

Adsorbe Tetanoz Aşısı Proses Geliştirme ve Üretim Çalışmaları

Erkan ÖZCENGİZ, Derya ÜNVER, H. Hüseyin ÇAYAN,
Özlem BÜYÜKTANIR, Cihat TEPELER

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi, Aşı-Serum Üretim ve Araştırma Bölümü, Ankara

ÖZET

Bu çalışmada fermentör teknolojisi ile yüksek verimde tetanoz toksini üretimi gerçekleştirilmiş ve geliştirilen yeni proses ile pilot adsorbe tetanoz aşısı üretimi yapılmıştır. Fermentörde 300 L besiyerinde *Clostridium tetani* Harvard 49205 suşunun beş günlük kültürlerinden elde edilen tetanoz toksini konsantrasyon edilip daha sonra toksoid forma dönüştürülmüş ve saflaştırılarak alhidrojelle (alüminyum hidroksit jeli) adsorbe edilmiştir. Yeni adsorbe aşı pilot düzeyde seri olarak üretilip, her seride Dünya Sağlık Örgütü gerekliliklerine göre kontrol testleri yapılmış ve bazı serilerde değişik tarihlerde 3 yılı aşan sürede fare toksin challenge yöntemi kullanılarak potens testleri tekrarlanmıştır. Adsorbe tetanoz aşısı bu süre boyunca testlerden başarıyla geçmiş, stabil ve potent olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Tetanoz, aşı, proses

SUMMARY

Process Development and Production Studies of Adsorbed Tetanus Vaccine

Tetanus toxin production with high yield by a fermentor system was performed and with this new developed process, pilot adsorbed tetanus vaccines were produced. Tetanus toxin eluted from 5 days culture of *Clostridium tetani* strain Harvard 49205 in 300 L medium in fermentor system was concentrated, then toxoid form prepared from this toxin was adsorbed onto aluminum hydroxide gel (alhydrogel) after purification. The new adsorbed vaccine at pilot level was produced on lot base and the control tests according to the WHO requirements were performed for each lot. The potency tests were repeated at different time intervals for >3 years for some lots by mouse toxin challenge assay. During that time period, the adsorbed vaccines passed successfully from all the tests and they were evaluated as stable and potent.

Key Words: Tetanus, vaccine, process

GİRİŞ

Ülkemizde gerçekleştirilen koruyucu sağlık hizmetlerinin en önemli bölümünü çeşitli hastalıklara karşı uygulanan bağışıklama programları oluşturmaktadır. Bu programların etkili bir şekilde yürütülebilmesi ise aşı temininde yurt dışı bağımlılıktan kurtulmak, yurt içinde aşı araştırma-geliştirme çalışmalarına önem vermek ve yeterli/güvenilir aşı üretim tesislerine sahip olmakla mümkündür. Bu amaçla ülkemizde insan aşılarının üretim çalışmaları dünyadaki gelişmelere paralel olarak Cumhuriyet' in ilk yıllarında Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi

(RSHM)'ne alınmış, tetanoz ve diğer aşılar kuruluş yıllarından bu yana plain aşı (saflaştırılmamış, adsorbe olmayan) olarak üretilmiştir. Bu birinci jenerasyon aşı uzun yıllar ülkemizin ihtiyacını karşılayıp enfeksiyon hastalıkları ile başarılı bir biçimde mücadele edilmesini sağlamıştır. Ancak 1960-70'li yıllarda dünyada o zamana kadar kullanılan aşılar da önemli yapısal değişimler meydana gelmiş ve pek çok ülkede adjuvant içeren adsorbe aşılar uygulamaya girmiştir. Ülkemizde ise ancak 1995 yılında "Tetanoz Aşısı Modernizasyon Projesi" ile adsorbe aşıya geçiş çalışmaları laboratuvarlarımızda başlatılmıştır. Eski laboratuvar koşullarının iyileştirilmesi, fermentör teknolojisi ile toksin

İletişim: Erkan Özcengiz

e-posta: erozcengiz@yahoo.com

üretimine geçiş ve yeni prosesin geliştirilerek adsorbe aşı üretilmesi amacıyla başlattığımız çalışmalar sonucunda ilk pilot adsorbe tetanoz aşısı 2000 yılında üretilmiş ve pilot aşuların seri üretimi gerçekleştirilmiştir.

Kontamine yaralarda *Clostridium tetani*'nin anaerop şartlarda üremesi ve nörotoksin yapması ile oluşan akut bir infeksiyon hastalığı olan tetanozdan korunmanın tek yolu aşılama ile bağışıklık kazanılmasıdır. Etkili bir bağışıklık sağlayan adsorbe tetanoz aşuları, tetanoz toksininin formaldehid ile inaktivasyonu sonrasında oluşan tetanoz toksoidinin saflaştırılarak alüminyum jeline adsorbe edilmesiyle hazırlanır. Bu çalışmada, yeni geliştirilen proses ile üretilen pilot adsorbe tetanoz aşularının 3 yıl süresince gerçekleştirilen üretimi, seri aşuların kontrol ve stabilite sonuçları değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, 65 L ve 450 L kapasiteli LSL Biolafitte (Fransa) otomatik kontrol sağlayan fermentörler, Sartorius Crossflow-Filtrasyon Sistemleri, Sigma Yüksek Kapasiteli Soğutuculu Santrifüj, Biohazard II Çalışma Kabinleri (TransMed) kullanılmıştır.

In vivo çalışmalarda kobay ve Swiss albino fareler kullanılmıştır.

Üretim Çalışmaları

Suş. Üretimde *Clostridium tetani* Harvard 49205 aşısı suşu kullanılmış ve suşun devamlılığı liyofilize edilerek sağlanmıştır.

Besiyeri. 300 litre Fişek-Muller-Miller besiyeri (1) fermentör kültürleri için kullanılmıştır.

Kültür. Tetanoz kültürü ve toksin üretimi, seed lot sistemi esasına göre liyofilize suştan, anaerop koşullarda sürekli karıştırma ile 300 L çalışma hacmindeki fermentörde gerçekleştirilmiş ve kültürden her gün örnek alınarak flokülasyon reaksiyonu (Lf), flokülasyon süresi (Kf) ve pürite testleri (2, 3) yapılmıştır.

Klarifikasyon. Fermentör kültür toksini klarifiye ve konsantre edilerek, Minimum Letal Doz (MLD), Lf, Kf, testleri yapılmıştır (2, 3).

Detoksifikasyon. Tetanoz toksini, % 0.4 oranında formaldehit ilave edilip uygun şekilde karıştırılarak ve 36°C'de 30 gün bekletilerek detoksifiye edilmiştir. Daha sonra aseptik şartlarda örnek alınarak spesifik toksisite ve pH kontrolleri (3) yapılmış ve toksoid 4°C'de saflaştırma aşamasına kadar muhafaza edilmiştir.

Saflaştırma (Pürifikasyon). Tetanoz toksoidi katı amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırılıp koruyucu olarak % 0,01 thiomersal ilave edilmiştir.

Steril Filtrasyon. Pürifiye ve konsantre tetanoz toksoidi steril filtrasyon sistemi ile filtre edilip, bulk tetanoz toksoidi (TT)'nden alınan örneklerde pH, Lf, sterilité, irreverzibilite, spesifik toksisite, protein nitrojen içeriği testleri yapılmıştır (2, 3).

Final Ürünün Hazırlanması

Al(OH)₃ (Alhidrojel) Adsorbsiyonu. Tetanoz toksoidi (TT), hazırlanan alüminyum hidroksit jeline (alhidrojel; 0,45 mg alüminyum/0,5 ml) son ürtünde 10 Lf/0.5 ml olacak şekilde adsorbe edilmiş ve koruyucu olarak % 0,01 oranında thiomersal ilave edilmiştir (2, 3). Final bulk TT gerekli kontrol testleri tamamlanmak üzere 2-8°C'de saklanmıştır.

Doldurma. Testleri tamamlanan final ürün, flakonlara 7,5 ml (15 doz) steril koşullarda dağıtılmıştır.

Kontrol Çalışmaları

Toksin Üretim Kontrolü

Antijen Konsantrasyonu (Lf). Spesifik anti-tetanoz serumun artan miktarları ile sabit miktardaki antijen solüsyonu karşılaştırılarak en hızlı ve güçlü flokülasyon reaksiyonu veren tüp belirlenerek Lf miktarı hesaplanmış ve Kf kaydedilmiştir (4).

MLD. Ham toksin seri olarak sulandırılarak her sulandırmadan iki fareye periton içi enjekte edilip, her gün tetanoza ait semptom derecesi gözlenerek, ölen hayvanlar kaydedilmiştir. MLD değeri 18-20 g ağırlığındaki bir fareyi enjeksiyondan sonra 4 gün içinde öldüren en düşük toksin miktarı olarak kaydedilmiştir (2, 3).

Pürifiye Bulk Toksoid Kontrolü.

Spesifik Toksisite. 250-350 g ağırlığında en az 5 kobaya derialtı yolla tetanoz toksoidden 500 Lf/ml'den az olmayacak şekilde birer ml örnek enjekte edilmiş ve 21 gün boyunca bütün hayvanların tetanoz intoksikasyon belirtisi gösterip göstermediği gözlenmiştir (2, 3).

Antijenik Pürite Testi. Pürifiye bulk toksoidin protein nitrojen değeri spektrofotometrik olarak test edilmiş ve Lf değerinin 1000 Lf/mg protein-N'den az olmadığı belirlenmiştir (2, 3).

Toksisiteye Dönüşüm Testi. Pürifiye konsantre toksoid 20 Lf/ml olacak şekilde sulandırılmış ve bu toksoidin bir bölümü 2-8°C'de, diğer bölümü 37°C'de 6 hafta tutulmuştur. Her örnek 250-350 g ağırlığında en az beş kobaya 5'er ml olmak üzere derialtı enjekte edilmiş ve kobaylar 21 gün gözlenip, gözlem süresince hiç bir hayvanın ölmediği, tetanoza ait spesifik paralizisi veya her hangi bir başka belirti göstermediği belirlenmiştir (2, 3).

Sterilite. Pürifiye bulk toksoidi, tioglikolat besiyerinde aerob ve anaerob bakteri yönünden 37°C'de ve soybean kazein besiyerinde mantar yönünden 22°C'de 14 gün süreyle test edilmiştir.

pH Değeri. Ham toksoid ve pürifiye konsantre toksoid pH değeri potansiyometrik olarak ölçülmüştür.

Final Bulk Kontrolü

Potens. Adsorbe tetanoz toksoidinin potansi; test aşısı ile bağışıklanan farelerde toksin challenge yöntemi kullanılarak, international unit (IU) değeri "parallel line assay" istatistik yön-

temi ile standart aşısı karşı hesaplanmıştır (5).

Serbest Formaldehit. Amonyum asetat – asetil aseton yöntemine göre yapılmıştır. Yöntem amonyum asetat varlığında hafif asit ortamda asetil aseton renginin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (2, 3).

Sterilite ve pH Değeri. Yukarıda bahsedildiği gibi yapılmıştır.

Final Ürün Kontrolü

Lf. Antijen içeriğini saptamak için, sodyum sitrat solüsyonu kullanılarak berrak bir solüsyon elde edilmiş ve Lf yukarıda verildiği gibi yapılmıştır.

Sterilite Testi ve pH. Yukarıda verildiği gibi yapılmıştır.

Zararsızlık. 18-20 g ağırlığında 5 fareye 0,5 ml (bir insan dozu), 250-350 g ağırlığında 2 kobaya 1 ml periton içi yolla enjekte edilmiş ve 7 günlük gözlem süresince hiç bir hayvan da herhangi bir toksisite belirtisi görülüp görülmediği izlenmiştir (2, 3).

Potens. Potens testi final bulk aşamasında gösterilmiştir.

Koruyucu İçeriği Tayini. Thiomersal miktarı, kloroform-dithizon çözeltisi ile ekstrakte edilerek oluşan renkli bileşiğin absorbansı 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülerek standart ile karşılaştırılmalı olarak tayin edilmiştir (2, 3).

Adjuvant İçeriği Tayini. Alüminyum jeli halinde bulunan alüminyum, konsantre nitrik asit (HNO₃) ile su banyosunda kaynatılarak çözdürüldükten sonra asetat tamponu ortamında stilbazo ile oluşturduğu renkli bileşiğin absorbansı spektrofotometrik olarak 420 nm dalga boyunda ölçülerek, alüminyum miktarı standart ile karşılaştırılmalı olarak saptanmıştır (2, 3).

BULGULAR

Lf. Fermentör kültürlerine ait antijen konsan-

Tablo 1. Tetanoz fermantör kültürlerinde Lf, Kf ve MLD değerleri.

Seri No	Lf / ml	Kf (dakika)	MLD
TT-99-01	40	20	1/2.000.000
TT-99-02	60	15	1/3.500.000
TT-99-04	60	15	1/3.500.000
TT-99-05	60	30	1/500.000
TT-99-06	70	30	1/3.000.000
TT-99-07	65	25	1/1.500.000
TT-99-08	40	25	1/1.500.000
TT-99-09	60	20	1/3.000.000
TT-99-10	100	25	1/3.000.000
TT-00-01	70	30	1/2.500.000
TT-00-02	70	30	1/3.500.000
TT-00-03	120	25	1/3.500.000
TT-00-04	140	35	1/3.500.000
TT-01-01	120	30	1/3.250.000
TT-01-02	100	40	1/3.500.000
TT-02-01	200	45	1/2.000.000

trasyonu Lf ile Kf ve MLD değerleri Tablo 1'de görülmektedir. İlk kültür çalışmalarında 40-60 Lf/ml civarında elde edilen toksin düzeyi daha sonraları 100 Lf/ml'in üzerine yük-

Tablo 2. RSHM-TT seri aşuların fermantör kültür Lf, Kf, MLD değerleri.

Seri No	Lf / ml	Kf (dakika)	MLD
RSHM-TT0001	70	30	1/3.000.000
RSHM-TT0103	60	15	1/3.500.000
RSHM-TT0104	65	25	1/1.500.000
RSHM-TT0105	40	25	1/1.500.000
RSHM-TT0206	100	25	1/3.000.000
RSHM-TT0207	60	20	1/3.000.000
RSHM-TT0308	70	30	1/2.500.000
RSHM-TT0309	70	30	1/3.500.000

selmiştir. Toksinin Kf değeri 15-45 dakika ve MLD değerleri ortalama 1/2.700.000 olarak tespit edilmiştir.

Pilot adsorbe tetanoz aşısında kullanılan pürifiye bulk toksoidlerin spesifik toksisite, antijenik pürite, toksisiteye dönüşüm ve sterilite test sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir. Pürifiye toksoidlerin hiçbirinde toksisiteye dönüşüm görülmemiş ve antijenik olarak da 1031-2838 Lf/mg protein-N gibi yüksek değerler elde edilmiştir (Tablo 3).

Pilot adsorbe tetanoz aşularına ait ilk potens testleri ve çeşitli dönemlerde tekrarlanan potens testleri >40 IU/doz olarak belirlenmiştir

Tablo 3. Adsorbe aşılarda bulunan pürifiye tetanoz bulk toksoidlerine ait spesifik toksisite, antijenik pürite, toksisiteye dönüşüm ve sterilite test değerleri.

Seri No	Spesifik Toksisite	Antijenik Pürite	Toksisiteye Dönüşüm	Sterilite
RSHM-TT0001	Geçti	2093 Lf/mg protein N	Geçti	Steril
RSHM-TT0103	Geçti	2156 Lf/mg protein N	Geçti	Steril
RSHM-TT0104	Geçti	2838 Lf/mg protein N	Geçti	Steril
RSHM-TT0105	Geçti	1031 Lf/mg protein N	Geçti	Steril
RSHM-TT0206	Geçti	1137 Lf/mg protein N	Geçti	Steril
RSHM-TT0207	Geçti	1093 Lf/mg protein N	Geçti	Steril
RSHM-TT0308	Geçti	1455 Lf/mg protein N	Geçti	Steril
RSHM-TT0309	Geçti	1344 Lf/mg protein N	Geçti	Steril

Tablo 4. Pilot RSHM TT aşılarda değişik zamanlarda yapılmış potens test sonuçları.

Ürün No.	Ürt. Tarihi	1. Test		2. Test		3. Test	
		Tarih	IU/doz	Tarih	IU/doz	Tarih	IU/doz
RSHM							
TT0001	17.10.00	27.10.00	>40	24.04.02	>40	03.12.03	>40
TT0103	03.05.01	09.07.01	>40	15.01.02	>4 USP*	24.04.02	>40
TT0104	20.09.01	03.12.01	>40	24.04.02	>40	03.12.03	>40
TT0105	24.09.01	03.12.01	>40	14.05.03	>40	03.12.03	>40
TT0206	05.02.02	12.08.02	>40				
TT0207	05.02.02	12.08.02	>40				
TT0308	24.04.03	18.06.03	>40				
TT0309	24.04.03	18.06.03	>40				

(*) FDA; Geçer: 2-4 USP Unit

(Tablo 4). Bu aşılarda aynı zamanda zararsız ve steril bulunmuşlardır (Tablo 5). Aşıların, flakonlarda 4°C’de üç yılı aşan süre boyunca bağışıklama gücü yönünden potent ve stabil oldukları saptanmış, aynı zamanda fiziksel olarak hiçbir bozulma göstermediği, partikülsüz olduğu, alhidrojelin homojen, opak görünümü ile geç ve düzgün çökme özelliğini koruduğu gözlenmiştir.

TARTIŞMA

Tetanoz toksoidi antijenik olarak kuvvetli bir protein olmakla beraber adsorbe formda daha potent ve uzun süre bağışıklık oluşturan bir yapı meydana getirir. Pek çok çalışmada, aşılarında alüminyum içeren adjuvantların varlığının daha yüksek antikor titreleri elde edilmesini sağladığı gösterilmiştir (6, 7). Pittman ve ark. (8) plain ve adsorbe aşılarla insanlarda yaptıkları bağışıklama çalışmalarında, antikor düzeyi bakımından bir yıl sonra önemli farklılıklar oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu kişilerde üç yıl sonra bile minimum koruyucu değer olan 0,01 IU/ml’in üzerinde serum antitoksin düzeyinin var olduğu ileri sürülmüştür. Bu araştırmacılar aynı zamanda toksoidler ile deney hayvanlarında yapılan testler sonucunda, plain aşılarla göre adsorbe aşıların çok daha potent olduğunu belirlemişlerdir. Bu durum, aşıların laboratuvar testlerinde belirlenen bağışıklama güçlerinin, insandaki koruyucu antitoksin seviyesi ile uyumlu olduğunu göstermiştir. İnsanda 0,01 IU tetanoz

Tablo 5. Final TT aşılarda zararsızlık ve sterilite kontrol testleri

Seri No	Zararsızlık	Sterilite
RSHM-TT0001	Zararsız	Steril
RSHM-TT0103	Zararsız	Steril
RSHM-TT0104	Zararsız	Steril
RSHM-TT0105	Zararsız	Steril
RSHM-TT0206	Zararsız	Steril
RSHM-TT0207	Zararsız	Steril
RSHM-TT0308	Zararsız	Steril
RSHM-TT0309	Zararsız	Steril

antitoksin düzeyinin minimum koruyucu değer olarak kabul edilmesi ise, antitoksin seviyelerinin semptomlar ve ölümlerle ilişkilendirildiği hayvan deneylerine dayanmaktadır (9, 10).

Tetanoz toksoidi potensinin yüksek düzeyde olması tetanoz hastalığına karşı korunmada önemlidir. Asya ve Afrika’da yürütülen pek çok saha çalışmasında, hamile kadınlara tetanoz aşısı uygulamalarının artmış olmasına karşın, neonatal tetanoz vakalarında görülen artışın, aşıların potenslerinin düşük olmasına bağlı olduğu ve bu durumun üretim kalitesi, depolama ve taşıma sırasındaki problemlerle ilişkili olabileceği bildirilmiştir (9).

Tetanoz aşularının potenslerinin iyi düzeyde ve stabil olması, esas olarak üretim yöntemlerinin iyi optimize edilmesi ile ilgilidir. Bu optimizasyonun, özellikle iyi kültür ve buna bağlı yüksek seviyede toksin üretimi yönünde yapılması yanı sıra, saflaştırma çalışmaları ve formülasyon düzeyinde de sağlanması gerekmektedir. Bu çalışmada, fermentör teknolojisi kullanılarak 300 litre kültür hacminde toksin üretiminin yüksek düzeyde gerçekleştirilmesi beş gün süren kültür koşullarının iyi optimize edilmesi ile sağlanmıştır. Seri kültür çalışmalarında Tablo 1'de görüldüğü gibi toksin miktarında 200 Lf/ml gibi yüksek bir değere ulaşılmış olup, son 8 seri kültürün ortalamasının 100 Lf/ml değerini geçtiği belirlenmiştir. Toksinin genel olarak MLD değeri yüksek bulunmuş ve son 8 seride MLD değerinin ortalama 1/3000000'un üzerinde olması ise üretilen toksinin kuvvetli toksijenik özellikte olduğunu göstermiştir. Toksinin formaldehit inaktivasyonu ile elde edilen toksoidin saflaştırılması çalışmalarında, tüm serilerde antijenitenin 1000 Lf/mg protein N'in üzerinde bir değer olarak elde edilmesi, WHO gerekliliklerine uygun saflıkta toksoid elde edildiğini göstermiştir (Tablo 3), (1, 2). Saflaştırılmış ve konsantre bulk toksoid' de yapılan spesifik toksisite testlerinin başarılı olması ve toksisiteye dönüşüm görülmemesi sonucunda toksoidin güvenilirliği de belirlenmiştir.

Adsorbe aşuların önemli komponentlerinden biri de formülasyonda kullanılan adjuvant maddelerdir. Adjuvantlar, organizmada antijenlere karşı bağışık yanıtın artırılmasını sağlayan ve moleküler düzeyde farklı etki mekanizmaları olan maddelerdir. Günümüzde insan aşularında kullanılan adjuvant maddeler alüminyum hidroksit, alüminyum fosfat ve kalsiyum fosfat olup, en çok alüminyum bileşikleri kullanılmaktadır. Toksoid aşılarda adsorpsiyon için kullanılacak adjuvant maddenin alüminyum hidroksit jeli olması durumunda ise aşının potensinin daha kuvvetli olacağı bildirilmiş ve diğer alüminyum fosfat ve kalsiyum fosfat tuzlarının toksoidler

için ikinci derecede adjuvantlar olduğu gösterilmiştir (6). Bu nedenle çalışmamızda alüminyum hidroksit jeli hazırlanarak adsorpsiyon aşamasında başarı ile kullanılmıştır. Bir insan dozu aşıda, WHO'ya göre 1.25 mg alüminyum bulunabilmektedir. Çeşitli aşı üreticilerinde bu miktar değişmektedir. Kullandığımız 0.45 mg alüminyum/doz konsantrasyonu, tetanoz toksoid proteini tamamen adsorbe etmiş ve in vivo potens testinde de yüksek oranda bağışık yanıt oluşumunu sağlamıştır. Adsorbe pilot tetanoz aşuları, ilgili tüm kontrol testlerinin yanı sıra stabilite testlerini test etmek için değişik zamanlarda, 3 yıllık aşkın bir sürede, yapılan potens testlerinden de başarı ile geçmiştir. Potens testleri WHO'un referans testi olan toksin challenge yöntemiyle gerçekleştirilmiş, IU değeri "paralel line assay" istatistik yöntemi ile standart aşuya karşı hesaplanmış ve tüm aşılarda potens değerleri 40 IU/doz üzerinde olarak tesbit edilmiştir (Tablo 4). Ayrıca bir seri aşı FDA (A.B.D) kontrol laboratuvarlarında United States Pharmacopea (USP)'a göre in vivo toksin nötralizasyon yöntemiyle test edilerek potens değeri çalışma aralığının üzerinde olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak yeni adsorbe tetanoz aşısı, yüksek verimli üretim yöntemi ve standartlara uygun kontrol sonuçları ile uzun kullanımlı, güvenilir ve yüksek derecede potent bir aşı olarak değerlendirilmiştir.

Tetanoz toksoidi, en çok uygulanan primer bağışıklama aşuları difteri-boğmaca-tetanoz (DBT), difteri-tetanoz (DT/çocuk) ve hayat boyu uygulanan tetanoz (TT) veya Td (difteri-tetanoz/erişkin) aşularında yer alan bir komponenttir. Bu nedenle bu çalışmada sunulan ve adsorbe tetanoz aşısı üzerine gerçekleştirilen çalışma ve sonuçlar yukarıdaki aşuların tamamı için de temel teşkil etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Fişek NH, Mueller H, Miller AP: The production of tetanus toxin. J Bact 67: 392 (1954).
2. WHO Manual for the production and control of

vaccines. Tetanus toxoid. BLG/UNDP/77.2 Rev 1, (1977).

3. WHO. Requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines. Expert Committee on Biological Standardization. Fortieth Report. WHO Technical Report Series 800: 87 (1990).

4. Lyng J: Quantitative estimation of diphtheria and tetanus toxoids. 4. Toxoids as international reference materials defining LF-units for diphtheria and tetanus toxoids. Biologicals 18: 11 (1990).

5. Manual of laboratory methods. For testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization, global programme for vaccines and immunization, vaccine supply and quality, World Health Organization, Geneva. WHO/VSQ/97.04. 1997, Part III: Potency control of bacterial vaccines.

6. Lyng J, Heron I and Ljungqvist L: Quantitative estimation of diphtheria and tetanus toxoids. 3. Comparative assays in mice and in guinea-pigs of two tetanus toxoid preparations. Biologicals 18: 3 (1990).

7. Gupta RK, Siber GR: Adjuvants for human vaccines – current status, problems and future prospects. Vaccine 13: 1263 (1995).

8. Pittman M, Kolb RW, Barile MF, Hardegree MC, Seligmann EB JR, Maclellan R, Schofield FD: Immunization against neonatal tetanus in New Guinea. 5. Laboratory assayed potency of tetanus toxoids and relationship to human antitoxin response. Bull Wld Hlth Org 43: 469 (1970).

9. Galazka, AM: The Immunological Basis for Immunization. Module 3: Tetanus. 1993. WHO/EPI/GEN/93.13

10. Plotkin SA, Orenstein WA: Vaccines. p. 755, 4th ed Saunders, Elsevier Inc USA, (2004).