, böcek, viral, bitki veya sentetik kaynaklar dahil olmak üzere herhangi bir kaynaktan elde edilebilmektedir. Bir nükleik asit molekülü, rekombinant DNA teknolojisi (örn. polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), amplifikasyon, klonlama) veya kimyasal sentez gibi alanda yaygın olarak bilinen yöntemlerle üretilebilmektedir. Nükleik asit molekülleri sınırlama olmaksızın, doğal allelik varyantları ve bu tür modifikasyonları, nükleik asit molekülünün mevcut buluşun yöntemlerinde faydalı olan bir immünojeni veya bağışıklık uyarıcı proteini kodlama yeteneğine büyük ölçüde müdahale etmeyeceği şekilde nükleotidlerin eklendiği, silindiği, süstitüe edildiği veya tersine çevrildiği modifiye nükleik asit moleküllerini içeren doğal nükleik asit moleküllerini ve bunların homologlarını içermektedir. Bir nükleik asit homoloğu alanda uzman kişilerce bilinen bir dizi yöntem kullanılarak üretilebilmektedir (bkz., örneğin Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989). Patojen antijen immünojenitesi veya sitokin aktivitesi gibi immünojenite için tarama teknolojileri alanda uzman kişilerce bilinmektedir ve çeşitli in vitro ve in vivo testleri içermektedir.

ÖRNEKLER

Aşağıdaki örnekler buluşun çeşitli uygulamalarını göstermektedir.

Örnek 1. Doğal sığırcı solunum hastalığı görülmeden önce veya görüldükten sonra bir DNA immünomodülatörü alan ineğin değerlendirilmesi.

- 5 Bu çalışmanın amacı doğal BRD vakaları görülmeden önce ve görüldükten sonra sığırcılara uygulanan DNA immünomodülatörünün etkinliğini belirlemektir.

İmmünomodülatör

Bu çalışmada kullanılan immünomodülatör bir katyonik lipid ve kodlayıcı olmayan DNA içeren bir bileşimdir. Sentetik immünomodülatör lipid bileşenleri [1-[2-[9-(Z)-oktadesenoiloksi]]-2-[8](Z)-heptadesenil]-3-[hidroksietil]imidazolinyum klorür (DOTIM) ve bir sentetik nötr lipid kolesterol formüle edilerek çapı yaklaşık 200 nm olan lipozomlar üretilmiştir (Bkz., U.S. Patent 6,693,086). DNA bileşeni, E. Coli'de üretilmiş 4242 baz çift kodlayıcı olmayan DNA plazmidi olup, bu, negatif yüklü olarak pozitif yüklü (katyonik) lipozomlarla birleşmektedir (Bkz., U.S. Patent 6,693,086).

15 **Çalışma Hayvanları**

Sütten kesme yaşında olan 84 Siyah-Alaca sığırcı mevcut solunum hastalığı geçmişi olmayan bir sürüden seçilmiştir. Her bir ayrı sığırcı ilk başta değerlendirilmiş ve sağlık durumunun iyi olduğu belirlenmiştir. 84 sığırcı, her biri 12 sığırcıdan oluşan yedi tedavi grubuna bölünmüştür. Yalnızca Mannheimia haemolytica için aşlanmamış olan hayvanlar çalışmaya dahil edilmiştir. Hayvanların hiç biri, DNA immünomodülatörünün uygulanmasından önceki 30 gün içerisinde bir antimikrobiyal ajan almamıştır.

Tedavi gruplarına, yukarıda açıklanan DNA immünomodülatörünün değişen dozları aşağıda Tablo 1.1'de belirtildiği gibi tedavi gününde uygulanmıştır. DNA immünomodülatörünün seyreltme şeması Tablo 1.2'de verilmiştir. DNA immünomodülatörü intramüsküler yolla ve sol omuza kraniyal olarak, nokal ligamente ventral olarak ve sığırcıların juguler oluklarına kaudo-dorsal olarak uygulanmıştır.

Aşağıda bahsedildiği gibi, Tedavi Gün -1, sığırların değerlendirildiği ve çalışma için uygun olarak belirlendiği ilk seçimden sonra çalışmanın başlangıç tarihini ifade etmektedir. Tedavi Gün 0, Gün -1'den bir gün sonrasındır ve bu şekilde devam etmektedir.

5

Tablo 1.1. İmmünomodülatörün Uygulama Programı

Tedavi sayıs	DNA İmmünomodülatör Dozu (μg)	İmmünomodülatör Uygulama Günü	Tedavi grubu başına Hayvan
1	500	-1	12
2	200	-1	12
3	50	-1	12
4	500	0	12
5	200	0	12
6	50	0	12
7	0 (Kontrol)	Uygulanmaz	12

Sığırların büyük bir kısmında, 0. Gün sabahında değişen düzeylerde BRD yaşadığı gözlemlenmiştir. 5. Güne kadar çalışma popülasyonunda kalan sığırların tümünün BRD morbiditesi için vaka tanınması karşılığında gözlemlenmiştir. Sığırlar, yalnızca şiddetli BRD nedeniyle ötenazi endike edilmişse çalışma popülasyonundan çıkarılmıştır. Herhangi bir başka bulaşıcı/bulaşıcı olmayan hastalık gözlemlenmemiştir ve dolayısıyla bu çalışmadan çıkarılma gerektirmemiştir.

Değerlendirme

Çalışmanın 1-5. Gününde sığırlar çeşitli sağlık göstergeleri açısından değerlendirilmiştir. Örneğin, rektal sıcaklık ve ortalama günlük kilo, çalışma uzunluğu boyunca her gün her sığır için belirlenmiştir. Hayvanlar, 1. Gün ile 5. Gün arasında her gün yaklaşık olarak aynı zamanda (+/- 3 saat) değerlendirilmiştir. Uygulanan 5 immünomodülatör dozuna göre rektal sıcaklıkların ortalaması ve ortalama günlük kilo alınması analiz edilmiştir.

5. Günde, tüm sığırlara ötenazi uygulanmış ve otopsi yapılmıştır. Otopsi sırasında her ayrı sığır için akciğer lezyon skorları belirlenmiştir (görsel muayene ve manuel dokunma ile tahmin edilen akciğer konsolidasyon derecesine göre).

10 Uygulanan immünomodülatör dozuna göre akciğer lezyon skorları analiz edilmiştir. Her uygulama günü için genel akciğer lezyon skorları sırasıyla Gün -1 ve Gün 0 için yaklaşık %11 ve %14 olmuştur. Sırasıyla 500, 200, 50 ve negatif kontrol grupları için %11.2, %9.0, %10.8 ve %19.9 şeklinde akciğer lezyon skorları sergilenmiştir. Kontrol grubu ile tedavi edilen bir grup (200 µg) arasındaki en büyük fark yaklaşık %11 azalma 15 olmuştur.

Modele uyarlanmış tahminler, tüm istatistiksel model kovaryantları (örn. doz, gün ve doz x gün) için ve ayrıca sığırların çalışma boyunca barındırıldığı ağaç için uyarlanan ham ortalamaları yansıtmaktadır. Bu nedenle, modele uyarlanmış tahminler ham ortalamalara nazaran farkları gösterebilmektedir.

20 Müteakiben bakteriyoloji (akciğer kültürleri) ve viroloji (nazal eküvyon çubukları) da yapılmıştır. 5. Günde ötenazi uygulanmış olan geri kalan sığırlar (69) arasından %11.6'sına nazal sekresyonlarda sığır herpes virüsü tip 1 (BHV-1) bulaştığı görülmüştür. Çalışma hayvanlarının tümünden alınan akciğer kültürleri açısından, %41'i Mh için pozitif, %31.3'ü Pasteurella multocida (Pm) için kültür pozitif, 25 %10.8'i hem Mh hem de Pm için kültür pozitif ve çalışma popülasyonu içerisinde Histophilus somni izole edilmemiştir. Mycoplasma bovis için kültürler bu çalışmada yapılmamıştır.

Sonuçlar

- Bu çalışmada, DNA immüno-modulator dozu (örn. 500 µg, 200 µg ve 50 µg) negatif kontrole (P=0.1284) kıyasla akciğer lezyon skorlarında anlamlı bir azalmaya ulaşılmıştır. Bununla birlikte, DNA immüno-modulatorü uygulama günü (örn. Gün -1 veya 0) akciğer lezyon skorları ile anlamlı şekilde bağlantılı olmamıştır. DNA immüno-modulator doz grupları arasında akciğer lezyon skorlarında istatistiksel farklar gözlemlenmemiştir. Rektal sıklıkla, DNA immüno-modulator (P=0.1190) dozu ile anlamlı şekilde bağlantılı olma eğilimi göstermiş ancak uygulama günü ile bağlantılı olmamıştır. DNA immüno-modulator dozu ile negatif kontrol arasında ortalama günlük kilo alım bakımından belirgin bir fark gözlemlenmemiştir.
- 10 DNA immüno-modulatorünün negatif kontrole karşılaştırıldığı anda akciğer lezyonlarında azaltmaya yönelik güçlü bir eğilimi olmuştur, dolayısıyla bu ürünün BRD salgını sırasında akciğer dokusunu koruma potansiyeline sahip olduğuna dair katkı sağlamaktadır. Bu çalışmada tedavi uygulama günü akciğer lezyonları ile bağlantılı olmamıştır, dolayısıyla ineğin DNA immüno-modulatorünü BRD ile bağlantılı klinik belirtilerin başlamasından önceki gün veya bununla aynı gün alması önemli olmadığı göstermektedir. Bu sonuç, BRD patojenlerine maruz kalma zamanı genel olarak tipik üretim sistemlerinde bilinmediğinden ve üretim zinciri içerisinde ineğin yaşadığı çeşitli stres faktörlerinin etkisi ile daha da komplike hale geldiğinden önem arz etmektedir. Bu nedenle, üreticilere BRD'nin başlaması ile ilişkili olarak uygulamanın zamanlaçısından esneklik sunan bir ürün sunulması et ve süt sektörlerinde son derece değerlidir.

Örnek 2. *Mannheimia haemolytica* ile deneysel yükleme ile eş zamanlı olarak veya bundan bir gün sonra bir DNA immüno-modulatorü alan ineğin değerlendirilmesi

- Bu çalışmanın amacı *Mannheimia haemolytica* ile yükleme ile eş zamanlı olarak veya bundan bir gün sonra sığırlara uygulanan DNA immüno-modulatorünün etkinliğini belirlemektir.

İmmüno-modulator

Bu çalışmada kullanılan immüno-modulator Örnek 1'de yukarıda açıklanan bileşimdir.

Çalışma Hayvanları

Sütten kesme yaşında olan ve ortalama ağırlığı yaklaşık 300 lbs (136 kg) olan 84 Siyah-Alaca sığırları, mevcut solunum hastalığı geçmişi olmayan bir sürüden seçilmiştir. Her bir ayrı sığır ilk başta değerlendirilmiş ve sağlık durumunun iyi olduğu belirlenmiştir. 84 sığır, her biri 12 sığırdan oluşan yedi tedavi grubuna bölünmüştür. Yalnızca 5 Mannheimia haemolytica için aşlanmamış olan hayvanlar çalışmaya dahil edilmiştir. Hayvanların hiç biri, DNA immünomodülatörünün uygulanmasından önceki 30 gün içerisinde bir antimikrobiyal ajan almamıştır. Tedavi gruplarına, DNA immünomodülatörünün değişen dozları aşağıda Tablo 2.1’de belirtildiği gibi tedavi gününde uygulanmıştır. DNA immünomodülatörünün seyreltme şeması Tablo 2.2’de verilmiştir. DNA immünomodülatörü intramüsküler yolla ve sol omuza kraniyal olarak, 10 nokal ligamente ventral olarak ve sığırların juguler oluklarına kaudo-dorsal olarak uygulanmıştır.

Aşağıda bahsedildiği gibi, Tedavi Gün 0, sığırların değerlendirildiği ve sağlık durumlarının iyi olduğunun belirlendiği ilk seçimden sonra çalışmanın başlangıç tarihini ifade etmektedir. Tedavi Gün 1, Gün 0’dan bir gün sonrasındır ve bu şekilde devam etmektedir.

Tablo 2.1. İmmünomodülatörün ve Mh Yüklemesinin Uygulama Programı

Tedavi sayısı	DNA İmmünomodülatör Dozu (µg)	İmmünomodülatör Uygulama Günü	MH Yükleme Uygulama Günü	Tedavi grubu başına Hayvan
1	500	0	0	12
2	200	0	0	12
3	50	0	0	12
4	500	1	0	12
5	200	1	0	12
6	50	1	0	12
7	0 (Kontrol)	Uygulanmaz	0	12

DeneySEL Yükleme

0. Günde, sığırlara toplam 3.12×10^7 koloni oluşturma birimi (CFU) *Mannheimia haemolytica* yüklenmiştir. Solunum yolu aracılığıyla inokülüm uygulanmıştır. 3. Güne kadar çalışma popülasyonundaki sığırların tümünün BRD morbiditesi için vaka tanımı karşıladığı gözlemlenmiştir (22). Ortalama başlangıç günü bir gündür.

Değerlendirme

Önceki örnekte olduğu gibi, çalşımanın 1-5. Gününde sığırlar çeşitli sağlık göstergeleri açısından değerlendirilmiştir. Rektal sıcaklık ve ortalama günlük kilo, çalışma uzunluğu boyunca her gün her bir sığır için belirlenmiştir. Hayvanlar her gün yaklaşık aynı zamanda değerlendirilmiştir. Uygulanan immünomodülatör dozuna göre rektal sıcaklıkların ortalamaları ve ortalama günlük kilo almaları analiz edilmiştir.

5. Günde, tüm sığırlara ötenazi uygulanmış ve otopsi yapılmıştır. Örnek 1’de açıklanan formüle göre otopsi sırasında her ayrı sığır için akciğer lezyon skorları belirlenmiştir.

Uygulanan immünomodülatör dozuna göre modele uyarlanmış akciğer lezyon skorları analiz edilmiştir.

Sonuçlar

Bu çalışmada, DNA immünomodülatör dozu (örn. 500 µg, 200 µg ve 50 µg) negatif kontrole kıyasla akciğer lezyon skorları anlamlı ölçüde azaltmıştır. Bununla birlikte, daha düşük dozlar (200 µg ve 50 µg) akciğer lezyonları azaltmadan 500 µg’den daha iyi performans göstermiştir. DNA immünomodülatörü uygulama günü (örn. Gün 0 veya 1) akciğer lezyon skorları ile anlamlı şekilde bağlantılı olmamıştır. DNA immünomodülatör doz grupları arasında akciğer lezyon skorlarında istatistiksel farklar gözlemlenmemiştir. Negatif kontrole kıyasla DNA immünomodülatörü uygulanan sığırlarda rektal sıcaklık anlamlı ölçüde azalmıştır, ancak dozla bağlantılı olmamıştır. DNA immünomodülatör dozu ile negatif kontrol arasında ortalama günlük kilo almaları bakımından belirgin bir fark gözlemlenmemiştir.

DNA immünomodülatörünün negatif kontrole karşılaştırıldığında akciğer lezyonları azaltmaya yönelik güçlü bir eğilimi olmuştur, dolayısıyla bu ürünün BRD salgını

5 sırasında akciğer dokusunu koruma potansiyeline sahip olduğuna dair kanıt sağlamaktadır. Bu çalışmada tedavi uygulama günü akciğer lezyonları ile bağlantılı olmaması, dolayısıyla ineğin DNA immünomodülatörünü BRD ile bağlantılı klinik belirtilerin başlamasından önceki gün veya bununla aynı gün alması önemli 5 olmadığını göstermektedir. Bu sonuç, BRD patojenlerine maruz kalma zamanı genel olarak tipik üretim sistemlerinde bilinmediğinden ve üretim zinciri içerisinde ineğin yaşadığı çeşitli stres faktörlerinin etkisi ile daha da komplike hale geldiğinden önem arz etmektedir. Bu nedenle, üreticilere BRD'nin başlaması ile ilişkin olarak uygulamanın zamanı açısından esneklik sunan bir ürün sunulması et ve süt sektörlerinde son derece 10 değerlidir.

Örnek 3. *Mannheimia haemolytica* ile deneysel yüklemekten iki gün önce veya bununla eş zamanlı olarak bir DNA immünomodülatörü alan ineğin değerlendirilmesi

15 Bu çalışmanın amacı *Mannheimia haemolytica* ile deneysel yüklemekten iki gün önce veya bununla eş zamanlı olarak sığırlara uygulanan DNA immünomodülatörünün etkinliğini belirlemektir.

İmmünomodülatör

Bu çalışmada kullanılan immünomodülatör Örnek 1'de yukarıda açıklanan bileşimdir.

Çalışma Hayvanları

20 Ortalama ağırlığı yaklaşık 800-1000 lbs (363-454 kg) olan 96 Siyah-Alaca sığırları mevcut solunum hastalığı geçirmiş olmayan bir sürüden seçilmiştir. Her bir ayrı sığır ilk başta değerlendirilmiş ve sağlık durumunun iyi olduğu belirlenmiştir. 96 sığır, her biri 12 sığırdan oluşan sekiz tedavi grubuna bölünmüştür. Yalnızca *Mannheimia haemolytica* için aşlanmamış olan hayvanlar çalışmaya dahil edilmiştir. Hayvanların 25 hiç biri, DNA immünomodülatörünün uygulanmasından önceki 30 gün içerisinde bir antimikrobiyal ajan almamıştır. Tedavi gruplarına, DNA immünomodülatörünün değişen dozları aşağıda Tablo 3.1'de belirtildiği gibi tedavi gününde uygulanmıştır. DNA immünomodülatörünün seyreltme şeması Tablo 3.2'de verilmiştir. DNA

immünomodülatörü intramüsküler yolla ve sol omuza kraniyal olarak, nukal ligamente ventral olarak ve sığır ların juguler oluklarına kaudo-dorsal olarak uygulanmıştır.

Aşağıda bahsedildiği gibi, Tedavi Gün -2, Tedavi Grupları 1-3'e immünomodülatör uygulandıktan zaman çalışmanın başlangıç gününü ifade etmektedir. Tedavi Gün 0, Gün -2'den iki gün sonrasında ve bu şekilde devam etmektedir.

Tablo 3.1. İmmünomodülatörün ve Mh Yüklemesinin Uygulama Programı

Tedavi sayısı	DNA İmmünomodülatör Dozu (µg)	İmmünomodülatör Uygulama Günü	MH Yükleme Uygulama Günü	Tedavi grubu başına Hayvan
1	200	-2	0	12
2	50	-2	0	12
3	25	-2	0	12
4	200	0	0	12
5	50	0	0	12
6	25	0	0	12
7	0 (Kontrol)	-2	0	12
8	0 (Kontrol)	0	0	12

Deneysel Yükleme

0. Günde, sığır larına toplam 1.9×10^{10} CFU yüklenmiştir. Solunum yolu aracılığıyla inokülüm uygulanmıştır.

Değerlendirme

Önceki örneklerde olduğu gibi, çalışmanın 1-5. Gününde sığır lar çeşitli sağlık göstergeleri açısından değerlendirilmiştir. 5. Günde, tüm sığır larına ötenazi uygulanmış ve otopsi yapılmıştır. Otopsi sırasında her ayrı sığır için akciğer lezyon skorları belirlenmiştir.

Uygulanan immüno-modülatör dozuna göre modele uyarlanmış akciğer lezyon skorlarının yanısıra immüno-modülatör uygulama gününe göre modele uyarlanmış akciğer lezyon skorları analiz edilmiştir.

Sonuçlar

- 5 Bu çalışmada, DNA immüno-modülatör dozu (örn. 200 µg, 50 µg ve 25 µg) negatif kontrollere kıyasla akciğer lezyon skorları önemli ölçüde azaltılmıştır. Bununla birlikte, DNA immüno-modülatör doz grupları arasında akciğer lezyon skorlarında istatistiksel farklar gözlemlenmemiştir. DNA immüno-modülatör uygulama günü (örn. Gün -2 veya 0) akciğer lezyon skorları ile anlamlı şekilde bağlantılı olmuştur. İmmüno-modülatör
- 10 Gün -2 ile karşılaştırıldığında 0. Günde uygulandığında akciğer lezyonlarında önemli azalma gözlemlenmiştir.

Örnek 4. İmmüno-modülatör ve öldürülmüş MH aşısı'nın Mh Yüklemesi ile birlikte uygulanması

- Bu çalışmanın amacı, Mannheimia haemolytica ile deneysel yüklemeye tabi tutulmuş
- 15 sığırlara öldürülmüş MH aşısı ile birlikte uygulanan DNA immüno-modülatörünün etkinliğini belirlemektir.

İmmüno-modülatör

Bu çalışmada kullanılan immüno-modülatör Örnek 1'de yukarıda açıklanan bileşimdir.

Çalışma Hayvanları

- 20 12 haftalık 81 Siyah-Alaca boğa sağlığı mevcut solunum hastalığı geçirmemiş olmayan bir sürüden seçilmiştir. Her bir ayrı sığır değerlendirilmiş ve sağlık durumunun iyi olduğu belirlenmiştir. Yalnızca Mannheimia haemolytica için aşılanmamış olan hayvanlar çalışmaya dahil edilmiştir. Hayvanların hiç biri, inokülüm uygulanmasından önceki 30 gün içerisinde bir antimikrobiyal ajan almamıştır.

Deneysel Enfeksiyon ve Yükleme

Yükleme veya deneysel enfeksiyon Mannheimia haemolytica inokülüm maruziyetini içermiştir. Organizmalar, ilk inokülüm için hayvan başına 1.7×10^8 konsantrasyonunda

ve ikinci inokülüm için 2.4×10^{10} konsantrasyonundan kullanılmıştır. Hayvanlara aynı zamanda bir başka solunum yoluyla bir sprey yüklenmiştir. Sprey inokülümdeki organizmaların konsantrasyonu hayvan başına 1.9×10^{10} olmuştur.

Yukarıda açıklanan gibi sığırlara uygulanan ve ardından *Mannheimia haemolytica* maruziyeti gelen immünomodülatörün etkinliği Tablo 3'te ayrıntılı olarak verildiği gibi on iki tedavi grubu ile belirlenmiştir.

Tablo 4.3. Çalışma Tedavi Grupları

Grup	Hedeflenen Doz	Tedavi Günü		Hayvan Sayısı
		Gün	Temas	
T1	Öldürülmüş MH (yağ) aşısı (SC)	0	X	7
T2	Öldürülmüş MH (yağ) aşısı + İmmünomodülatör 500 µg (SC)	0	X	7
T3	Öldürülmüş MH (yağ) aşısı (SC)	7	X	6
T4	Öldürülmüş MH (yağ) aşısı + İmmünomodülatör 500 µg (SC)	7	X	7
T5	İmmünomodülatör 500 µg (SC)	7	X	7
T6	İmmünomodülatör 500 µg (SC)	13	X	7
T7	İmmünomodülatör 500 µg (IM)	13	X	7
T8	İmmünomodülatör 500 µg (SC)	15*	X	7
T9	Kontrol NC	Uygulanmaz	Uygulanmaz	7
T10	Kontrol CC	Uygulanmaz	X	5
T11	Kontrol SE	Uygulanmaz	X	7
T12	Öldürülmüş MH (sulu) aşısı + İmmünomodülatör 500 µg (SC)	0	X	7

Yağ MH = *Mannheimia haemolytica* aşısı (Pulmo-Guard® PHM)
Sulu MH = *Mannheimia haemolytica* aşısı (One Shot®)
NC = Karıştırılmamış ve sprey yüklenmemiş (geçmiş gros patolojisi için)
CC = Temas ve sprey yüklenmiş
SE = Ekici yüklemesi olarak kullanılmıştır (İntratrakeal yolla yüklenmiştir)
SE ve NC hariç tüm hayvanlara, spreyle yükleme yapılmıştır
SC = Subkütan enjeksiyon yolu
IM = İnteramüsküler enjeksiyon yolu
NA = Uygulanabilir değil
* T8 grubundaki hayvanlar intranasal yüklemeden sonra tedavi edilecektir

Çalışmanın 0. Gününde, T1, T2 ve T12 gruplarındaki tüm hayvanlara subkütan yolla immünomodülatör uygulanmıştır. İmmünomodülatör T3, T4 ve T5 gruplarına 7. Günde subkütan yolla uygulanmıştır. İmmünomodülatör T6 gruba 13. Günde subkütan yolla ve T7 grubuna intramüsküler yolla uygulanmıştır. İmmünomodülatör T8 grubuna 15. Günde subkütan yolla uygulanmıştır.

Aşılan tüm hayvanlar etiket talimatlarına göre aşılanmıştır. İmmünomodülatör ve aşı bir lenf düğümü (boyun) yakınında birbirine oldukça yakın uygulanmıştır - iki enjeksiyon (biri aşı için ve diğeri immünomodülatör için). Subkütan enjeksiyon yolunu alan tüm hayvanlara bir lenf düğümü yakınında alt skapular bölgede enjeksiyon yapılmıştır.

Çalışmanın 10. gününde tüm T11 sığırları, sığırları stres altında bırakmak için yaklaşık 24 saat süreyle bir hayvan kamyonunda bölge dışına sevk edilmiştir. Çalışmanın 11. gününde, tüm T11 hayvanlarına Mannheimia haemolytica içeren bir inokülümün 20 mL'si transtrakeal yolla uygulanmış ve bunu 4 saat sonra 25 mL inokülüm izlemiştir.

Çalışmanın 14. gününde, T9 hariç tüm gruplar karıştırılmış ve sığırları stres altında bırakmak için yaklaşık 24 saat süreyle bir hayvan kamyonunda bölge dışına sevk edilmiştir. NC grubundakiler hariç tüm hayvanlar Çalışmanın 14. gününde 12 ila 16 saat süreyle büyük bir ağda karıştırılmış ve ardından kendi ayrı ağlarına döndürülmüştür (her hayvanın ayrı bir ağları vardır). Çalışmanın 15. gününde, 20 mL Mannheimia haemolytica, T9 ile T11 hariç tüm gruplara bir başka solunum yoluyla uygulanmıştır. Hayvanlar çalışma boyunca günlük olarak klinik anormallikler ve mortalite açısından gözlemlenmiştir. Tüm hayvanlar, hayvanların satın alınmasından önceki taramada negatiftir veya düşük titreleri vardır. Hayvanların tedavi öncesinde yüksek titreleri olup, bu da hayvanların tedavi almadan önce serolojik olarak Mannheimia haemolytica'a dönüştüklerini göstermektedir.

Sonuçlar

Grup T8'deki hayvanların önemli ölçüde düşük akciğer lezyonları vardır.

Çalışma, aşı ile birlikte veya aşı olmadan erken koruma başladığı (gün 7) ileri sürmektedir (T3'e kıyasla T4 ve T5 grupları).

Örnek 5. Bir DNA immünomodülatörü ile birlikte uygulandığında ticari-canlı aşı ile aşılanan sığırlarda kazanılmış bağışıklığın değerlendirilmesi

Bu çalışmanın amacı, DNA immünomodülatörünün birlikte uygulanmasının modifiye-
canlı viral (MLV) aşıların sağladığı kazanılmış bağışıklığın artırıp artırmadığını
5 belirlemektir.

İmmünomodülatör

Bu çalışmada kullanılan immünomodülatör Örnek 1’de yukarıda açıklanan bileşimdir.

Çalışma Hayvanları

Sütten kesme yaşında olan 72 Siyah-Alaca ineği, mevcut solunum hastalığı geçmişi
10 olmayan bir sürüden seçilmiştir. 72 sığır, her biri 12 sığırdan oluşan altı tedavi grubuna
bölünmüştür. Her bir ayrı sığır değerlendirilmiş ve sağlık durumunun iyi olduğu
belirlenmiştir. Sığırların tümü, BHV-1, BVDV tip 1 ve 2 ve BRSV için serum
antikorundan arındırılmıştır. İlaveten, sığırların tamamının PI-3’e karşı serum antikor
aşılarından negatif olduğu bulunmuştur. Akabinde sığırların, immünohistokimya ile sığır
15 viral diyare virüsü persistan enfeksiyonu için negatif olduğu belirlenmiştir.

Tedavi gruplarına, aşı ile DNA immünomodülatörünün değişen dozları aşağıda Tablo
5.1’de belirtildiği gibi tedavi gününde intramüsküler yolla uygulanmıştır. DNA
immünomodülatörünün seyreltme şeması Tablo 5.2’de verilmiştir. Çalışmanın 0.
Gününde, T1-T4 gruplarındaki tüm hayvanlara immünomodülatör uygulanmıştır. Aşı
20 alan tüm hayvanlar etiket talimatlarına göre aşılanmıştır. İmmünomodülatör ve aşı,
omzun ön kısmında kraniyal olarak birbirine oldukça yakını uygulanmıştır - iki
enjeksiyon (biri aşı için ve diğeri immünomodülatör için).

Tablo 5.1. İmmünomodülatörün ve Aşının Uygulama Programı

Grup	Hedeflenen Doz	Aşın ve/veya İmmünomodülatör Uygulama Günü	Hayvan Sayısı
T1	MLV İmmünomodülatör (500 µg) IM	+ 0	12
T2	MLV İmmünomodülatör (200 µg) IM	+ 0	12
T3	MLV İmmünomodülatör (100 µg) IM	+ 0	12
T4	MLV İmmünomodülatör (50 µg) IM	+ 0	12
T5	MLV	0	12
T6	Tedavi yok	Uygulanmaz	12
MLV = Mannheimia haemolytica aşını (Bovi-shield®) - modifiye canlı 4-yollu viral solunum yolu aşını IM = İntramüsküler enjeksiyon yolu			

Değerlendirme

0, 13, 28, 27, 34 ve 41. Günde sığırlardan alınan uygun hematolojik numunelerden gelen örneklerde immünolojik test yapılmıştır. Hücre aracılığıyla bağışıklık (CMI) ölçümleri her numune için yürütülmüştür. Bu çalışmaya yönelik hedef patojenler BHV-1, BVDV 1 ve 2 ve BRSV'dir. Laboratuvarlarda önceden belirtilen hedef patojenler için uygun olan standart prosedürler ve yöntemler kullanılmıştır.

Sonuçlar

10 Tüm tedavi grupları arasında her örnek toplama Gününde CMI sonuçlarına yönelik modele uyarlanmış veriler belirlenmiştir. Tedavi grupları, hücre tipleri ve antijenlerin tümü arasında, DNA immünomodülatör tedavi grupları- MLV aşın kombinasyonları

yalnızca MLV aşısı alan sığırlarla karşılaştırıldığında istatistiksel farklar ($P>0.10$) tespit edilmemiştir. Özellikle, 6 tedavi grubunun her biri için beş hücre tipinin tamamında CD 25 EI ekspresyon indeksinin ölçümleri, 6 tedavi grubunun her biri için beş hücre tipinin tamamında IFN γ ekspresyon indeksinin ölçümleri ve 6 tedavi grubunun her biri için beş hücre tipinin tamamında IL-4 ekspresyon indeksinin ölçümleri analiz edilmiştir. 4 BRD viral patojenin her biri için tahminler oluşturulmuştur. Bu istatistiksel değerlendirmeler için tüm karşılaştırmalar “yalnızca MLV” tedavi grubu ile yapılmıştır.

İstatistiksel olarak anlamlı ($P<0.10$) tedavi x Gün etkileşimleri, BVDV 1 (Gün 28 ve 35) ve BVDV 2 (Gün 42) için tespit edilmiştir. Listelenen zaman noktalarında hiç birinde BHV-1 için herhangi bir anlamlı bulgu ($P>0.10$) tespit edilmemiştir. Negatif kontrol tedavi grubu içerisinde antikor serokoruma gözlemlendiği için BRSV verileri analizden çıkarılmıştır. Tüm istatistiksel değerlendirmeler için tüm karşılaştırmaların “yalnızca MLV” tedavi grubu ile yapıldığı unutulmamalıdır.

Tek tek hayvan ağrıları da çalışmada sıklıkla gözlemlenmiştir. Yalnızca MLV grubu ile karşılaştırıldığında tedavi grupları arasında anlamlı bulgular ($P>0.10$) tespit edilmemiştir.

Özetle, DNA immünomodülatörü, MLV aşısı ile tek başına uygulanması ile karşılaştırıldığında MLV aşısı ile birlikte uygulandığında zaman CMI'yı artırmıştır. Bununla birlikte, DNA immünomodülatörünün 500 μ g'si, MVL aşısı ile birlikte uygulandığında humoral bağışıklığı artırmaktadır (özellikle BVDV). Bununla beraber, kazanılmış bağışıklıkta tutarlı bir iyileşme olmamasına rağmen, DNA immünomodülatörünün 500 μ g, 200 μ g, 100 μ g ve 50 μ g dozlarında birlikte uygulanması MLV aşısının indüklediği pozitif immünolojik etkileri bozmuştur. İlave olarak, DNA immünomodülatörünün uygulanması ile performans (yani ADG) negatif olarak etkilenmemiştir.

Örnek 6. Bir DNA immünomodülatörü ile birlikte uygulandığında ticari-aşısı ile aşılanan sığırlarda kazanılmış bağışıklığın değerlendirilmesi

Bu çalışmanın amacı DNA immünomodülatörünün birlikte uygulanması, etkisizleştirilmiş antijen içeren aşılarla sağladığı kazanılmış bağışıklığı artırtıp artırmadığını belirlemektir.

İmmünomodülatör

Bu çalışmada kullanılan immünomodülatör Örnek 1’de yukarıda açıklanan bileşimdir.

Çalışma Hayvanları

3-5 aylık olan 48 Siyah-Alaca dişi sığırcı, mevcut solunum hastalığı geçirmemiş olmayan bir sürüden seçilmiştir. 48 sığırcı, her biri 8 hayvandan oluşan altı tedavi grubuna bölünmüştür. Her bir altı hayvan değerlendirilmiş ve sağlık durumunun iyi olduğu belirlenmiştir. Hayvanların tümü, BHV-1, BVDV tip 1 ve 2 için serum antikorundan arındırılmıştır. Hayvanların ayrıca PCR ile sığırcı viral diyare virüsü persistan enfeksiyonu için negatif olduğu da belirlenmiştir. Hayvanlar, BRS virüsü ve PI3 virüsüne karşı SNT titrelerine göre seçilmemiştir.

Tedavi gruplarına, aşı ile DNA immünomodülatörünün değişen dozları aşağıda Tablo 5.1’de belirtildiği gibi tedavi gününde intramüsküler yolla uygulanmıştır. Aşı, etkisizleştirilmiş antijen olarak BHV1 ve BVDV tip 1 ve 2 ve modifiye canlı PI3 virüsü ve BRS virüsü içermiştir. İmmünomodülatör ve aşıya omuzun önüne kraniyal olarak hayvanın aynı tarafından ayrı olarak ya da aynı bölgede hayvanın diğer tarafında ayrı olarak ya da bir şırıngada karıştırılarak verilmiştir. DNA immünomodülatörünün seyreltme şeması Tablo 5.2’de verilmiştir.

20

25

30

Tablo 6.1. İmmünomodülatörün ve Aşının Uygulama Programı

Grup	Hedeflenen Doz	Aşın ve/veya İmmünomodülatör Uygulama Günü	Hayvan Sayısı
T1	Plasebo (Dekstroz %5)	0	8
T2	Aşın+ Dekstroz IM, ayrı olarak	0	8
T3	Aşın+ İmmünomodülatör (200 µg) IM, karışık	0	8
T4	Aşın+ İmmünomodülatör (200 µg) IM, karışık	0	8
T5	Aşın+ İmmünomodülatör (200 µg) IM, aynı tarafta ayrı olarak	0	8
T6	Aşın+ İmmünomodülatör (200 µg) IM, diğer tarafta ayrı olarak	0	8
<p>Aşın= kombine (etkisizleştirilmiş ve modifiye canlı) 4-yollu viral solunum yolu aşını (Risposal®) IM = İntramüsküler enjeksiyon yolu</p>			

Değerlendirme

0, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 20, 23 ve 27. Günde sığırlardan alınan uygun hematolojik numunelerden gelen örneklerde immünolojik test yapılmıştır. Bu çalışmaya yönelik hedef patojenler BHV-1, BVDV 1 ve 2'dir. Bilgi için BRS virüsü ve PI3 virüsüne karşı antikor titreleri de belirlenmiştir. Laboratuvarlarda önceden belirtilen hedef patojenler için prosedürler olarak standart Serum Nötralizasyon testleri (SNT) kullanılmıştır.

Sonuçlar

10 İstatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.010$) tedavi x Gün etkileşimleri, BVDV 1 (Gün 27) için tespit edilmiştir. Listelenen zaman noktalarının herhangi birinde 2'de BHV1 için ve BVDV tip 1 için tüm diğer zaman noktalarında anlamlı bulgular ($P > 0.10$) tespit edilmemiştir. BRSV ve PI3 titrelerinin sonuçları daha fazla değerlendirilmemiştir çünkü

hayvanlar alışmanını başlangıçında serolojik olarak negatif değildir. Bu nedenle tedavinin etkisi doğrulanamamıştır. Tüm istatistiksel değerlendirmeler için tüm karşılaştırmalar ın “Aşı ve Dekstroz%5” tedavi grubu ile yapılmış olduğunu unutmamal ın.

5

10

15

20