

**Göksel ERBAŞ**  
**Osman KAYA**Adnan Menderes  
Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,  
Aydın, TÜRKİYE

## Veteriner Aşı ve Biyolojik Maddelerin Kalite Kontrollerinde Alternatif Metotlar

Son yıllarda veteriner aşı ve biyolojik maddelerin kalite kontrollerinde deneme hayvanı sayısının azaltılmasına yönelik geliştirilen alternatif yöntemlerin etkin olarak geliştirilmesi sonucunda, daha az sayıda deneme hayvanı kullanılarak daha etkin sonuçlara ulaşılmıştır. Bu sonuçların doğrultusunda hem üretilen aşı ve biyolojik maddelerin kalitesi daha iyi sorgulanmış hem de etik anlamda kullanılan deneme hayvanı sayısında önemli miktarlarda azalma sağlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Aşı, alternatif, deneme hayvanı.

### Alternative Methods in Quality Control of Veterinary Vaccine and Biological Materials

Recent years, as a result of the alternative methods developed in quality control of veterinary vaccines and biological products, using less experimental animals, more effective outcomes has been provided. From these results, the quality of the vaccines and biological products were investigated better, and the number of experimental animals used ethically.

**Keywords:** Vaccine, alternative, experimental animals.

### Giriş

Hayvan deneylerinin yerine geçen, kullanılan hayvan sayısını veya hayvanların çektiği acıyı azaltan uygulamalar alternatif yöntemler olarak değerlendirilmektedir. Alternatif yöntemlerin geçerliliğinin bilim adamlarınca kabul görmesi çok kısa bir süre önce olmasına rağmen, birkaç alternatif yöntem şu an hâlihazırda kullanılmaktadır. Aşı kontrolünde en sık olarak kullanılan alternatif metotlar in-vitro (doku kültürü) ve analitik (immüno kimyasal, fizikokimyasal v.b.) metotlardır (1).

### 1. Veteriner Sahada Kullanılan Aşıların Kalite Kontrolünde Alternatif Uygulamalar

#### 1-1. Bakteriyel Aşılar

##### 1.1.1. Sporlu Anthrax Aşısı

Avrupa farmakopi monograflarında sporlu anthrax aşısının potens testleri için 13 kobay veya tavşan veya da 8 koyun kullanılmasını şart koşmuştur. Weisser ve Hechler, önerilen bu koşulun yalnızca lisans alım sürecinde uygulanmasının yeterli olduğunu önermektedir. Araştırmacılar, lisans alım sürecindeki bu çalışmalar ışığı altında in vitro canlı spor sayısı ile sayımı yapılan aşının hedef hayvan üstünde oluşturacağı bağışıklık arasında kurulacak bir korelasyonun bizlere bağışıklık gücünü anlamada yeterli olacağını saptamışlardır (2).

##### 1.1.2. Brucella Aşısı

Yapılan test aşı suşunun organizmadaki beklenen periyodunu ortaya koymasına dayalıdır. Bakteri intrasellüler olarak yerleşir ve hücrel bir immun yanıt oluşturur. Aşının kalite kontrol denemelerinde 32 adet fare derialtı yolla aşılanır ve belli bir süreçten sonra hayvanların dalaklarından yapılan ekimde Brucella bakterileri tespiti yapılmaktadır. Bu teste alternatif bir yöntem henüz tespit edilememiştir. Weisser ve Hechler, bu denemelerin yalnızca lisans sürecinde yapılmasını önermektedir (2).

##### 1.1.3. Balık Aşıları

Avrupa Farmakopisinde balık aşıları hakkında 3 adet monograf bulunmaktadır. Bunlar Furunkulozis aşısı, Vibriosis (soğuk su) ve Vibriosis aşısı hakkındadır. Bu monograflar güvenlik testleri için 10, çelmeç testleri için 60 ve serolojik testler için ise 35 balığın kullanılmasını öngörmektedir. Farmakopi yönergelerinde özel durumlar haricinde veya inaktif balık aşılarının güvenlik testlerinde 30 balığın deneme hayvanı olarak kullanımını savunmaktadır (3).

**Geliş Tarihi** : 28.07.2011  
**Kabul Tarihi** : 08.09.2011**Yazışma Adresi**  
**Correspondence****Göksel ERBAŞ**  
Adnan Menderes  
Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı,  
Aydın - TÜRKİYE**g\_erbasm@yahoo.com**

Wagner ve arkadaşları tarafından Furunkulozis aşısının çelinc testlerinde kullanılan metoda alternatif olarak sandviç-ELISA yöntemi ile koruyucu antikorların tespiti yapılmıştır (4). Pund ve arkadaşları ise *Aeromonas salmonicida*'nın aşılansmış ve aşılansmamış balıklardaki lenfositlerden izolasyonunun karşılaştırılması kıyaslaması yoluyla sonuca ulaşılmasını önermişlerdir (5).

#### 1.1.4 Klostridial Aşılar

Veteriner hekimliğinde kullanılan Clostridium aşıları genellikle çok komponentli toksoid aşılardır. Temel yapı taşları *C. tetani*, *C. perfringens* Tip B, C ve D, *C. septicum*, *C. chauvoei* ve *C. novyi* Tip B dir. Bu komponentlerin her biri için hayvan deneyleri uygulamalarını içeren Avrupa Farmakopisinin uygun monograflarına göre kalite kontrolleri mevcuttur. Fareler ve kobaylardaki bu enfeksiyon ve intoksikasyon modelleri ki bunlar acılı, ağrılı ve sonuç olarak ta hayvanların en az % 50'sinin ölümüne neden olurlar, hem hayvanları koruma kanunları hem de *in vitro* metotların gelişimleri yönünden sorgulanmalıdır.

Bu metotlara alternatif olarak hem immuno hem de hücre kültürü yöntemleri önerilmektedir.

##### 1.1.4.1. Tetanoz Aşısı

Tetanoz aşısının bağışıklık denemeleri fare ve kobaylarda çelinc testi prosedürüne dayalı olarak yürütülmektedir. Bu yöntemde kısaca, ilk olarak kullanılan hayvanlar denemede kullanılacak olan aşının seri dilüsyonları ve referans tetanus aşısı kullanılarak immunize edilirler. İmmunizasyondan 4 hafta sonra tüm hayvanlar tetanus toksini ile çelinc (TNT testi) işlemine tabi tutulurlar ve 5 gün süre ile oluşan felçler gözlemlenir. Beş günlük süre sonunda teste tabi tutulan seri hakkında bir karara varılır. Testte kullanılan hayvanların % 50 kadarı çeşitli felç olaylarını takiben acı çekerek ölmektedirler. Yakın geçmişte bu denemeye alternatif olarak 2 farklı serolojik test yöntemi tanımlanmıştır. Bunlardan biri ELISA, diğeri ise Toxin Binding Inhibition (ToBI) testidir. Her ne kadar bu testlerde de hayvanlar kullanılmaya devam ediyorsa da sadece immunizasyon aşaması gerçekleştirilip kanları alınıyor ve daha sonrada bu kan serumlarında *in vitro* serum titrasyonlarına bakılıyor. Bu araştırmaların validasyon çalışmalarına Avrupa Farmakopi Komisyonu ve ECVAM tarafından 1992-1993 yıllarında başlanılmıştır. Çalışmada geniş bir laboratuvar ağı kullanılmıştır. Çalışma sonuçları 2000 yılı aralık ayı içerisinde tamamlanmıştır. Çalışma sonuçları Tetanoz aşısı kontrollerinde yapılan *in vivo* TNT testi yerine 2 farklı serolojik testin kullanılabilirliğini ispatlamıştır (6, 7). Avrupa Farmakopisi şu anda her iki metodu da yayınlamış ve kullanıma sunmuştur. Bu metodların kullanıma geçişiyle birlikte 3 R prensiplerine uyumda kendiliğinden oluşmaktadır. İlk olarak hayvanların çelinc uygulamalarında çektikleri ağrı ve ızdırıp oldukça azaltılmıştır. İkinci olarak da her iki serolojik testinde kullanıma girmesiyle birlikte kullanılan

hayvan sayısında % 70 dolaylarında azalma gözlemlenmiştir.

#### 1.1.4.2. Diğer Klostridial Aşılar

*C. botulinum*, *C. novyi*, *C. perfringens*, ve *C. septicum* aşılarının güvenlik kontrolleri için Avrupa farmakopisi tarafından yayınlanan monograflardaki prensip residual toksisitenin tespitine dayanmaktadır. *C. perfringens* ve *C. novyi* içeren aşıların değerliliği, toksoidlere karşı gelişen antitoksin içeriği tavşanlarda oluşan koruyucu antikorların miktarı ile tespit edilmektedir. Bu miktarın tespiti için kantitatif olarak farelerde TN (Toksin nötralizasyon) testi yapılmaktadır.

Costridial aşıların ve immunsorumların bağışıklık testleri için hayvanlar üzerinde uzun zaman ağrılı, acı veren denemeler yürütülmüştür. 1997 yılında Strasbourg'da EDQM tarafından organize edilen ve PEI ve RIVM katılımları ile yürütülen bir sempozyum organize edilmiştir (8). Aynı yıl Klostridial aşıların kontrolü için 4 monografra revizyona gidilmesi önerilmiştir. Bu öneriler fare nötralizasyon testleri yerine validasyonu tamamlanan immunkimyasallar metodu ve *C. novyi*, *C. perfringens* ve *C. septicum* aşılarının toksin nötralizasyon testlerinin hücre kültüründe yürütülmesi hakkındadır. Revize edilen monograflar Avrupa Farmakopisi 2001 eklerinde yürürlüğe girmiştir. Aynı zamanda bu ve benzeri birçok alternatif metot geliştirilmeye çalışılmaktadır.

*C. perfringens* ve *C. novyi* içeren aşıların değerliliği, toksoidlere karşı gelişen antitoksin içeriği tavşanlarda oluşan koruyucu antikorların miktarı ile tespit edilmektedir. Bu miktarın tespiti için geçmiş yıllarda kantitatif olarak farelerde TN (Toksin nötralizasyon) testi yapılmaktaydı. Günümüzde *C. novyi* ve *C. perfringens* gibi toksoidlerin tespitinde hücre kültürü metodları kullanılmaktadır. Hücre kültüründe kullanılan MDCK hücre hatları *Clostridium perfringens* epsilon toksini için, Vero hücre hatları ise *C. novyi* Tip-B Alfa toksini için spesifik ve duyarlıdır. Bu hücrelerle tavşan kan serumunda hem epsilon hem de alfa toksine karşı oluşan antikorların kantitatif tayini amacı ile tespiti yapılabilmektedir ve gerekli parametrelerin tekrarlanabilirliği de talimatlar ile standardize edilmiştir (9).

Toksin-antiserum karışımının tespiti için biyolojik indikatörü olarak permanent olarak çoğalabilen hücrelerin kullanımı, hayvan deneylerindeki LD<sub>50</sub>'nin belirlenmesine muhtemel bir alternatif olarak ortaya çıkmaktadır ve bundan dolayı da Clostridium aşılarının etkinlik kontrolleri için uygundur (9).

*C. chauvoei* aşılarının kontrolünde, kobayların kullanıldığı challenge testinde Avrupa Farmakopisinin öngördüğü % 100 koruma oranı Farmakopinin 2001 ekinde değiştirilmiştir. Yeni durumda bağışıklık testi uygulamalarında *C. chauvoei*'ye karşı geliştirilen koruyucu antijenlerin tespiti yapıldığı için çok daha az sayıda kobay kullanılmaktadır (10-14).

Amerika Birleşik Devletlerindeki otoriteler inaktive aşılardan potans testlerinde antijen ölçümü metodunun kullanılmasına izin vermektedirler fakat buna rağmen klostridial aşılardan hakkındaki kanunlar henüz değiştirilmemiştir. Hauer ve Clough, *C. chauvoei*'nin flagellası, *C. sordelli* letal toksini, *C. perfringens* alfa, beta ve epsilon toksinlerine karşı monoklonal antikorların hibridoma hücre hatlarında ürettiğini rapor etmişlerdir. Bu antikorlar, antijen ölçüm çalışmaları veya diğer alternatif çalışmalar amacıyla uluslararası olarak da temin edilebilmektedirler (11, 15).

#### 1.1.5. Erysipelas Aşısı

Domuzların inaktif Erysipelas aşısının kontrol teknikleri Avrupa Farmakopisi 2001 ekinde yayınlanan monograf ile değiştirilmiştir. Bu monograf ile birlikte potans testlerinde multi-dilüsyon aşılama ile kullanılan 100 adet fare yerine tekli dilüsyon aşılama ile 10 adet fare kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda çelinc testinin değiştirilmesi konusunda bir çok yeni serolojik model geliştirilmiştir (14, 16-18). PEI tarafından direkt ELISA metodu validasyonları yapılmıştır. Bu metod da 10 fare immunizasyon için aşılama ve immunizasyon sonucunda farelerden kan alınmaktadır. Daha sonra ELISA metoduyla kandaki Erisipelas antikorları hesaplanmaktadır. Bu yöntem sayesinde bir seri aşının kontrolünde kullanılan fare sayısı 100 den 10'a düşmüştür. Aynı zamanda PEI tarafından ELISA plaklarının kaplanması kullanılan referans antijenlerin üretimi de yapılmaktadır (19).

#### 1.1.6. Leptospira Aşısı

*Leptospira canicola*, *L. icterohaemorrhagiae* aşısının potans kontrolleri için Avrupa Farmakopisinde tanımlanan metoda göre Hamster çelinc testi kullanılmaktadır. Bu metotta beş adet hamster test aşısı ile immunize edilir. Immunizasyon sonucunda 5 deneme ve 5 kontrol hamstere aşıya uygun suş ile challenge testi uygulanır. Test sonucunda kontrol grubu hamster'lerden en az % 80'i enfeksiyondan ötürü ölmelidir.

Hamster çelinc modeli sığırların *L. hardjo* aşısının kalite kontrollerinde de kullanılmaktadır. Bu model de hayvanlar için biraz daha zordur, çünkü deneme sonunda karaciğerden bakterinin tekrar izolasyonuna gidilmektedir.

Bu tetkiklerin yüksek sayıda hayvan kullanılması ve challenge suşlarında çok miktarlarda kullanılması gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Aynı zamanda insanlar da bu leptospira bakterilerine yüksek hassasiyet taşımaktadırlar. Bu da laboratuvarında çalışan personel açısından önemli bir risk yaratmaktadır (20, 2). Veteriner kullanımındaki Leptospira aşısının kalite kontrol testlerindeki challenge testlerine alternatif yaklaşımların incelendiği bir çalışmada (21) serolojik (immunize edilen hayvanların kullanıldığı) ve antijen kuantifikasyon (hayvan kullanımının uygulanmadığı) metodları kullanıma sunulmuştur.

#### 1.2. Viral Aşılardan

##### 1.2.1. Kanatlı Viral Aşılardan

Avrupa Farmakopisi kanatlı aşılardan hakkında 2 genel metin ve 13 tane de monograf ihtiva etmektedir. Bu bildirimlerde hayvanlardaki güvenlik ve potans testleri ve yabancı ajanlar yönünden kontaminasyon tespiti yapılması tanımlanmaktadır. Burada üstünde durulması gereken konu çok sayıda hayvan kullanılması gerektiğidir. Bu amaçla her yıl ortalama 1800 adet aşının kalite kontrol testlerinde 51.000 adet tavuk kullanıldığı saptanmıştır (22).

Günümüzde testlerde kullanılan büyük miktardaki hayvan sayısının Üç R's yöntemlerinin uygulamaya sokularak azaltılmasını amaçlayan birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmaları, yapılan testleri ayrı ayrı değerlendirdiğimizde inceleyecek olursak aşağıdaki gibi sınıflandırabiliriz:

##### a. Ürünün yabancı ajanlar yönünden kontrolü testleri;

Canlı kanatlı aşılardan hakkındaki Avrupa Farmakopisi metini 2.6.4'te son ürünün, yabancı ajanlar yönünden kontrolünde, muhtemel kontaminantların aranması amacıyla yumurta, hücre kültürü ve tavukların kullanılması koşulu vardır. Günümüzde en az hayvan testleri kadar güvenilir olan PCR teknikleri de kullanılmaktadır. Bunlardan bazılarının validasyonları tamamlanmış ve kullanıma sunulmuşlardır, bazıları ise henüz geliştirilme aşamasındadırlar.

##### b. Güvenlik Testleri

Memeli aşılardan güvenlik testlerinde 2 adet hayvan kullanılırken, kanatlı aşılardan güvenlik testlerinde kullanılması gereken 10 adet hayvanın hiçbir bilimsel ve istatistiksel dayanağı bulunmamaktadır.

Bu durumun araştırılması için PEI ve AGAATI tarafından iki adet araştırma yürütülmüştür (European Center for the Validation of Alternative Methods - ECVAM tarafından finansmanları sağlanmıştır). Araştırmada aşı üreticilerinin ve kontrol kurumlarının verileri geçmişe yönelik olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda son yıllarda denemeye giren aşılardan hepsinin bu hayvan denemelerinden geçtiği görülmüştür. Bu sürede sahadan da herhangi bir problemin rapor edilmediği saptanmıştır. Bu sonuçlardan sonra bu HHGT'lerinin kullanımı sorgulanmaya başlanmış ve bu konudaki monografda da HHGT'lerin iptalinin tavsiye edilmesi gerektiği tartışılır duruma gelmiştir. Hedef hayvan güvenlik testlerinin yalnızca ürünlerin lisans alım aşamasında sınırlı bir üretim serisine (kendi içinde tutarlılığı sağlayana kadar) veya üretim aşamalarında herhangi bir değişikliğe gidileceği zaman yapılması gerektiği savunulmaktadır (22).

##### c. Potens Testleri

Canlı kanatlı aşılardan potans testlerinde bir seri kontrolünün temsiline yeterli kabul edilmesinin aksine inaktive kanatlı aşılardan her seriye potans testi uygulanması zorunluluğu vardır. Bu da çok sayıda hayvanın kullanılması ve zarar görmesi anlamına

gelmektedir. Bundan dolayı da birçok aşının potens kontrolünde serolojik yöntemler yardımı ile immunizasyon sonrası antikor tespitinin hesaplanmasına gidilmektedir. Son yıllarda antijen miktarı hesaplanmasını temel alan ve hayvan kullanımını gerektirmeyen *in vitro* metotlar geliştirilmeye başlanmıştır. İnaktif Newcastle hastalığı (ND) aşısının potens kontrolünde bu yol ile önemli başarı sağlanmıştır (23, 24). Bu teknik aşılama sonrası kanda üretimi olan ND antijenlerinin (HN-proteini ve F-proteini) ölçümü temeline dayanmaktadır. Bu ölçüm metodu için iki ayrı ELISA prosedürü geliştirilmiştir. Bu metodlarla aşısındaki virus titresi ile aşılama sonrası immunize serum arasında çok iyi bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Denemeler her iki metodun da tekrarlanabilirliğini ve hassaslığını ortaya koymuştur (24).

İnaktif Bursal Diseases aşısı içinde aynı şekilde immunizasyondan sonraki antijen titresinin hesaplanması temeline dayalı bir metot geliştirilme aşamasındadır.

### 1.2.2. Şap Aşısı (Foot and Mouth Disease)

#### Güvenlik

Avrupa farmakopisinde Şap aşısının güvenlik kriterleri için kullanılan virus hatlarının yeterli inaktivasyonu şart koşulmuştur. Bu durumun test edilebilmesi için yeterli hassasiyet hücre kültürü tekniklerinde bulunmaktadır (25).

#### Potens

Şap aşısının potens testleri multi-dilüsyon aşılması ile çelinç uygulamasına tabi tutulan 17 sığırdaki yürütülmektedir. Bu sayının indirilebilmesi için çelinç testinde tekli dilüsyon kullanılabilir. Weisser ve Hechler tarafından alternatif bir metot geliştirilmiş fakat henüz valide edilmemiştir (2). En uygun alternatif yöntemler antijen hesaplanması temeline dayanan metot (26, 27, 28) veya Sandviç ELISA yöntemi ile aşılama sonrası hayvanların kan serumlarındaki Şap aşısına karşı oluşan antikorların hesaplanmasına dayanan metot (29) ya da BHK21-CT hücre hattında plak azaltma yöntemidir (30).

### 1.2.3. Kuduz Aşısı

#### 1.2.3.1. İnaktif Kuduz Aşısı

İnaktif Kuduz aşısı kontrollerinde Avrupa Farmakopisi monograflarına göre kuduz virusunun inaktif olup olmadığı, 10 adet fareye aşının beyin içi enjeksiyonu yapıp hayvanların gösterecek olduğu semptomların takibine dayalı olarak yapılmaktadır. Bu testin hassaslığı konusunda bazı şüpheler yer almaktadır (31, 2). Günümüzde aşı üreticileri inaktivasyon periyodunu adjuvantın katımından hemen sonra yürütülmektedirler ve yeni geliştirilen *in vitro* metotlar yardımı ile de bu aşamadan sonra aktif kuduz virüslerinin tespiti yapılabilmektedir (32, 33). Yeni geliştirilen bu metotlar yardımıyla da son ürün üzerinde farelere beyin içi enjeksiyon yapılması ile yürütülen inaktivasyon testleri de terk edilebilmektedir.

### Potens testleri

Avrupa Farmakopisi monograflarında RFFIT testi ile kuduz antikorlarının tespiti ve ELISA testi ile *in vitro* antijen hesaplanması tekniklerine izin verilmiştir. Bununla birlikte uygulanan bu testlere paralel olarak NIH (National Institute for Health) tarafından tanımlanan testler de yapılabilir.

#### 1.2.3.2. Canlı Kuduz Aşısı

#### Potens

Canlı kuduz aşıları tilkiler için kullanılmaktadır. Aşının potens tespiti için amacı ile 25 adet tilki immunizasyon amacı ile aşılanmaktadır. İmmunizasyon aşaması sonrasında aşı grup ve 10 adet aşısız kontrol grubu hayvan kuduz virusu ile challenge işlemine tabi tutulurlar. Bu teste alternatif bir yöntem henüz tanımlanamamıştır. Weisser ve Hechler yaptıkları istatistiksel çalışmalar sonucunda deneme grubu için 15, kontrol grubu içinde 5 adet hayvan kullanımının yeterli olacağını bildirmektedirler (2).

Avrupa Farmakopisi, üretilen serilerin kontrollerinde belli bir tutarlılığın sağlanmasından sonra rutin yapılan potens testlerinin atlanmasına izin vermiştir.

#### Sonuç

Günümüzde hayvan deneylerine alternatif teşkil edebilecek olan doku kültürleri, bilgisayar teknolojisi, immunolojik teknikler ve kimyasal yöntemler hızla gelişmektedir. Moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler ile, örneğin, DNA çip teknolojisi sayesinde belirli hastalıklarda hangi genlerin rol oynadığını hakkındaki spesifik bilgiye ulaşılabilmektedir. Bu alanda kısmende olsa hayvan kullanılmamaktadır.

Son yıllarda Hayvan deneylerine alternatif uygulamalar tüm dünya da yaygın olarak kullanıma geçmiştir. Bunun en önemli örneklerinden biri de güçlü bir biyolojik madde üreticisi olan Çin'de görülmektedir. Çin Farmakopisinin 2005 yılı baskısı ile üretilmekte olan 139 çeşit ilaç ve biyolojik maddenin kalite kontrollerinde pirojen maddelerin tespiti için çok sayıda tavşan kullanımını yerine LAL testine geçilmesi uygun görülmüştür (34).

Ayrıca Aşı ve biyolojik maddelerin üretiminde kullanılan tekniklerde standardizasyonun sağlanması ve GMP uygulamalarının benimsenmesi de kullanılan deneme hayvanı sayılarında önemli bir azalmaya sebebiyet vermektedir (1).

Aynı zamanda Avrupa birliği yönetmeliklerinin ve sıklıkla bu konuda yayınlanan birlik çalışma kılavuzlarının da aşı ve biyolojik madde kalite kontrollerinin yapıldığı laboratuvarlarca takip edilmesi ve ortak yapılan çalışmalara katılınması, kendisini kanıtlamış referans laboratuvarlar tarafından yapılan testlerin aşının satışa sunulacağı diğer ülkeler tarafından kabulünün sağlanması yolu ile de testlerin her ülke tarafından tekrar

yapılmasının önüne geçilerek kullanılan deneme hayvanı sayısının azaltılması öngörülmektedir (35, 36).

Bir diğer değerlendirme ise üretilen seriler arası tutarlılığın biyoanalitik ve diğer test yöntemleri ile ortaya konularak zaman içerisinde her seriye uygulanan testlerin sıklığının azaltılma yoluna gidilmesidir (37).

### Kaynaklar

1. de Mattia F, Chapsal JM, Descamps J et al. The Consistency approach for quality control of vaccines – A strategy to improve quality control and implement 3Rs. *Biologicals* 2011; (39): 59-65.
2. Weisser K, Hechler U. Animal welfare aspects. In: the quality control of immunobiologicals. A critical evaluation of animal tests in pharmacopoeial monographs. Published by FRAME, Nottingham, UK for ECVAM and the Paul-Ehrlich-Institute. 1997.
3. EU. The rules governing medicinal products in the European Union. Eudralex: 1999; <http://dg3.eudra.org/eudralex/download.htm>
4. Wagner U, Hädge D, Lachmann I, Drössler K. Development of an ELISA-system for the assessment of furunculosis vaccine (German). *ALTEX* 15 Supplement, 1998; 79-82.
5. Pund RP, Nold K, Henrion E. [Testing fish vaccines with an in vitro lymphocyte blastogenesis assay (German)]. *ALTEX* 15 Supplement, 1998; 75-79.
6. Council of Europe, Tetanus vaccine for veterinary use. *Pharmeuropa* 8, 1996; 238-240.
7. Hendriksen CFM, Woltjes J, Akkermans AM, van der Gun JW, Marsman FR, Verschure MH & Veldman K. Interlaboratory validation of in vitro serological assay systems to assess the potency of tetanus toxoid in vaccines for veterinary use. *Biologicals* 1994; 22: 257-268.
8. Council of Europe, Alternative potency testing and other possible related quality issue for clostridial vaccines. Proceedings of the symposium on veterinary clostridial vaccines. 4-6 February 1997, Strasbourg, France. *Pharmeuropa Special Issue*, 1997; BIO 97-1, pp. 88. Strasbourg: Council of Europe
9. Borrmann E, Schulze F, Diller R. Entwicklung von in vitro Methoden zur Wirksamkeitsprüfung von Clostridien-Impfstoffen. *ALTEX* 2001; 18: 34-36.
10. Hauer PJ, Clough NE. Development of monoclonal antibodies suitable for use in antigen quantification potency tests for clostridial veterinary vaccines. In: Brown F, Hendriksen CFM, Sesardic D. (Editors), *Alternatives to animals in the development and control of biological products for human and veterinary use (85-94)*. Developments in Biological Standardization, Basel: S. Karger AG, 1999; 101.
11. Hauer PJ. Viewpoint from the USA authorities. Recent development on different clostridia. *Pharmeuropa Special Issue*, 1997; BIO 97-1, 47-58.
12. Kijima-Tanaka, M, Ogikubo Y, Kojima S. Flagella based enzymelinked immunosorbent assay for evaluation the immunity in mice vaccinated with blackleg vaccines. *Journal of Microbiological Methods* 1998; 32: 79-85.
13. Redhead K, Lucken R, van de Moer A. Veterinary Vaccines: In-VITRO – International Veterinary Industry Test Replacement Organisation. In: Brown F, Hendriksen CFM, Sesardic D. (Editors), *Alternatives to animals in the development and control of biological products for human and veterinary use (261-266)*. Developments in Biological Standardization, Basel: S. Karger AG, 1999; 101.
14. Rosskopf-Streicher U, Johannes S, Hausleithner D. Suitability of an ELISA for the batch potency testing of erysipelas vaccines. *Pharmeuropa Special Issue*, 1998; BIO 98-1, 65-70.
15. Roth F, Seifert, HSH. Development of in vitro methods for the potency testing of blackleg vaccines based on soluble and cellular antigens of *C. chauvoie*. *Pharmeuropa Special Issue*, 1997; BIO 97-1, 21-29.
16. Beckmann R, Cussler K. Wirksamkeitsprüfung von Rotlaufimpfstoffen an der Labormaus. ELISA kontra Infektionsversuch. *ALTEX Supplement* 1994; 1, 39-45.
17. Redhead K. Preparation of an inhouse reference vaccine: results of in vitro studies in pigs. *Pharmeuropa Special Issue*, 1998; BIO 98-1, 50-55.
18. Rosskopf-Streicher U, Johannes S, Wilhelm M, Cussler K. Quality control of inactivated erysipelas vaccines: results of an international collaborative study to establish a new regulatory test. *Vaccine* 2001; 19: 1477-1483.
19. Rosskopf-Streicher U, Johannes S, Wilhelm M. Potency testing of swine erysipelas vaccines by serology - results of a prevalidation study. *ALTEX* 1999; 16: 123-128.
20. Marbehan P. Leptospiral vaccines batch potency testing. European monograph status review. *Pharmeuropa Special Issue*, 1999; BIO 99-2, 11-16.
21. Council of Europe, Alternatives to animal challenge tests in the batch control of *Leptospira* vaccines for veterinary use. *Pharmeuropa Special Issue*, 1999; BIO 99-2, pp. 135. Strasbourg: Council of Europe
22. Bruckner L, Bongers J, Castle P, ve ark. Three Rs approaches to the production and quality control of avian vaccines. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 41. *ATLA* 2000; 28, 241-258.
23. Maas RA, Oei HL, Kemper S. The use of homologous virus in the haemagglutination-inhibition assay after vaccination with Newcastle disease virus strain La Sota or clone 30 leads to an overestimation of protective serum antibody titers. *Avian Pathology* 1998; 27, 625-631.
24. Maas R, de Winter M, Koch G. Development of an in vitro potency test for inactivated newcastle disease vaccines. In Balls M, van Zeller AM, Halder ME. (Editors), *Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation* Amsterdam: Elsevier Science B.V. 2000; 959-967.
25. Anderson EC, Capsick PB, Mowat GN, Leech FB. In vitro method for the safety testing of foot-and-mouth disease vaccines. *J Hyg Camb* 1970; 68: 159-17.

26. Black L, Rweyemamu MM, Boge A. Revaccination response of cattle as a function of the 140S foot-and-mouth disease antigen. *Journal of Comparative Pathology* 1984; 94: 417-424.
27. Pay TWF, Hingley PJ. Correlation of 140S antigen dose with the serum neutralising antibody response and the level of protection induced in cattle by foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* 1987; 5: 60-64.
28. Rweyemamu MM, Black L, Boge A. The relationship between the 140S antigen dose in aqueous foot-and-mouth disease vaccines and the serum antibody response of cattle. *Journal of Biological Standardization* 1984; 12, 111-120.
29. Hamblin C, Barnett ITR, Crowther JR. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus). *Journal of Immunological Methods* 1986; 93: 123-129.
30. Thalmann G, Nöckler A, Felfe P, Kreienbrink G. Erarbeitung und Einsatz von Laborverfahren zur Wirksamkeitsprüfung von Maul-und-Klauenseuche-Vakzinen für Rind und Schwein. *Archives of Experimental Veterinary Medicine* 1987; 41: 806-811.
31. Hendriksen CFM. Opportunities for replacement, reduction or refinement: Veterinary vaccines for mammals. In: Hendriksen CFM. (Editor), *Laboratory Animals in Vaccine Production and Control*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988; 125-139.
32. Blum SAE, Braunschweiger M, Krämer B. ve ark. Proof of complete virus inactivation in rabies vaccines by either intracerebral injection of mice or fluorescent antibody technique (FAT) – a quantitative comparison. In: Brown F, Hendriksen CFM, Sesardic D. (Editors), *Alternatives to animals in the development and control of biological products for human and veterinary use* (302). *Developments in Biological Standardization*, Basel: S. Karger AG, 1999; 101.
33. Ullrich L. Ersatzmethoden in der Diagnostik. In *Tierlaboratorium Tierlaboratorien Zentrale, Institut für Tierschutz, Verhaltenslehre und Versuchstierkunde der Freien Universität Berlin*. Berlin: Universitätsdruckerei 1993; 107-119.
34. Zhengming HE. Alternative methods for animal tests in the quality control of biologicals products of China. *AATEXS* 2007, 14, Special Issue, 591-593.
35. Brown F, Hendriksen C, Sesardic D, Cussler K, editors. *Advancing science and elimination of the use of laboratory animals for development and control of vaccines and hormones*. *Dev Biologicals*, Basel: S. Karger AG, 2002; vol. 111.
36. Hendriksen CFM. Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8: 313-322.
37. Metz B, Jiskoot W, Hennink WE, Crommelin DJ, Kersten GFM. Physicochemical and immunochemical techniques predict the quality of diphtheria toxoid vaccines. *Vaccine* 2003;12: 156-167.