

Shigella Enfeksiyonlarında Koruyucu Aşı Çalışmaları

Protective Vaccine Researches in *Shigella* Infections

Begüm Saran, Birsal Erdem

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Enterobacteriaceae ailesinin bir üyesi olan *Shigella* cinsi tüm dünyada endemik olarak görülmekte, özellikle gelişmekte olan ülkelerde yüksek mortalite ile seyreden enfeksiyonlara neden olmaktadır. Hastalık çoğunlukla 5 yaşın altındaki çocuklarda görülmekte ve dünyada çocuk ölümü nedenlerinin arasında önemli bir yer tutmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) şigelozu karşı koruyucu aşı geliştirme çalışmalarını öncelikleri arasına almıştır. *Shigella* enfeksiyonları için koruyucu aşılar, bakteri O polisakariti taşıyıcı bir protein ile bağlanarak parenteral, oral veya intranasal uygulanan konjuge aşılar; hastalık oluşturmada koruyucu etki sağlamayı hedefleyen canlı attenue aşılar; patogeneizde rol oynayan genlerin aydınlatılması ile genetik yoldan elde edilecek canlı oral aşılar; hibrit canlı vektör *Shigella* aşıları; geniş spektrumlu aşılar ve invazin kompleks aşısı üzerinde yoğunlaşmıştır. Son yıllarda *Shigella* virülans faktörlerinin ve patogenezinin iyice aydınlatılması ile gelecekte umut vaat eden aşılar elde edilmiştir. Bu derlemede, koruyucu ve güvenilir aşı elde etmek için geçmişten günümüze yapılan aşı geliştirme stratejileri incelenmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Shigella*, Aşı çalışmaları

Shigella, a member of enterobacteriaceae, is endemic over the world and causes infections with high mortality rates especially in developing countries. Disease is more common among children under 5 years old and is an important cause of children death in world. World health organisation (WHO) consider the researches of a protective vaccine development for shigellosis as a priority. Protective vaccines for *Shigella* infections are focused on conjugate vaccines based on bacterial O polysaccharide linked to a carrier protein administered by parenteral, oral or intranasal; live attenuated vaccines conferring protection without causing disease; live oral vaccines obtained by genetic process following the discover of genes involved in pathogenesis; hybrid live vector *Shigella* vaccines; wide spectrum vaccines and invazin-complex vaccines. Last years, since virulence factors and pathogenesis of *Shigella* are discovered, promising vaccines for future are developed. In this review, vaccine development strategies for obtaining protective and safe vaccines from past to now are investigated.

Key Words: *Shigella*, Vaccine researches

Şigeloz, *Shigella* türlerinin neden olduğu, kramp tarzında karın ağrıları, tenesmus ve kanlı mukuslu ishale kendini gösteren bir hastalıktır. Tüm dünyada, özellikle gelişmekte olan ülkelerde endemik olarak görülmektedir. Her yıl ortalama 165 milyon insanı etkilemektedir. Bunların 100 milyonu gelişmekte olan ülkelerde görülmekte ve 1 milyon kişinin ölümüne neden olmaktadır. Hastalık daha çok 1-5 yaş arasındaki çocuk popülasyonunda görülmektedir (1, 2). Şigeloz özellikle gelişmekte olan ülkelerde, ekonomik koşulların yetersiz olması, uygun beslenememe, hijyen kurallarına dikkat edilmemesi, tedavi olanaklarının sağlanamaması gibi nedenlerle yüksek mortalite ve morbidite ile seyretmekte

ve önemli bir halk sağlığı problemi olarak durmaktadır. *Shigella* ayrıca gelişmiş ülkelerden gelişmekte olan ülkelere seyahat eden yolcularda, askerlerde önemli bir enfeksiyon etkenidir. Okullarda, bakımevlerinde, askeri kışlalarda salgınlar meydana getirmektedir (3). En sık görülen türler *S. sonnei* ve *S. flexneri* türleridir. Gelişmekte olan ülkelerde *S. flexneri* sık görülürken, gelişmiş ülkelerde *S. sonnei* daha sık görülmektedir. *S. dysenteriae* daha az sıklıkla görülmesine rağmen diğer etkenlere göre ciddi, yüksek mortalite ile seyreden enfeksiyonlara yol açmaktadır (4,5).

Şigeloz'da koruyucu aşı çalışmaları *S. sonnei*, *S. flexneri* ve *S. dysenteriae* üze-

Başvuru tarihi: 05.11.2010 • Kabul tarihi: 04.04.2011

İletişim

Dr. Begüm SARAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Sıhhiye
Tel : 0 312 595 81 97
GSM : 0 532 773 71 25
E-Posta : begumsaran@gmail.com

rinde yoğunlaşmıştır. Etkin ve güvenilir *Shigella* aşısının yaygın olarak kullanılımı, bu enfeksiyonun önüne geçmek için uzun zamandır düşünülen bir stratejidir. Basilli dizanteri hastalığını önlemek için araştırmacılar 50 yılı aşkın süredir güvenilir etkin koruma sağlayacak aşı geliştirme çalışmaları yapmışlardır (6). *Shigella* patogenezinin aydınlatılması ile son zamanlarda aşı çalışmalarında önemli aşamalar kaydedilmiştir. Bu yazıda *Shigella*'larda koruyucu aşılar ile ilgili gelişmelere ışık tutulacaktır.

Bağışıklamada Lipopolisakkarit'in rolü

Shigella'larda lipopolisakkarit (LPS) virulans faktörü olarak kabul edilmektedir. Çeşitli çalışmalarla LPS'in O antijenine karşı oluşan serum ve/veya mukozal antikorların enfeksiyona karşı korunmada rol oynadığı ortaya konulmuştur. Şigelozun endemik olarak görüldüğü Şili'de yapılan çalışmada en sık görülen *S. sonnei*, *S. flexneri* 2a ve *S. flexneri* 6 türleri ile enfeksiyon sonrasında homolog tiplerle tekrarlayan şigeloz vakaları incelenmiştir. İlk şigeloz ardından, homolog serotiple sekonder hastalığa karşı koruyuculuk oranı % 72, heterolog serotipe karşı da %30 bulunmuştur (7). Tacket ve ark.'nın yaptığı çalışmada gönüllülere yüksek titrede anti *S. flexneri* antikorları oral olarak verilmiş ve deneysel vahşi tip *S. flexneri* 2a 2457T suşu ile oluşturulan enfeksiyona karşı koruyuculuk sağlanmıştır. Düşük titrede anti *S. flexneri* antikorları ise koruyuculuk sağlayamamıştır (8). Bu bulgular ışığında aşı çalışmaları, korunmada kilit rol oynayan LPS odaklı olarak geliştirilmeye devam edilmiştir. Diğer yandan sadece LPS değil, bilinen ya da bilinmeyen tüm antijenik komponentleri içeren inaktive ölü aşılar da *Shigella* üzerinde denenmiştir. Teorik olarak koruyucu olduğu düşünülen bu aşının, hazırlanma aşamasında ısı, formalin, aseton gibi maddelerle inaktivasyon işlemleri sırasında antijen kayıpları ve hasarları meydana gelmekte bu da aşının koruyuculuğunu azaltmaktadır (9). *Shigella* aşı çalışmalarında koruyuculuk oluşturmak

için LPS'ler üzerinde yoğunlaşmış ve O polisakkariti taşıyıcı bir protein ile bağlanarak parenteral, oral veya intranasal uygulanan konjuge aşılar geliştirilmiştir.

Shigella Konjuge Aşıları

Çeşitli çalışmalarda *Shigella* LPS'lerinden elde edilmiş ve taşıyıcı protein ile kovalen bağlanmış O polisakkaritleri içeren parenteral konjuge aşılar geliştirilmiştir. LPS'ler bu amaçla *Pseudomonas aeruginosa* ekzotoksin A (rEPA), *Corynebacterium diphtheriae* toxin mutant (CRM9), proteozom ve ribozom gibi yapılarla konjuge edilmişlerdir.

Cohen ve ark., rekombinant *Pseudomonas aeruginosa* ekzotoksin A (rEPA) ile konjuge *S. sonnei* ve *S. flexneri* içeren parenteral aşı prototipini, genç İsraili askerlerde denemiş ve bu aşığı serumda O polisakkaritlerine spesifik IgG ve IgA antikorlarını uyarmada yüksek oranda immünojenik bulmuşlardır. Oluşan antikor titreleri 2 sene yüksek seyretmiş, ayrıca aşının iyi tolere edilebildiği gözlenmiştir (10). İsraili askerlerde yapılan bir diğer çalışmada tek doz *S. sonnei*-rEPA aşısının koruyuculuğu %74 bulunmuştur (11).

Şigelozun çocuklar arasında daha sık gözlenmesi nedeniyle çocuk yaş grubundaki çalışmalara dayanan aşı araştırmaları yapılmıştır. Ashkenazi ve ark. *S. sonnei*-rEPA ve *S. flexneri* 2a-rEPA aşılarını kullanılarak yaptıkları iki doz bağışıklama çalışmaları, 4-7 yaş arası çocuklarda homolog LPS'lere karşı serumda IgG, A ve M'de belirgin artış sağlamıştır. Serum antikor cevabı nötral enfeksiyon geçirenler ile benzer bulunmuştur. Aşılamadan sonra antikorlar 6 ay yüksek seyretmiş, güvenilir bağışıklık sağlanmıştır (10). *S. sonnei*-*Corynebacterium diphtheriae* toxin mutant (CRM9) ve *S. flexneri* 2a-rEPA 1-4 yaş grubundaki çocuklarda denenmiş, bağışıklık sistemini uyardığı ve güvenilir olduğu bulunmuştur. Elde edilen antikor titreleri aşılama sonrasında iki sene boyunca yüksek seyretmiştir. Çocuklarda anti-LPS antikor miktarlarının birbirine benzer ancak erişkinlerdeki

düzeyden düşük olduğu bulunmuştur (13).

Chowers ve ark., yaptıkları çalışmada konjuge aşılarla aşılanan çocukların serumlarından antikorlar elde etmiş ve bunların *Shigella*'nın epitel hücrelere invazyonu ve inflamatuvar cevabı uyarma üzerindeki etkisini caco-2 hücreleri üzerinde invitro olarak incelemişlerdir. Bağışık serumun, *Shigella*'nın caco-2 hücrelerine girişini tipe özgü olarak engellediğini görmüşlerdir. Ayrıca O polisakkaritine özgü IgG'nin, *Shigella*'nın yeni hücreleri infekte etmesini önleyerek oluşan hastalığın tedavisi için de etkili olduğunu göstermişlerdir (14). Şu anda İsrail'de 1-4 yaş arası çocuklarda 6 hafta ara ile 2 doz parenteral uygulanan *S. sonnei*-CRM9 ve *S. flexneri* tip 2a-rEPA konjuge aşılarının etkinliği ve güvenilirliği üzerinde çalışmalar devam etmektedir (15).

LPS ile yapılan bir başka aşı çalışması da *S. flexneri* 2a ve *S. sonnei* LPS'ini proteozom ve ribozom ile birleştiren uygulama olmuştur. Proteozom-LPS aşısı hedeflenen mukozal dokuları direk uyarmak amacıyla oral veya intranasal uygulama için tasarlanmıştır. Bu sayede lokal bağışıklığı ve mukozal Ig yapımını uyarır. Bu amaçla *S. flexneri* 2a ve *S. sonnei* LPS' i, grup C tip 2b *Neisseria meningitidis* dış membran protein proteozomu ile konjuge edilmiş ve geliştirilen aşı öncelikle farelere uygulanmıştır. İntranasal uygulamada serumda ve intestinal sıvıda yüksek anti-LPS antikorları elde edilmiştir (16). Orr ve ark., proteozom-LPS aşısına kolera toksin B altünitesi eklendiğinde, bağışıklığı uyarmak için gerekli dozun düştüğünü, bağışık cevabın arttığını göstermişlerdir (17). Fries ve ark. *S. flexneri* 2a lipopolisakkarit (LPS)-proteozom aşısını sağlıklı erişkinler üzerinde denemişlerdir. Aşı intranasal uygulanmış, doza bağımlı olarak sistemik ve mukozal bağışıklığı uyarmada etkili bulunmuştur (18). *Shigella* ribozomal aşısı (SRV), *Shigella* O antijeninin ribozom ile bağlanması sonucu elde edilmiştir. Bu aşı hayvan modellerinde parenteral uygulanarak denenmiş, sistemik ve mukozal bağışıklığı uyardığı görülmüştür (19). SRV,

2007'de Kore'de International Vaccine Institute'de farelerde intranasal olarak uygulanmış; mukozal ve sistemik antikor yapımını uyardığı gösterilmiştir (20).

Aşı çalışmalarında sentetik olarak elde edilen oligosakkaritler de kullanılmıştır. *S. flexneri* serotip 2a O antijenini taklit eden sentetik oligosakkaritler tetanoz toksoidi ile konjuge edilerek etkin anti-LPS antikor yanıtı elde etmek amaçlanmıştır. Bu çalışma gelecekte kimyasal glikokonjuge aşı üretimi için umut verici olmuştur (21).

Canlı Attenue Aşılar

Şigellozun endemik bölgelerde daha çok çocuklarda gözlenmesi ve yaş ilerledikçe görülme sıklığının azalması doğal infeksiyonlarda başarılı bir kazanılmış immünite varlığını düşündürmüştür. Bu etkinin oral yolla aşılama ile taklit edilebileceği düşünülmüş bu nedenle *Shigella* aşı çalışmaları, hastalık oluşturmadan koruyucu etki sağlayan canlı attenue suşların geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalarla klasik attenuasyon yoluyla canlı *Shigella* aşılı ve genetik olarak belirlenen mutasyonlar uygulanarak canlı *Shigella* aşılı geliştirme çabaları sürdürülmektedir.

Şigellozda canlı attenue aşılama çalışmalarını fare deneylerinden sonra insanlar üzerinde ilk olarak 1965'te Mel ve ark. tarafından Military Medical Institute'de yapılmıştır. Araştırmacılar *Shigella* serotiplerini, streptomisin içeren vasata seri olarak pasajlayarak streptomisin resistant (streptomisin dirençli; SmR) suşlarla toksijenitesi ve bağışıklık sistemini uyarma niteliği aynı olan streptomisin-dependent (Streptomisin bağımlı; SmD: eksojen streptomisin yokluğunda üremeyen) suşlar elde etmişler. Gönüllüler ve askerler üzerinde yapılan çalışmalarda oral SmD aşısının lokal bağışıklığı uyardığı ancak serumda antikor üretimini arttırmada yetersiz olduğu görülmüştür. Ayrıca bu aşının diyare oluşturma riski yüksek bulunmuştur (22). Bir başka çalışmada Mel ve ark., aşırı giderek artan dozlarda 5 doz olmak üzere askerlerde denemiş ve *S. flexneri* tip 2a aşısının %84,3; *S.*

flexneri 2a ve 3 kombine aşısının %84,7 koruma sağladığını bulmuşlardır. Bu çalışmalar sonucunda *S. flexneri* tip 2a ve 3'ün karıştırılıp kombine aşı olarak bir arada uygulanabileceği ve korumanın tipe özgü olduğu gösterilmiştir (23). Erişkinlerde yapılan umut verici çalışmalardan sonra şigellozun sıkça görüldüğü 2-8 yaş arası çocuklar üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Aşı, *S. flexneri* 1 ve 2a ve *S. sonnei* için serotipe özgü bağışıklığı uyardırmada etkili bulunmuştur. Aşının yan etkileri doza bağımlı kusma ve sulu dışkılama şeklinde bildirilmiştir (24). SmD aşısı, attenuasyon mekanizmasının tam olarak bilinmemesi; mutasyonla elde edilen streptomisin bağımlı durumun geri dönüşümlü olması ve suşun streptomisin bağımsız hale gelme riski; fazla sayıda üretimde ve işlem kontrolünde yaşanacak zorluklar gibi nedenlerden dolayı kullanım için lisans alamamıştır (25).

Shigella patogenezinin ve patogeneзде rol oynayan genlerin aydınlatılması, aşı çalışmalarının bu genler üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur. *Shigella*'larda *ipaBCDA*, *invA* genleri epitel invazyonundan; *virG/icsA*, *Shigella*'nın intraselüler ve interselüler yayılımından; *sen*, *Shigella* enteretoksin 2 (ShET2) üretiminden ve *set* ise *Shigella* enteretoksin 1 (ShET1) üretiminden sorumlu genlerdir. Ayrıca bakterinin *in vivo* yaşaması için gerekli metabolitleri sentezleyen genler (oksoτροφik genler) de aşı çalışmalarında araştırmacıların hedefleri arasında yerini almıştır. Moleküler mühendislik alanındaki gelişmeler, genetik yoldan canlı oral *Shigella* aşılı elde etmeye olanak tanımaktadır.

T₃₂-Istrati suşu Romanya'da Istrati tarafından geliştirilmiş, *Shigella*'nın 140 MDa büyüklüğündeki invazyon proteinlerini kodlayan plazmidinde 32 MDa'luk delesyonlar meydana getirilerek attenuasyonu sağlanmış bir aşı suşudur. Delesyon sonucunda *ipaBCDA*, *invA* ve *virG/icsA* lokuslarına kayıp meydana getirilmiş ve suşun epitel hücrelerine invaze olması engellenmiştir. Plazmid delesyonunda *sen* ve *set* geni korunmuştur (6). Çin'de yapılan randomize plasebo kontrollü çalışmalarda Binguri ve ark.

S. flexneri 2a'ya karşı % 61-65 ve *S. sonnei*'ye karşı %57-72 koruma elde etmişlerdir. Ayrıca T₃₂-Istrati suşunun *S. flexneri* 1b ve *S. boydii* 1-6'ya bağlı şigellozda da koruma sağladığı gösterilmiştir (26). Bu aşılama dezavantajlar; çok sayıda ve yüksek inokulum miktarlarıyla (10¹⁰) aşılama yapılması ve bazı olgularda kusma ve ılımlı diyare gibi sınırlı yan etkiler görülmesidir (27).

Bir diğer deney suşu vahşi tip *S. flexneri* 2a'nın *virG* ve *inv* (aerobaktin kodlayan gen) genlerinde mutasyonlar yapılarak elde edilen SC602'dir. Bu suş Pasteur Enstitüsü'nde üretilmiş ve Amerika'da gönüllüler üzerinde denenmiştir. Bu çalışmalarda çeşitli miktarlardaki suşlar ile araştırmalar yapılarak bağışıklık sistemini uyardırmadaki üstünlük ve yan etkiler arasındaki denge bulunmaya çalışılmıştır. Aşılama 10⁶ CFU'den fazla miktardaki bakteri ile yapıldığında, bağışıklığın yüksek düzeyde uyarıldığı ancak ateş, diyare gibi ciddi yan etkiler görüldüğü bildirilmiştir. Verilen 10⁴ CFU miktarında ise klinik yan etkilerin az ve ılımlı olduğu ancak bağışık cevabı daha az uyardığı görülmüştür. Tek doz uygulanan 10⁴ CFU SC602 aşısının şigelloza karşı koruyuculuğu, aşı olmayan gruba göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (28).

Bir diğer aşı suşu *S. dysenteriae* P'de *virG/icsA*, *ent*, *fep* (demir şelasyonunda görevli gen) ve *stxA* genlerinin delesyonu ile oluşturulan SC599'dur. Bu suş Pasteur Enstitüsü'nde ve St. George's Vaccine Institute (Londra, İngiltere)'de test edilmiştir. Aşı iyi tolere edilebilmiş ve tek doz oral aşılama sonucunda yüksek IgA ve serum antikor cevabı elde edilmiştir (29).

Amerika Maryland Üniversitesi Aşı Geliştirme Merkezi'nde (Center for Vaccine Development; CVD) vahşi tip *S. flexneri* 2a 2457T suşundan bir seri attenue suşlar üretilmiştir. Bunun için bakterinin virulans faktörleri sentezinde görevli genlerinde ve oksotrofik genlerinde mutasyonlar yapılmıştır. Bu iki tip attenuasyon CVD 1203 - 1208 adı verilen aşılarda kombine olarak kullanılmıştır. Bu aşılıların ortak noktası bakterinin

invazyon özelliği sayesinde barsak ilişkili lenfoid doku (gut associated lymphoid tissue; GALT) hedefinin korunması ancak dokularda yayılma ve çoğalma yeteneğinin bozularak virülansının azaltılması olmuştur (27).

CVD 1203, vahşi tip *S. flexneri* 2a 2457T suşunda *aroA* (aromatik aminoasit biyosentezinde görevli gen) ve *virG* genlerinde delesyonlar yapılarak geliştirilmiş bir aşı suşudur. Bu suşun özelliği epiteli invaze edebilmesi minimal intraselüler proliferasyon ve hücreden hücreye yayılım göstermesidir. Amerika'da yapılan çalışmalarda, CVD 1203 suşu, 10^6 CFU dozunda verildiğinde gönüllülerin %60'ında antikor cevabı gelişmiştir. Aşı iyi tolere edilebilmiş ancak daha yüksek dozlarda verildiğinde güçlü bağışık yanıt oluşturmamasına rağmen deneklerde kabul edilemez yan etkiler görülmüştür. Yüksek dozda oluşan bağışık yanıt ile ilişkili olarak, serum ve gaitada TNF α konsantrasyonunda anlamlı artışlar görülmüştür. Çalışma sonucunda, attenuasyon için alternatif mutasyonlar geliştirilmesinin gerekli olduğu gösterilmiştir (30).

Bir başka aşı suşu olan CVD 1207, *S. flexneri* 2a suşunda *guaBA* (guanin nükleotidi sentezinde görevli gen), *virG*, *set* ve *sen* genlerinde delesyonlarla oluşturulmuş bir suştur. Gönüllülerde 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 ve 10^{10} CFU dozlarında CVD 1207 aşı suşu verilerek aşılama yapılmış, 10^8 CFU'ya kadar olan tek doz oral aşılamanın iyi tolere edilebilir olduğu görülmüştür. 10^{10} CFU dozunda sulu diyare ve bulantı görülmüştür. Artan dozlarda verildiğinde daha güçlü antikor yanıtı elde edilmiştir. Sadece birkaç vakada ılımlı diyare görülmüştür. Bu suş güçlü attenuasyona sahip olması nedeniyle iyi tolere edilebilmiş ancak bağışıklık oluşturmaları için yüksek dozda uygulanması gerektiği görülmüştür (31).

S. flexneri 2a 2457T suşunda *guaBA* delesyonu yapılarak CVD 1204; hem *guaBA* hem *sen* ve *set* genlerinde delesyon yapılarak CVD 1208 aşı suşu geliştirilmiştir. Gönüllülere her iki suştan 10^7 , 10^8 ve 10^9 CFU içeren tek doz aşılama yapılmış, CVD 1204 ile %35, CVD 1208 ile %4 oranında

yan etki görülmüştür. Yüksek dozlarda verildiğinde daha güçlü bağışıklık sağlanmıştır. Araştırmacılar *Shigella* enteretoksin (ShET) kodlayan *set* ve *sen* genlerinin *guaBA* ile birlikte delesyonunun belirgin attenuasyon sağladığını, aşının iyi tolere edilebilir ve aynı zamanda bağışıklık sistemini uyarmada etkili olduğunu göstermişlerdir (32).

Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR)'de vahşi tip *S. sonnei* suşunda *virG* delesyonu ile WRSS1 suşu geliştirilmiştir. Amerika'da gönüllüler üzerinde 10^3 , 10^4 , 10^5 ve 10^6 CFU tek doz verilerek yapılan aşılama çalışmasında, O antijenine özgü güçlü antikor cevap elde edilebilmiş; ateş ve ılımlı diyare görülmesine rağmen aşı iyi tolere edilebilir bulunmuştur. Ek olarak WRSS1 aşısı ile, IgA antikorları salgılayan hücre sayısında ve serum IgG titresinde artış izlenmiştir. Periferik kan mononükleer hücrelerinde ılımlı IFN γ cevabı izlenmiştir (33). WRAIR tarafından geliştirilen bir diğer aşı da WRSD1'dir. Bu suş Guetamala'da 1968-1969 yıllarında meydana gelen dizanteri salgınından izole edilen *S. dysenteriae* 1 1617 suşunun *virG/icsA*, *fmr* (fumarat ve nitrat redüktaz regülör gen) ve *stxAB* (Shiga toxin) genlerinde delesyon yapılarak elde edilmiştir. Deney hayvanları üzerinde yapılan araştırmalarda bu aşı ile belirgin koruyucu bağışık yanıt elde edilmiştir. Ayrıca WRSS1, SC602 ve WRSD1 aşı suşları eşit dozlarda kombine edilip uygulandığında her bir homolog virulan suşa karşı koruma sağlanmıştır. Ancak kombine formda uygulanan WRSD1 suşunun koruyuculuğu, tek başına uygulanmasına kıyasla düşük bulunmuş; diğerleriyle aynı bağışık cevabı sağlaması için daha yüksek dozda uygulanması gerektiği belirlenmiştir (34).

Bir diğer canlı attenué *S. flexneri* 2a aşı suşu, *virG/icsA*, *sen* ve *set* genlerinde delesyon bulunan WRSF2G11 aşı suşudur. Bu suş kobaylar üzerinde denenmiş ve SC602 suşu ile benzer koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu sayede etkili bağışıklama, daha az yan etki ile sağlanabilmiştir (35).

Hibrit Canlı Vektör *Shigella* Aşıları

Shigella aşılarına alternatif stratejiler geliştiren araştırmacılar, yüksek düzeyde attenué *Salmonella enterica* serovar Typhi suşlarının ya da normal florada bulunan *E. coli* suşunun *Shigella* O antijeni ve diğer *ipa* antijenlerini ekspres etmelerini sağlayarak aşı çalışmaları yapmışlardır. 1981'de WRAIR'de GalE *Salmonella typhi* Ty2la aşı suşuna *S. sonnei* plazmid transfer edilmiş ve aşı suşunun *S. sonnei*'ye ait hücre yüzey antijeni ve somatik antijenler ekspres etmesi sağlanmıştır. Bu şekilde hem *S. typhi* hem de *S. sonnei*'ye karşı koruyuculuk amaçlanarak 5076-1c adı verilen bivalan canlı aşı üretilmiştir. Aşı farelerde denenmiş ve *S. typhi* ve *S. sonnei*'ye karşı etkin koruyuculuk sağlanabilmiştir (36).

Türe ve tipe özgü *S. flexneri* 2a somatik antijenleri ekspres eden genler, *E. coli* suşuna verilmiş ve PGAI 42-1-15 aşı suşu elde edilmiştir. *S. flexneri* 2a O antijeni ekspres eden hibrit *E. coli*, ABD'da erişkin gönüllülere verilmiş ancak kontrol ve aşı grubunda şigelloz gelişme oranları benzer bulunmuştur. Teorik olarak mümkün görülen bu aşının başarısızlığından *E. coli*'nin invazyon yeteneğinin olmaması sorumlu tutulmuştur (37).

S. flexneri 5 invaziv plazmid ve *S. flexneri* 2a tip ve grup spesifik O antijenlerini ekspres eden gen, *E. coli* K12 suşuna verilmiş ve epiteli invaze eden EcSf2a suşu geliştirilmiştir. Bu suş ile 10^9 CFU dozunda aşılama yapılmış ancak deneklerin %31'inde ateş, diyare veya dizanteri görülmüştür. Daha iyi tolere edilebilen düşük dozlarla yapılan çalışmalarda ise aşının koruyuculuğu yetersiz bulunmuştur (38).

EcSf2a aşı suşunda *aroD* delesyonu yapılarak yan etkileri azaltmak hedeflenmiş ve bu yeni suşa EcSf2a-2 adı verilmiştir (39). Bu suş ile 2×10^9 CFU miktarında 3 doz aşılama yapılmış, aşının yüksek yan etkilere neden olduğu, koruyuculuğunun ise %36 olduğu bulunmuştur. Bu suş, aşılama şeması ve verilen doz değiştirilerek tekrar denenmiş ancak aşının koruyuculuğu düşük (%27) bulunmuştur

(40). Sonuç olarak *E. coli* canlı vektör aşısı koruyucu aşı olmak için uygun bulunmamıştır.

Geniş Spektrumlu Aşılar

Shigella aşısı çalışmalarında O antijeni hedeflenerek bağışıklık yanıt oluşturulması nedeniyle serotipe özgü koruyuculuk sağlanmıştır. Oysa, dünyada görülme sıklıkları değişmekle beraber çok sayıda *Shigella* serotipi şigelloza neden olabilmekte ve ideal aşı ile sıklıkla görülen serotiplerin hepsine karşı koruyuculuk elde edilebilmelidir. Yapılan araştırmalarda *S. flexneri* serotipleri arasında çapraz reaksiyonlar görülmüştür. Noriega ve ark. tarafından *S. flexneri* 2a ve 3a kullanarak, çapraz reaksiyon sayesinde diğer *S. flexneri* serotipine karşı koruyuculuk elde etmek amaçlanmış ve *S. flexneri* serotip 1b, 2b, 5b ve Y'ye karşı belirgin koruma sağlanmıştır. Aşı *S. flexneri* serotip 1a, 4b ve 6'ya karşı korumada başarısız bulunmuştur. Coğrafi bölgelere göre *S. flexneri* 2a, 3a ve 6'ya karşı geliştirilen aşılardan *S. dysenteriae* 1 ve *S. sonnei* ile beraber uygulanmasıyla pentavalan aşı elde edilebileceği ve pentavalan aşısının oral uygulanması ile dünyada şigelloza

karşı geniş ölçekli koruma sağlanacağı varsayılmaktadır (41).

Shigella İnvazin Kompleks (Invaplex) Aşısı

Shigella Ipa proteinlerinin konak hücre reseptörleri ile etkileşimi ve endositozu indüklemesinden yola çıkılarak Walter Reed Army Institute of Research (Washington DC, USA)'de Invaplex aşısı geliştirilmiştir. Invaplex, vahşi tip *Shigella*'dan izole edilmiş nativ biyolojik olarak aktif LPS ve IpaB, IpaC gibi protein kompleksleri içerir. İntranazal uygulanır. Canlı *Shigella* gibi memeli hücrelerine bağlanabilme özelliğini korumaktadır. LPS ve Ipa proteinleri, sadece LPS içeren aşılar göre bağışıklık yanıtını daha iyi uyarılmaktadır. Native *Shigella* Invaplex (Invaplex_{NAT}) bütün *Shigella* serotiplerinden üretilebilen, çözünebilir, büyük moleküllü kompleks antijenlerdir. Araştırmalar bu aşının multivalan uygulama için de uygun olduğunu göstermiştir (42). Yapılan çalışmalarda Invaplex ile intranazal aşılamadan sonra serumda ve barsaklarda *ipa* proteinlerine ve LPS'e karşı antikorlar görülmüştür. Invaplex küçük bir grup gönüllüde artan doz-

larda verilerek denenmiştir. Aşı bağışık yanıt oluşturmada etkin ve güvenilir bulunmuştur. Native Invaplex aşısından yola çıkılarak, saflaştırılmış LPS, rekombinant IpaB ve IpaC içeren yapay Invaplex (Invaplex_{AR}) üretilmiştir. Bu aşının etkinlik dozu Invaplex_{NAT} e göre 10 kat düşük bulunmuştur. Şu sıralarda bu aşının formülasyon ve geliştirme çalışmaları devam etmektedir (9).

Şigeloz özellikle gelişmekte olan ülkelerde, çocuklarda yaygın görülmesi, ölümlerine sonuçlanabilen infeksiyonlardan olması ve günümüzde *Shigella* suşlarında giderek artan oranda karşılaşılan antibiyotik direnci, hastalıktan korunmanın önemini artırmaktadır. Dünyanın çeşitli bölgelerinde yapılan aşı geliştirme çalışmalarında ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. Bu amaca yönelik fonlardan aktarılan kaynaklarla, araştırmalara ciddi maddi destek sağlanmaktadır. Bugüne kadar geliştirilen tüm aşılar üzerinde halen yoğun çalışmalar sürmektedir. Yakın bir gelecekte bu çalışmaların *Shigella* infeksiyonlarından korunmada mantıklı bir aşı gelişimine olanak vereceği ve aşılardan üretimde yerlerini alacağı kuşkusuzdur.

KAYNAKLAR

1. Dupont HL. *Shigella* Species (Bacillary Dysentery). In: Mandell GL, Bennett JE, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier.; 2010. p. 2905-2919.
2. Aysev AD. *Shigella* Türleri. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editors. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Etkenlere Göre İnfeksiyonlar. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.; 2008. p. 2164-2168.
3. Butler T, Scheld WM. Shigellosis. In: Goldman L, Ausiello D, editors. Cecil Textbook of Medicine. Philadelphia: Saunders.; 2004. p. 1852-1854.
4. Erdem B. Enterobacteriaceae. In: Mutlu G, İzmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö editors. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi.; 1999. p. 471-515.
5. Black RE, Lanata CF. Diarrheal Diseases. In: Nelson KE, Williams CFM, editors. Infectious Disease Epidemiology: Theory and Practice. Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers.; 2007. p. 759-786.
6. Levine MM, Kotloff KL, Barry EM, et al. Clinical Trials of *Shigella* Vaccines: Two Steps forward and One Step Back On a Long, Hard Road. Nat Rev Microbiol 2007;5(7): 540-553.
7. Ferreccio C, Prado V, Ojeda A, et al. Epidemiologic patterns of acute diarrhea and endemic *Shigella* infections in a poor periurban setting in Santiago, Chile. Am. J. Epidemiol 1991;134: 614-627.
8. Tacket CO, Binion SB, Bostwick E, et al. Efficacy of bovine milk immunoglobulin concentrate in preventing illness after *Shigella flexneri* challenge. Am. J. Trop. Med. Hyg 1992;47: 276-283.
9. Kaminski RW, Oaks EV. Inactivated and subunit vaccines to prevent shigellosis. Expert Rev Vaccines 2009;8(12): 1693-1704.
10. Cohen D, Ashkenazi S, Green M, et al. Safety and immunogenicity of investigational *Shigella* conjugate vaccines in Israeli volunteers. Infect Immun 1996;64: 4074-4077.
11. Cohen D, Ashkenazi S, Green MS, et al. Double-blind vaccine-controlled randomised efficacy trial of an investigational *Shigella sonnei* conjugate vaccine in young adults. Lancet 1997;349(9046): 155-159.
12. Ashkenazi S, Passwell JH, Harlev E, et al. Safety and immunogenicity of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* 2a O-specific polysaccharide conjugates in children. J Infect Dis 1999;179(6): 1565-1568.

13. Passwell JH, Ashkenazi S, Harlev E, et al. Safety and immunogenicity of *Shigella sonnei*-CRM9 and *Shigella flexneri* type 2a-rEPAsucc conjugate vaccines in 1–4-year-old children. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22(8): 701–706.
14. Chowers, Y., Kirschner, J., Keller, et al. O-Specific polysaccharide conjugate vaccine-induced IgG antibodies prevent invasion of *Shigella* into Caco-2 cells and may be curative. *Proc. Natl. Acad. Sci* 2007;104: 2396-2401.
15. http://clinicaltrials.gov/archive/NCT00368316/2010_01_28 tarih: 2010_01_28)
16. Orr N, Robin G, Cohen D, et al. Immunogenicity and efficacy of oral or intranasal *Shigella flexneri* 2a and *Shigella sonnei* proteosome-lipoplysaccharide vaccines in animal models. *Infect Immun* 1993;61(6): 2390-2395.
17. Orr N, Arnon R, Rubin G, et al. Enhancement of anti-*Shigella* lipopolysaccharide (LPS) response by addition of the cholera toxin B subunit to oral and intranasal proteosome-*Shigella flexneri* 2a LPS vaccines. *Infect Immun* 1994;62(11): 5198-5200.
18. Fries LF, Montemarano AD, Mallett CP, et al. Safety and immunogenicity of a proteosome-*Shigella flexneri* 2a lipopolysaccharide vaccine administered intranasally to healthy adults. *Infect Immun* 2001;69(7): 4545-4553.
19. Levenson VI, Chernokhvosova EV, Lyubinskaya MM, et al. Parenteral immunization with *Shigella* ribosomal vaccine elicits local IgA response and primes for mucosal memory. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988;87(1): 25-31.
20. Shima DH, Changa SY, Park SM, et al. Immunogenicity and protective efficacy offered by a ribosomal-based vaccine from *Shigella flexneri* 2a. *Vaccine* 2007;25: 4828–4836.
21. Phalipon A, Costachel C, Grandjean C, et al. Characterization of functional oligosaccharide mimics of the *Shigella flexneri* serotype 2a O-antigen: implications for the development of a chemically defined glycoconjugate vaccine. *J Immunol* 2006;176(3): 1686-1694.
22. Mel DM, Papo RG., Terzin AL, et al. Studies on vaccination against bacillary dysentery. 2. Safety tests and reactogenicity studies on a live dysentery vaccine intended for use in field trials. *Bull. World Health Organ* 1965;32: 637–645.
23. Mel DM, Arsic BL, Nikolic BD, et al. Studies on vaccination against bacillary dysentery. 4. Oral immunization with live monotypic and combined vaccines. *Bull. World Health Organ* 1968;39: 375–380.
24. Mel DM, Gangarosa EJ, Radovanovic ML, et al. Studies on vaccination against bacillary dysentery. 6. Protection of children by oral immunization with streptomycin-dependent *Shigella* strains. *Bull. World Health Organ* 1971;45: 457–464.
25. Kweon MN. Shigellosis: The Current Status of Vaccine Development. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21: 313–318.
26. Bingrui W. Study on the effect of oral immunization of T32-Istrati strain against bacillary dysentery in field trials. *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol* 1984;43: 285–289.
27. Phalipon A, Sansonetti PJ. Shigellosis: innate mechanisms of inflammatory destruction of the intestinal epithelium, adaptive immune response, and vaccine development. *Crit Rev Immunol* 2003;23(5-6): 371-401.
28. Coster TS, Hoge CW, VanDeVerg LL, et al. Vaccination against shigellosis with attenuated *Shigella flexneri* 2a strain SC602. *Infect Immun* 1999;67(7): 3437-3443.
29. Launay O, Sadorge C, Jolly N, et al. Safety and immunogenicity of SC599, an oral live attenuated *Shigella dysenteriae* type-1 vaccine in healthy volunteers: results of a Phase 2, randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Vaccine* 2009;27(8): 1184-1191.
30. Kotloff KL, Noriega F, Losonsky GA, et al. Safety, immunogenicity, and transmissibility in humans of CVD 1203, a live oral *Shigella flexneri* 2a vaccine candidate attenuated by deletions in *aroA* and *virG*. *Infect Immun* 1996;64(11): 4542-4548.
31. Kotloff KL, Noriega FR, Samandari T, et al. *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1207, with specific deletions in *virG*, *sen*, *set*, and *guaBA*, is highly attenuated in humans. *Infect Immun* 2000;68(3): 1034-1039.
32. Kotloff KL, Pasetti MF, Barry EM, et al. Deletion in the *Shigella* enterotoxin genes further attenuates *Shigella flexneri* 2a bearing guanine auxotrophy in a phase 1 trial of CVD 1204 and CVD 1208. *J Infect Dis* 2004;190(10): 1745-1754.
33. Kotloff KL, Taylor DN, Sztein MB, et al. Phase I evaluation of delta *virG* *Shigella sonnei* live, attenuated, oral vaccine strain WRSS1 in healthy adults. *Infect Immun* 2002;70(4): 2016-2021.
34. Venkatesan MM, Hartman AB, Newland JW, et al. Construction, characterization, and animal testing of WRSd1, a *Shigella dysenteriae* 1 vaccine. *Infect Immun* 2002;70(6): 2950-2958.
35. Ranallo RT, Thakkar S, Chen Q, et al. Immunogenicity and characterization of WRSF2G11: A second generation live attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine strain. *Vaccine* 2007;25: 2269–2278.
36. Formal SB, Baron LS, Kopecko DJ, et al. Construction of a potential bivalent vaccine strain: introduction of *Shigella sonnei* form I antigen genes into the galE *Salmonella typhi* Ty21a typhoid vaccine strain. *Infect Immun* 1981;34(3): 746-750.
37. Levine MM, Woodward WE, Formal SB, et al. Studies with a new generation of oral attenuated *Shigella* vaccine: *Escherichia coli* bearing surface antigens of *Shigella flexneri*. *J Infect Dis* 1977;136(4): 577-582.
38. Kotloff KL, Herrington DA, Hale TL, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy in monkeys and humans of invasive *Escherichia coli* K-12 hybrid vaccine candidates expressing *Shigella flexneri* 2a somatic antigen. *Infect Immun* 1992;60(6): 2218-2224.
39. Newland JW, Hale TL, Formal, SB. Genotypic and phenotypic characterization of an *aroD* deletionattenuated *Escherichia coli* K12–*Shigella flexneri* hybrid vaccine expressing *S. flexneri* 2a somatic antigen. *Vaccine* 1992;10: 766–776.
40. Kotloff KL, Losonsky GA, Nataro JP, et al. Evaluation of the safety, immunogenicity, and efficacy in healthy adults of four doses of live oral hybrid *Escherichia coli*-*Shigella flexneri* 2a vaccine strain EcSf2a-2. *Vaccine* 1995;13(5): 495-502.
41. Noriega FR, Liao FM, Maneval DR, et al. Strategy for cross-protection among *Shigella flexneri* serotypes. *Infect Immun* 1999;67(2): 782-788.
42. Oaks EV, Turbyfill KR. Development and evaluation of a *S. flexneri* 2a and *S. sonnei* bivalent invasive complex (Invaplex) vaccine. *Vaccine* 2006;24(13): 2290-2301