

## MAREK HASTALIĞINA KARŞI CELL- ASSOCIATED AŞI ÜRETİMİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

The study on cell-associated vaccine production against to Marek's  
disease.

Ragıp BAYRAKTAR\*      Csab DREN\*\*      Salih ÇIÇEK\*\*\*  
Canan TAYHANI\*\*\*      Fethiye ÇÖVEN\*\*\*\*

### ÖZET

Bu araştırmada CEF-Chicken Embryo Fibroblast doku kültürü hücrelerinde cell-associated SB-1 ve HTV, FC-126 Marek aşı suşları ile aşı üretilip, kanatlıların bu hastalığına karşı koruyucu olarak kullanılması amaçlanmıştır.

CEF hücreleri standart metodlara göre 10-11 günlük SPF civciv embriyolarından hazırlandı. Hücreler %4 yeni doğmuş buzağı serumu, %10 TPB, antibiyotik ve antimikotik ilaveli MEM mediumda üretildi.

Monolayer kültürler 24-48 saat rolling şişelerde inkube edildi, daha sonra bu 1<sup>o</sup>CEF hücrelerin ikinci pasajı yapıldı, (2<sup>o</sup>CEF). Bu pasajın sonunda meydana gelen monolayer kültürlerde SB-1 veya FC-126 Marek aşı suşlarından biri tarafından enfekte edilip hücreler tekrar 1<sup>o</sup>CEF'te olduğu gibi tamamen sitopatik efekt görülene kadar rolling inkubatorde (yaklaşık 48 saat) inkübe edildi. Virus tarafından CPE-Cytopathic Effect tamamen meydana getirildikten sonra doku kültürü mediumu atılıp, hücreler usulüne uygun olarak toplandı, toplanan hücreler MEM ile %15 oranında hazırlanmış DMSO-Dimethyl sulphoxide içine alınıp sayıldı, her ml'de 2x10<sup>7</sup> hücre olacak şekilde aynı solüsyonla süspansiyon yapıp ampullere konan aşılarda -196<sup>o</sup>C'de sıvı nitrojen içinde saklanmakta ve sevk edilmektedir. Her üretilen rekoltun sonunda virusun titresi tayin edilir ve sterilite testleride yapılır.

\* Etik Vet. Kont. ve Arşt. Enstitü - ANKARA

\*\* Central Veterinary Research Institute - HUNGARY

\*\*\* İl Kontrol Lab. - BURSA

\*\*\*\* Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü - MANİSA

## SUMMARY

The study on cell associated vaccine production against to Marek's disease.

In this research; Vaccine production against to MAREK disease had been aimed by the serotype-2 SB-1 and serotype-3 THV, FC-126 Marek cell-associated vaccine strains. Primary chicken embryo fibroblast tissue culture cells-CEF is prepared from SPF eggs fumigated upon receipt at the laboratory and incubated to 10-11 days by the standart method. The CEF is grown in Eagle's minimum essential medium-MEM which is supplemented with 4% sterile new born calf sera, 10% TPB, antibiotics and antimycotic. They are incubated at 37°C in rolling cultura system until the complete monolayer is developed. The complete monolayer is infected with serotype-2 SB-1 or serotype-3 THV, FC-126 Marek vaccine strains. CEF are incubated about 48 hours until diffuse cytopathic effect-CPE develop. After second passage is done in the same position. When the 15% DMSO-Dimethyl sulphoxide is added as a preservative and they are distributed to ampules. Cells are frozen and stored in -196°C liquid nitrogen. After a sample of the vaccnie is tested for sterility and virus content.

## GİRİŞ

Enstitümüz Türkiye'nin tüm tavuk aşılarının ihtiyacına cevap vermek üzere kurulmuş ve bu konuda FAO ile ortak proje yürütmektedir. Ülkemizde ve dünyada özellikle son senelerde tavukçuluğun bir numaralı sorunu olarak Marek hastalığına karşı aşı üretme gereği hasıl olmuştur. Özellikle son yıllarda görülen serotipler yüzünden hala kullanılmakta olan Hindi Herpes Virus-THV liyofilize tip aşıların bu hastalığa karşı gerekli immüniteyi sağlayamadığı ve yetersiz kaldığı, bu yüzden diğer ülkelerde olduğu gibi diğer serotip suşlar ile beraber kombine aşılamlar gerekmektedir.

Marek hastalığı bir Herpes Virusün meydana getirdiği, tavukların muhtelif organlarında lenfoid tümörlerin varlığı ile karakterize lenfoproliteratif bir hastalıktır. Bu hastalığın virüsü çok dayanıklı olup, hastalık çıkan kümeslerde çok uzun süre varlığını muhafaza etmektedir. Ayrıca Herpes virüsler gelişmelerini hücre

çekirdeği içinde tamamladıklarından enfekte olan hayvanlarda genotipik karakterde göstermektedirler. ABD'de yapılan son Marek hastalığı seminerinde bilinen 3 serotipten başka yeni bir suşun daha olduğu tezi ileri atılmış ve identifiye çalışmalarının sürdüğü söylenmiştir. Bu oldukça dayanıklı ve birkaç ülkede görülen bu değişik serotiplere karşı Hindi Herpes virüsünden hazırlanan liyofilize aşılar etkisiz kalmıştır. Bu yüzden çeşitli dünya ülkelerinde olduğu gibi bizde de yeterli immüniteyi sağlamak için cell-associated frozen aşilar hazırlama ve de bu aşilarla beraber kombine aşilar kullanma gereği hasil olmuştur.

Dolayısıyla yaptığımız bu araştırmada İngiltere Houghton ve Weybridge ile Macaristan Pylaxia Enstitüleri aşı üretim bölümleri ve literatürlerinden faydalanarak yaptığımız pilot aşı üretimi sonunda bu hastalığa karşı Enstitümüzde Serotip-2 aşı suşu SB-1 ve Serotip-3 aşı suşu FC-126 ile Enstitümüzde hazırlanmış olan **cell-associated frozen MAREK** aşısının aşı üretim protokol ve prospektüsleri hazırlanmış ve daha sonra Bakanlığımız Sağlık Müşavere kuruluna sunulmuş, ilgili kurul tarafından kesinleştirilip tasdik edilmiş ve Enstitümüzde seri şekilde aşı üretimine geçilmiş, aşılarımız şu anda istekler doğrultusunda tüm yurda sevk edilmekte olup, üretimimiz tüm ülkenin ihtiyacına cevap verecek durumdadır.

## MATERYAL

**A. ARAÇ VE GEREÇ:** Embriyolu SPF yumurta, borosilikat camdan mamul doku kültürü cam malzemeleri (Rolling şişeler, Roux şişeleri, Flasklar, Tripsinizasyon şişeleri, erlanmayer ve balonlar, 60 mm. ve 100 mm. petriler, silikon kaplı multitest mantarları, aliminyum kapaklar vs.), Serotip-2 SB-1 ve Serotip-3 FC-126 aşı tohum virüsleri, rolling incubator, CO<sub>2</sub>'li incubator, Milipore ve Sartorius membran filtre sistemleri, soğutmalı santrifüj, invert mikroskop, homogenizatör, manyetik karıştırıcı, otoklav, kuru sterilizatör, kurutma dolabı, laminar flow cabinet, Ben-Marie cihazı, Elgastat deionize su cihazı, organo ion exchanger, otomatik aşı taksim makinası, Bürker lamı, hücre sayacı, Pens, makas, bisturi, forceps, otomatik ve normal enjektör, otomatik pipet ve uçları, digital hassas terazi, soğutmalı santrifüj, buz makinası, soğuk çalışma kabini, kompresör, vakum pompası, ampul kapatmak için bunzen beki, diğer dispossible doku kültürü malzemeleri.



**B. Kimyasal Maddeler:** MEM, Glutamine, NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, TPB, Tripsin, Triplex-3, NaHCO<sub>3</sub>, Fetal calf sera, Bovine calf sera, Penicilline, Streptomycine, Fungizone, Kanamycine, Gentamycine, Trypan blue, Hepes, Ethyl alcohol, iode, Potassium iodure, Neodisher nötr deterjan, DMSO, Deionize su, Tryptose phosphate broth, Sıvı nitrojen, Blood agar, Mc. Conkey agar, SMA agar, Thyoglucollate Medium, SS agar, BSA agar, Noble agar.

## METOD

(Detaylar için XII.nci bölüme bakınız.)

Metod olarak bu araştırmada chicken embriyo fibrblast-CEF doku kültürü hücrelerinde attenüe, sıvı nitrojende saklanan apathogenic, cell-associated serotip-2 SB-1 ve serotip-3 FC-126 Marek aşısı virüsleri üretilip, kanatlıların bu hastalığına karşı kullanılmaktadır.

CEF hücreleri standart doku kültürü metodlarına göre 10-11 günlük SPF civciv embriyolarından hazırlanmıştır. Hücreler %4 yeni doğmuş buzağı serumu, %10 TPB, Kanamycine ve Fungizone katılmış MEM' mediumda üretilmiştir.

Monolayer kültürler 24-28 saat rolling şişelerde rolling incubatörde inkube edilmiş ve SB-1 ya da FC-126 Marek aşısı suşları ile enfekte edilen hücreler 3-5 gün 37°C'de tekrar inkubasyona bırakılmıştır. Virüs tarafından CPE meydana getirildikten sonra doku kültürü medium'u boşaltılıp, hücreler MEM ile %15 oranında hazırlanmış Dimethyl-sulphoxide içine alınıp sayılır, her ml.'de 2x10<sup>7</sup> olacak şekilde aynı solüsyonla süspansiyon yapılır. Virüsün titresini tayin edilir, sterilite testlerinde uygun metodlara göre yapıldıktan sonra ampullere konan aşılarda -196°C'de sıvı nitrojende saklanmakta ve sevk edilmektedir.

Materyal ve metod hakkındaki detaylı bilgi XII. bölümde verilmiş olduğundan burada detaylı olarak tekrarlanmamıştır.

## BULGULAR

Araştırmadan elde edilen bulgular, kullanılan materyalin sağlanma şekli, miktarı, kalitesi, kullanılan metodları ve değişiklikleri aşağıda belirtilen AŞI ÜRETİM PROTOKOLÜ VE KULLANMA PROSPEKTÜSÜ bölümünde detaylı olarak açıklanmıştır.



## **MAREK-MD HASTALIĞINA KARŞI HAZIRLANAN HÜCREYE BAĞIMLI, DONDURULMUŞ (CELL-ASSOCIATED, FROZEN) AŞI ÜRETİM PROTOKOLÜ VE KULLANMA PROSPEKTÜSÜ**

### **AŞI ŞUŞU**

Aşı suşu orijinal karakterlere haiz, attenüe edilmiş, apathogenic, cell-associated serotip-2 aşı suşu SB-1 ve serotip-3 Hindi Herpes aşı suşu FC-126'dır. Bu suşlar nonneoplastic ve pathogen olmayan suşlardır. 1 günlük antikorsuz civcivlerde karın içii inokulasyondan sonra lezyonlara sebep olmazlar. Doku kültüründe çoğaltılan bu suşlar büyük ölçüde cell-associated (hücreye bağımlı)dir, ancak F-126 suşu cell-free'dir.

### **AŞI TOHUM VİRÜSÜNÜN ÜRETİLMESİ**

10-12 günlük SPF embriyolarından doku kültürü sistemiyle primer civciv embriyo fibroblast-1° CEF hücreleri hazırlanır.

Tohum virüsü doku kültüründe en çok 10 pasaj yapılır. Aşı tohum virüsü dönen (Rolling) doku kültürü sistemiyle primer civciv embriyo fibroblast hücrelerinde (1°CEF) hazırlanır.

Yumurtaladan alınan embriyolar steril koşullarda steril petrilere içine alınır. Kafası kesilip, iç organları çıkarılan embriyo grupları bir araya toplanır, makas ile küçük parçalara ayrılır. Parçalanmış doku hücreleri 37°C'de 3 defa PBS içinde yıkanıp organ parçaları ve kan hücrelerinden ayrılır, 37°C'de %0.05 Trypsinli PBS ile manyetik karıştırıcı üzerinde Tripsinizasyon şisesinde Tripsinleme işlemine tabi tutularak dokular hücrelerine parçalanır, elde edilen hücreler 100 cc. steril buzağı serumu içine toplanır. Toplanan hücreler steril çift kat tülbenkten süzülerek büyük hücre grupları uzaklaştırılır ve süzüntü düşük hızda (1500 rpm) santrifüje edilerek hücreler çöktürülür. Çöken hücreler %8-16 steril yeni doğmuş buzağı serumu, %10 TPB, 100 IU/ml Penicilline, 100 mg/ml Streptomycine ve 2 mg/ml Fungizone bulunan MEM-Minimal Essential Medium içine alınır. Hücreler sayıldıktan sonra her cm<sup>2</sup>'de 3x10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde içlerinde 200 ml MEM-G bulunan rolling doku kültürü şişelerine inokule edilir.

Rolling doku kültürü şişeleri 37°C'de Rolling inkubütörde şişelerin yüzeyinde tam bir monolayer kültür oluşana kadar yaklaşık 24-28 saat inkübe edilir, sonra taze vasat sterilite kurallarına uyularak değiştirilir.

### **AŞI TOHUM VİRÜSÜNÜN BİRİNCİ PASAJI**

Rolling kültür şişelerinde üretilen komple CEF monolayer katmanı, sıvı nitrojende saklanan ve 37°C'de u banyosunda eritilen enfekte olmuş canlı hücredeki virusla, her cm<sup>2</sup> de 100-1000 Plaque Forming Unit-PFU olacak şekilde enfekte edilir. Enfekte edilmiş kültürler, hücrelerin çoğu enfekte olana kadar yani yaygın olarak Cytopathic Effect-CPE görülene kadar 37°C'de inkube edilir.

Rolling şişelerdeki enfekte hücreler 2 kere 37°C'deki PBS ile yıkandıktan sonra enfekte hücreler % 0.02 EDTA disodyum tuzu ve % 0.05 Trypsin ilave edilmiş 37°C'deki PBS solüsyonu ile şişelerin yüzeyinden toplanır. Hücre süspansiyonuna % 5 steril buzağı serumu ilavesinden sonra, hücreler düşük hızda (800-1000 g) santrifüje edilerek çöktürülür ve +4°C'deki MEM içine alınır, kullanılabileceği kadar +4°C'de bekletilir, fakat +4°C'deki buzdolabında 24 saatten fazla bekletilemez. Diğer bir yolda süspansiyonu MEM ile %15 oranında hazırlanmış DMSO-Dimethylsulphoxide stok solüsyonu ile elde edilen hücre solüsyonu eşit oranda kademeli olarak karıştırılır.

### **AŞI TOHUM VİRUSUNUN İKİNCİ PASAJI**

Enfekte kültürler yaklaşık 48 saat veya aşı virusunun etkisiyle CPE görülene kadar 37°C'de inkube edilirler. Enfekte hücreler birinci pasajdaki gibi toplanır ve +4°C'deki MEM içine alınır.

Canlı hücre sayısı; 10<sup>-1</sup>/0.5 ml hücre dilüsyonu ile % 0.5'lik 0.5 ml Trypan Blue boyasıyla karıştırılıp sayılarak tayin edilir ve her ml'de 2x10<sup>7</sup> olacak şekilde süspansiyon hazırlanır. % 80'den fazla canlı hücre içeren hücre süspansiyonu dondurma için uygundur. +4°C'de bulunan hücre süspansiyonu % 15 DMSO ilave edilmiş MEM ile kademeli olarak karıştırılır. Devam eden karıştırma sırasında hücre süspansiyonu ampullere ve her ampule 500-1000 doza eşdeğer

olarak 1-2 ml dağıtılır. DMSO'nun oda sıcaklığında hücreler için toksik etkisi vardır. Hücre DMSO ile karıştırıldıktan sonra her işlem 4°C'de veya buz banyosunda yapılmalıdır. Aşı ampullere taksim edilip, dikkatli bir şekilde kapatıldıktan sonra sıvı nitrojene konmadan önce -60°C ile -70°C arasında deep-freeze'de dakikada 1-5°C düşürülerek dondurulur, sonra saklama konteynerleri ile birlikte sıvı nitrojen tanklarına konur ve saklanır. Aşıların sevkide sıvı nitrojen içinde (-196°C) yapılır.

### **AŞI SUŞUNUN KONTROLLERİ**

#### **1. Aerobik bakteri kontrolü:**

a. Zenginleştirilmiş kanlı Agar (% 10 steril kan+% 0.1 Glikoz+% 0.1 Yeast extract.)

- b. Serumlu Tryptose (veya trypticase) Agar,
- c. Serumlu Tryptose (veya trypticase) Buyyon,

#### **2. Anaerobik bakteri kontrolü:**

- a. Zenginleştirilmiş Kanlı Agar,
- b. Serumlu Tryptose Buyyon,
- c. Thyogluccolate medium.

#### **3. Salmonella spp. kontrolü:**

- a. Zenginleştirilmiş Kanlı Agar,
- b. Mc. Conkey Agar veya Brilliant Green Fenol Red Agar,

#### **4. PPLO kontrolü:**

- a. PPLO Buyyonu,
- b. PPLO Agar,

#### **5. Mantar kontrolü:**

- a. Zenginleştirilmiş Kanlı Agar,
- b. Sabouroid Dextrose Agar (SDA),
- c. Sabouroid Maltose Agar (SWA),

Yukarıda belirtilen bakteriyolojik yoklamalarda inkübasyon süresi 1 haftadır.

Kontamine tohum virusları aşı üretiminde kullanılmazlar.

#### **6. Diğer etkenlerin kontrolü:**

4 grup SPF yumurtaya aşağıdaki şekillerde inokulasyon yapılır:



a. 10 adet 9-11 günlük embriyolu SPF yumurtanın corio-allantoik boşluğuna aşı dozunun 10 katı konsantre edilmiş virustan 0.2 ml inokule edilir.

b. 10 adet 9-11 günlük embriyolu SPF yumurtanın corio-allantoik membranına aşı dozunun 10 katı konsantre edilmiş virustan 0.2 ml inokule edilir.

c. 10 adet 5-6 günlük embriyolu SPF yumurtanın sarı kesesine, aşı dozunun 10 katı konsantre edilmiş virustan 0.2 ml inokule edilir.

d. İmkanlar dahilinde 9-10 günlük embriyolu SPF yumurtanın corio-allantoik boşluğuna virus+antiserum karışımından 0.2 ml inokule edilir.

İnokulasyonları takiben ilk 24 saatte ölen yumurtalar atılır. İnokulasyondan 24 saat sonra her grupta 6 taneden fazla embriyonun canlı kalması gerekir. 1.nci ve 2.nci grup embriyolar 7 gün, 3.ncü grup embriyolar 12 gün süreyle kontrol edilirler. İnokulasyondan 24 saat sonra ölen ve deney periyodunda canlı kalan embriyolardaki anormallikler ve CAM'ları muayene edilir. Allantoic sıvıların hemaglutinasyon aktivitesi (Newcastle ve Influenza) yönünden kontrol edilmelidir.

İlk pasajın sonunda canlı ve ölü embriyo materyalleri ayrı ayrı toplanmalı ve 2.nci pasaj buna göre yapılmalıdır. 2.nci pasaj yumurtalar 7 ve 12 gün sırası ile kontrol edilmelidir. Testte herhangi bir ölüm veya anormallik varsa (LT veya AE gibi) virus aşı tohum virusu olarak kullanılmaz.

e. Doku kültürü kullanarak diğer etkenlerin kontrolü:

60 mm'lik petrielerde hazırlanmış 5 adet SPF primer CEF ve 5 adet SPF civciv böbrek hüce kültüründen üretim vasatları uzaklaştırıldıktan sonra aşılama dozunun 10 katı virus miktarı 0.2 ml inokule edilir. Nemli, CO<sub>2</sub>'li, 37°C'lik etüvde 1 saatlik adsorbsiyondan sonra inokule edilenler ve kontrol olarak bırakılan doku kültürlerine % 2 fetal veya yeni doğmuş buzağı serumu ilave edilmiş MEM konur. Kültürler 5 gün boyunca sitopatik efekt-CPE yönünden incelenir. Tüm kültürlerden toplanan sıvı ve hücreler ile taze hazırlanmış doku kültürleri kullanarak 5 gün arayla en az 2 seri pasaj daha yapılmalıdır. Her pasajın sonunda inokule edilmiş ve edilmemiş kültürler, İmmunofluoresans ve ELISA testlerinden biri veya her ikisiyle avian leucosis ve reticulo-endotheliosis virusları yönünden test edilmelidir. Şayet sitopatik efekt veya Avian Leucosis veya reticulo endotheliosis virus antijenleri görülürse virus aşı tohum virusu olarak kullanılmaz.

Testte her bir pasaj düzeyinde kültürlerin en az % 80'i temiz kalmalıdır.

**Önemli NOT:** Dondurulan cell-assosiyasyon aşılama embriyolu yumurta ve doku

kültürü kullanılarak diğer etkenler yönünden test edilmeden önce virusun enfektif özelliği 3 kere dondurup eritmek suretiyle yok edilmelidir.

#### **7. Zararsızlık Testi:**

60 adet SPF 1 günlük duyarlı civcivler iki izolatörde iki gruba ayrılırlar.

1.nci gün civcivlere aşağıdaki işlemler uygulanır:

1.nci Grup: Her civcive aşı dozunun 10 katı intra musculus olarak ve göze damlatılarak uygulanır.

2.nci Grup: Hiçbir işlem yapılmadan kontrol olarak bırakılır.

İnokulasyondan 3 hafta sonra her gruptan 5 civciv alınarak öldürülür. Gözle ve histolojik olarak Marek lezyonları yönünden incelenir, ileride yapılacak serolojik testler için her birinin kan serumu alınır, işaretlenir ve -29°C'de saklanır. 3.ncü haftada 1.nci gruptaki civcivlerin her birine tekrar normal aşı dozunun 10 katı miktarında aşı kas içi, dözle damla ve tüy follüküllerine uygulanır.

İkinci enjeksiyondan 6 hafta sonra 1.nci ve 2.nci grup civcivler öldürülerek otopsi ve histolojik muayeneleri yapılır. Aşılamadan sonra tüm civcivlerde Marek hastalığının belirli semptom, lezyon ve diğer ölüm sebepleri gözlenecektir. Test edilen aşı, eğer hastalıkla ilgili herhangi bir lokal veya sistematik reaksiyon, solunum ve sinir sisteminde belirtiler görülürse test edilen bu aşı kullanılmaz.

Daha önce 1.nci inokulasyondan 3 ve 6 hafta sonra toplanmış kan serumları aşağıda belirtilen hastalıkların antikorlarının mevcut olup olmadığını belirlemek için test edilir.

#### **HASTALIKLAR**

EDS<sub>73</sub>

Enfeksiyöz Bronşitis

Influenza A

Mycoplasma gallisepticum

Mycoplasma synoviae

Newcastle

Reovirus

Reticuloendotheliosis

Salmonella pullorum

Salmonella gallinarum

#### **TEST METODLARI**

HI

SN, HI veya FAT

HI

Lam Aglütinasyon

Lam Aglütinasyon

HI

AGP

FAT

Aglütinasyon

Aglütinasyon

### 8. Bağışıklık Testleri:

Tohum virusunun ilk üretiminde veya her iki senede bir aşağıda belirtilen bağışıklık testleri yapılır:

Aşı suşu cinsine göre 0.2 ml'de 1 saha dozu olacak şekilde sulandırılır, 1 günlük 90 adet SPF civciv 3 izolatörde 3 gruba ayrılır.

1.nci Grup: 30 adet civcivin bacak adalesine 1 saha dozu miktarda inokulasyon yapılır. Sulandırılmış aşı inokulasyon bittikten hemen sonra derhal laboratuvara getirilerek, aşı titrasyon tekniğinde anlatıldığı üzere çeşitli dilüsyonlardan petrilere hazırlanan CEF kültürlerine inokule edilerek PFU düzeyi belirlenir.

2.nci ve 3.ncü Gruba işlem yapılmaz.

### Viremia Testi

1.nci grup civcivlere aşı inokulasyonundan 5 gün sonra 10 civcivden steril heparinize kan alınır ve 60 mm'lik petrilere hazırlanan CEF kültürlerine inokule edilir, petrilere rutubetli, 37°C'deki CO<sub>2</sub>'li etüvde 5-7 gün müddetle CPE yönünden gözlenir. Sonuçta CPE görülmelidir.

İnokulasyondan 9 gün sonra 1.nci ve 2.nci grup civcivler virulent bir Marek suşu (HPRS-16) ile 10<sup>-4</sup> PFU miktarında intramusculer olarak eprüve edilirler. 3.ncü grup civcivlere inokulasyon yapılmaz, kontrol olarak bırakılırlar.

5 aylık deney periyodunda canlı ve ölü civcivler Marek ya da diğer hastalıkların semptom, lezyon ve histopatolojik lezyonları yönünden kontrol edilir. Eprüvasyon suşu 2.nci grup civcivlerin en az % 70'inde Marek hastalığının spesifik semptom ve lezyonlarını oluşturması gerekir. Koruma indexi en az % 80 olmalıdır. 3.ncü grup civcivlerin hiçbir lezyon göstermemesi gerekir. Deneysel periodun sonunda koruyucu index iki basamakta hesaplanır.

1.nci Basamak: 1.nci ve 2.nci gruptaki civcivlerde görülen Marek hastalığı yüzdesinin hesaplanması:

$$\% MD = \frac{\text{Marek hastalığı lezyonlu civciv sayısı}}{\text{İnokule edilen civcivlerin sayısı}} \times 100$$

2.nci Basamak: 1.nci ve 2.nci gruptaki Marek hastalığı yüzdesiyle koruyucu indexin hesaplanması:



$$\text{Koruyucu Index} = \frac{\text{2.nci grubun \% MD} - \text{1.nci grubun \% MD}}{\text{2.nci grubun \% MD}} \times 100$$

Minumum Korucu İndex= % 80 olmalıdır.

### **AŞI TOHUM VİRUSUNUN ÜRETİLMESİ**

Ana tohum virusu ve aşı tohum virusu üretiminin aynısıdır.

### **AŞININ ÜRETİLMESİ**

Ana tohum virusu ve aşı tohum virusu üretiminin aynısıdır.

## **ÜRETİLEN AŞIDA UYGULANACAK TESTLER**

Üretilen her rekolt aşidan rastgele alınan minumum 10 ampul aşı ile hazırlanan aşı sulandırma sıvıları beraberce test edilmelidir. Bu testler; Zararsızlık testi, Aşının ve sulandırma sıvısının sterilite ve saflık testi, Dayanıklılık testi ve aşının titrasyon testleridir.

### **ZARARSIZLIK TESTİ**

1 günlük en az 10 adet SPF civciv alınarak izolatöre konur ve aşı dozunun 10 katı miktarda kas içi aşılanır. Bir diğer izolatörede yine aynı özelliklerde 10 adet SPF 1 günlük civciv konur, fakat bunlara inokulasyon yapılmaz, kontrol olarak bırakılır. Civcivler 3 hafta boyunca gözlenir, gözlemin sonunda civcivler öldürülerek aşı sonucu oluşabilecek lezyonlar yönünden muayene edilir. 2 civcivden fazlası spesifik olmayan sebeplerden ölürse, test tekrar edilmelidir.

### **STERİLİTE VE SAFLIK TESTLERİ**

Tohum virusunun sterilite ve saflık testlerinin aynısıdır.

## DAYANIKLILIK TESTİ

Sıvı nitrojenden çıkarılıp, özel sulandırıcısında sulandırılan aşı son bırakıldığı PFU'sini korumalı ve +20°C'de iki saat bekletildikten sonra aşının titresi, her saha dozda 1000 PFU'in altına düşmemeli, ayrıca dilüent ile karıştırıldıktan hemen sonra tayin edilen değer % 50'sinden aşağı olmaması gerekir.

## AŞININ TİTRASYONU

### Aşının Titrasyon İçin Hazırlanması:

Sıvı nitrojen tankından 1 ampul aşı alınır ve 37°C'lik su banyosunda eritilir. Sonra bir enjektörle 5 ml. sulandırma sıvısı çekilir, aşıda aynı enjektöre sulandırma sıvısı üzerine çekilerek oda sıcaklığında karıştırılır, bu sulandırılan aşı derhal kalan sulandırıcı içine yavaşça ilave edilir. Tüm aşının sulandırıldığından emin olmak için tekrar 2 ml sulandırma sıvısı alınır ve ampül dikkatlice 1 defa daha çalkalanır ve sulandırma şişesine geri boşaltılır. Bu karışım sahada aşı olarak uygulamaya dayanıklı hale gelmiş aşıdır.

### Dilüsyonların ve inokulasyon plate'lerin hazırlanması:

Sulandırılmış aşı şişesi 10-15 kere ters çevirilerek karıştırılır. Enjektörle 5 ml. aşı alınır ve 2 ml'si sulandırıcıya eklenir (1:5 dilüsyon). 10 ml'lik steril bir pipetle iyice karıştırılır ve 2 ml alınarak ikinci 8 ml sulandırıcıya eklenir, (1:25 dilüsyon). Diğer 10 ml'lik steril bir pipetle iyice karıştırıldıktan sonra 1ml'si alınıp üçüncü tüpteki 9 ml sulandırıcıya eklenir (1:250 dilüsyon). Ayrıca 1:250 sulandırmadan 1:500 sulandırma yapılır ve her iki dilüsyondan 5'er petriye inokulasyon yapılır. Diğer bir steril pipetle dilüsyon iyice karıştırılır ve 1 ml aşı, 10 adet 24-48 saatlik CEF hücrelerinden 60 mm'lik petrilere hazırlanmış ve 4 ml medium içeren monolayer CEF kültürlerinde inokule edilir. Hücrelerin dilüsyon tüplerine bağlanmasını önlemek için dilüsyon mümkün olduğunca çabuk yapılır. Dilüsyonlar hazırlanırken tüpler daima buz banyosunda tutulur. Hücreler vasat ile dikkatlice karıştırılır ve inokule edilmiş plate'ler ile edilmemiş kontroller 37°C deki rutubetli, CO<sub>2</sub>'li etüvde inkube edilir. İnokulasyondan 24 saat sonra vasat değiştirilir, yerine %2 buzağı serumu içeren MEM'den 5 ml. konur. Vasatlar 2

ile 3 günde bir şayet asidik görünüyorlar ise değiştirilir. Her titrasyonda standart aşının pozitif kontrolü yapılmalıdır. Eğer titrasyon sonucu büyük ölçüde standart virus titresinden değişik ise test tekrar edilmelidir.

#### **Plak sayılarak titrenin hesaplanması:**

İnkubasyonun 5 ile 7. gününde plaklar (Sitopatik efektin odakları) iyice gelişmiş olmalıdır. İnkubasyonun sonunda petripler 5 ml ılık PBS ile yıkanır, % 96'lık alkolde tesbit edilir ve Giemsa ile boyanırlar. Petri tabanlarının dış yüzeyi bir bisturi ucuyla 1 mm aralıklarla çizilir ve odaklar invert mikroskop kullanarak sayılır. Odaklar iki ayrı merkezden kaynaklanmıyorsa büyüklüğüne bakılmaksızın sayılır. Her plate'deki ortalama plak sayılır ve 50 ile çarpılır. Bir doz 0.2 ml/civciv varsayılarak bulunan bir sonuç aşının **PFU (Plaque Forming Unit)** değeri olarak kabul edilir. Diğer çarpım faktörleri dilüsyon faktörlerine bağlı olarak kullanılabilir. Aşılar ayrı ayrı kullanıldıkları zaman, bir civcive verilmesi gereken saha dozu SB-1 ve FC-126 için 2000 PFU'dan az olmamalı, kombine-bivalent kullanıldıklarında ise 1000'er PFU alınarak kombinasyon en az 2000 PFU ihtiva etmelidir.

### **AŞILARIN HAZIRLANMASI VE UYGULANMA ŞEKLİ**

Aşı ekipmanları 30 dakika kaynatılarak veya 15 dakika 121°C'de otoklav edilmek suretiyle steril edilir. Aletlerin sterilizasyonu için kimyasal maddeler kullanılmaz. Her aşidan sonra alet ve ekipmanlar dikkatlice temizlenip, steril edilmelidir. Ertesi gün aşidan önce tekrar steril edilip, aletler aşıya başlanmadan önce iyice soğutulmalıdır, sıcak aletler aşılamada kullanılmaz ve aşıyla temas ettirilmez.

Bir ampul aşı 1000 civciv için olup, bir şişe steril, 15°-25°C'ye getirilmiş sulandırıcısı ile kullanılır.

Sıvı nitrojen tankında aşı alınırken koruyucu eldiven ve maske kullanılmalıdır.

Cell-Assosiyе MAREK aşılarının bulunduğu sıvı nitrojen tanklarındaki sıvı nitrojen seviyesinin her zaman uygun seviyede olmasına dikkat edilmelidir. Aksi halde aşılar aktivitesini kaybeder.

Bir kere eritilen aşılar tekrar dondurulmamalı ve uygun bir şekilde .



sulandırıldıktan sonra 1 saat içinde kullanılmazsa imha edilmelidir.

Ampul tanktan çıkarıldıktan sonra mümkün olduğunca çabuk çevre sıcaklığına getirilmelidir. Ampul çıkarıldıktan sonra yaklaşık 20°C'deki suya daldırılır. Aşı sıcak ya da buzlu suyla eritilmez, 37°C'den sıcak suya konmaz.

Ampul kurulanır, %70'lik alkolle dışı dezenfekte edilir ve açılır. Daha sonraki işlemler mümkün olduğunca çabuk yapılır. Aşının karıştırılmasındaki herhangi bir gecikme, aşının aktivitesi ve etkisi açısından çok önemlidir. Bazı ampuller ısı değişiklikleri nedeniyle kaza ile patlayabilir, buna da çok dikkat edilmelidir.

Ampul içindeki aşı, steril 5 ml'lik enjektöre alınır, daha sonra iğne hemen, daha önce ağzı %70'lik alkolle dezenfekte edilmiş olan dilüente daldırılır, enjektördeki aşı üzerine yavaşça dilüent çekilerek sulandırılır, 2-3 kere çalkalanıp tekrar sulandırma şişesine boşaltılır. Enjektöre tekrar 3 ml dilüent alınır, ampul dikkatlice çalkalanır ve tekrar sulandırma şişesine boşaltılır. Karıştırma sırasında dilüent sıcaklığının 15-20°C olmasına ve aşı dilüsyonunun mümkün olan azami hızla, steril bir şekilde yapılmasına gerekli özen gösterilmelidir.

Daha sonra aşı şişesine, cinsine göre ya otomatik enjektöre monte edilir ya da aşı otomatik enjektöre alınır, her defasında 0.2 ml verecek şekilde ayarlanır. Aşılama yaparken arasıra otomatik enjektörün ayarlanan hacmi verip vermediği kontrol edilmelidir.

Aşı boyun derisi altına subcutan yolla veya bacak adalesine intramuscular olarak 0.2 cc. miktarda uygulanır. Sulandırılmış aşının buz banyosunda bulundurulması ve sık sık köpürtülmeden karıştırılması gerekir. Şişenin tümü sulandırmadan sonra 1 saat içinde kullanılmalıdır. Artan aşılarda vya sulandırmadan sonra üzerinden 1 saatten uzun süre geçen aşılarda kullanılmaz, imha edilir.

### **MAREK AŞISININ DİLÜENTİNİN HAZIRLANMASI**

Marek aşısının sulandırılması için hazırlanan dilüent, Dulbecco'nun Fosfat Bufferına (PBS, pH=7.2) %0.5 Lactalbumine hydrolysate ve 5 mg/lt. phenol red indükatörü ilave edilerek hazırlanır. Bu hazırlanan dilüent 100 ml ve 200 ml miktarlarda nötr camdan mamul, beyaz renkli, toksik madde içermeyen kauçuk tıpalı, aliminyum veya plastik vida kapaklı şişelere taksim edildikten sonra 1

Atm basınç, 121°C ısıda 30 dakika otoklavda steril edilerek hazırlanır. Daha sonra dilüentin sterilite kontrolleri yapılır. Pratikte rengi bozulmuş ve içinde tortu oluşan sulandırma sıvıları kullanılmaz.

### ÖNEMLİ HATIRLATMALAR

- \* Aynı aşı alet ve ekipmanlarını kullanarak diğer aşılarda karıştırılmaz ve inokule edilmez.
- \* Steril olmayan alet ve ekipmanlar kullanılmaz.
- \* Erimiş aşılarda ve yarım kalan aşılarda derhal imha edilir.
- \* Rengi bozulmuş ve içinde tortu oluşan sulandırma sıvıları kullanılmaz.

### TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan araştırma ve sonuçları Entitümüz Araştırma komitesince incelenerek Araştırma Kesin Raporu şeklinde düzenlenip Bakanlığımız Sağlık Müşavere Kuruluna arzına karar vermiştir. Sağlık müşavere kuruluna gönderilen aşı üretim protokolü ve kullanma prospektüsü, A.Ü. Veteriner Fakültesi, Bakanlık ve Enstitülerin ilgili uzmanlarından teşkil eden komisyon tarafından 29-30/03/1988 tarihlerinde toplanarak araştırma konusu olan aşının üretim protokolü ve kullanma prospektüslerini incelemişler ve üretilecek olan **Cell-Associated MAREK** aşısının Serotip-1 Hollanda suşu **CVI-988**, Serotip-2 Amerikan suşu **SB-1** ve Serotip-3 Hindi Herpes virüs **FC-126** suşları ile 3 ayrı aşı üretimi yerine, sadece serotip-2 **SB-1** ile serotip-3 **FC-126** suşları ile iki çeşit aşının üretimine ve gerektiğinde de kombine kullanılmasına karar vermişlerdir. Çok virulent Marek suşlarına bile %75 civarında immünite sağlayabilen antijenik özelliği Marek virusunun prototipine %100 benzerlik gösteren Hollanda aşı suşu serotip-1 **CVI-988** patojenite özelliği ve lateral spread-yatay geçiş özelliği bulunduğundan bu suşla aşı üretimini ilgili komisyon uygun bulmamıştır.

Adı geçen komisyonun yaptığı bu değişiklikten sonra aşı üretim protokolü ve kullanma prospektüsü tasdik edilmiş, Bakanlığımız Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğüne verilmiştir. Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğümüzün

Bakanlığımızdan aldığı 05.05.1988 tarih ve KH-HSK-1254-534 sayılı olur ile de **Cell-Associated-Marek Aşısı** Hücreye bağımlı dondurulmuş Marek Aşısı'nın kabul edilen protokol dahilinde MANİSA-Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsünde üretimi uygun görülmüştür. Bu tarihten itibaren Enstitümüz Marek Aşı üretim laboratuvarı beri aşı üretimine geçmiş ve şu anda üretilen aşılardan istekler doğrultusunda sevk edilmekte olup aşı üretim kapasitemiz tüm ülkemizin ihtiyacına cevap verecek kapasitededir.

### LİTERATÜR

- 1 B.W. Calnek and R.L. Witter, Disease of Poultry, 8th edition, (1984), 325-360.
2. Gordan and Jordan, Poultry Disease, 2nd edition.
3. Houghton Poultry Research Institute, U.K., doku kültürü üretim laboratuvarı teknik ve metodları.
4. International Association of Biological Standardization, Report of the Avian Product standardization committee, (1973).
5. Marek Disease Seminar Report, (1986), Cleveland, U.S.A.
6. M. S. Hofstad, Diseases of Poultry, 8th edition.
7. Phylaxia Veterinary Research Institute, Hungary. Aşı üretim laboratuvarı standart ve metodları.
8. Weybridge Central Veterinary Laboratory, U.K. Standart ve Metodları.



## DOKU KÜLTÜRÜNDE ÜRETİLECEK DİFTERİ ÇİÇEK AŞISI İLE ORAL İMMUNUZASYON ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Oral immunization study by using tissue culture fowl-pox vaccine

Ragıp BAYRAKTAR\*

### ÖZET

Difteri-Çiçek hastalığına karşı oral aşılama hem etkili ve hem de daha zararsızdır. Attenüe edilmiş HP-1 suşunun 200 ile 400.ncü doku kültürü pasajları arasındaki herhangi bir pasajdan üretilcek bir aşı bu iş için uygun bulunmasına karşın optimal immunizasyon için aşının 200 ile 270.nci pasaj seviyelerindeki bir suştan hazırlanması, aşılanmanın 3-4 hafta arayla iki defa tekrarlanması ve aşılama dozunda  $10^6$ - $10^8$  TCID<sub>50</sub>/doz olması gerekmektedir. Civcivlerde aşılamayı takiben 5.nci günde immunité başlamakta, immunité homolog HP-1 suşuna ve heterolog saha suşlarına karşı eşit ölçüde ve daha hızlı oluşmakta, gerek ağız yoluyla ve gerekse deri ve kas içi yapılan çelence karşı eşit direnç göstermektedir. Ağız yoluyla yapılan aşılamada gerek solunum sisteminin ve gerekse sindirim kanalının mukoz membranlarının koruması deriden yapılan aşılamadan daha iye ve hızlı bir bağışıklık oluşturmaktadır.

Bu çeşit avantajlarından dolayı içme suyu difteri-çiçek aşısı geleneksel deri yoluyla yapılan aşıya alternatiftir.

### SUMMARY

Oral immunization study by using tissue culture fowl-pox vaccine. Oral vaccination against fowl-pox is both effective and harmless. A suitable vaccine strain is the attenuated HP-1 strain in the 200 th to 400 th tissue culture pas

\* Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü - ANKARA

sage. For should be applied twice at an interval of 3 to 4 weeks. The vaccination dose should contain  $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub>. Chickens may be effectively immunized already at. Immunity starts 5 days later after vaccination and Immunity is against both homologous and intravenous challenge. Protection of mucous membranes of the upper respiratory and digestive tract forms faster than after cutaneous immunization.

Because of these advantages oral immunization against pox is a genuine alternative to the traditional cutaneous vaccination. Compared to conventional fowl pox vaccination with drinking water vaccination the technicalities of vaccination are facilitated, there are immunological advantages and risk of complications are avoided.

## GİRİŞ

Deri ve tüy folliküllerinde tümör benzeri kabartılar, ağız ve ön solunum yolları mukozasında difterik lezyonlar ile karakterize olan Difteri-Çiçek hastalığına karşı birçok kanatlı türü başta tavuk, hindi olmak üzere güvercin, kanarya, kaz, ördek, sülün olmak üzere hemen her yaşta hassastırlar (HOFSTAD ve ark. 1984). Son yıllarda araştırmacılar kargalardan da çiçek virusunu izole etmişlerdir. Bu hastalık dünyanın her yerine yayılmış bir hastalık olup, tavukçuluk alanında görülen en eski hastalıklardan biri olarakta sayılmaktadır. (GÜRSOY, 1987). POXVIRIDAE familyası avipoxvirus grubundan olan etken çevre şartlarına ve doğa koşullarına dayanıklıdır. Hava, enfekte sinekler (mekanik vektör) ve çiçekli hayvanlardan çevreye yayılmış enfekte kabuklar bulaşmada çok önemli rol oynamaktadırlar. (DA MASSA.1966).

Etken çevre koşullarına ve şartlarına çok dayanıklı olup, kurumuş kabuklar halinde 3-4 sene canlı olarak kalabilmektedir. Ülkemizde de özellikle kış ve ilkbahar aylarında zaman zaman bu hastalığa rastlanmaktadır. Hastalığın morbidite ve mortalitesi virusun virulansına, kümes ve çevre şartlarına göre değişmekte isede bazen mortalite % 50'ye kadar yükselebilmektedir. (GÜVEN ve ark. 1983). Hastalığın inkübasyon periyodu tavuk, hindi ve güvercinde 4 ile 10 gün arasında değişmekte, kanaryalarda ise ortalama 4 gün olarak bildirilmektedir. (DA MASSA 1966).

Dünyada yapılan araştırmaların ve bizim yaptığımız araştırmanın sonuçlarına göre doku kültürüne adapte edilmiş attenüe virusla üretilen Difeteri-Çiçek aşılarının, embriyolu yumurta Korio Allantoik Membran-CAM'da üretilen aşılarla oranla daha yüksek immun yanıt oluşturduğu, gerek solunum ve gerekse sindirim kanalı müköz membranların korumasıda daha yüksek olmaktadır. (MAYR and DANNER, 1975).

Görevi Türkiye'nin tüm tavuk aşılarının ihtiyacına cevap vermek olan enstitümüz üretim planına aldığımız Difeteri-Çiçek aşısının çağımız şartlarına uygun ve kaliteli bir aşı olması düşünülerek bu çalışma yapılmıştır. Sonuçlar olumlu olduğundan seri aşı üretime geçilmesi için protokol hazırlanmış ve Bakanlığa arz edilmiştir.

## MATERYAL

### A) Araç-Gereç

Rolling inkübatör, karbondioksitli etüv, membran filitre sistemi, soğutmalı santrifüj, invert mikroskop, homojenizatör, ultrasonik parçalayıcı, manyetik karıştırıcı, otoklav, kuru sterilizatör, kurutma dolabı, Laminar flow kabin, Ben-Marie cihazı, deionize su cihazı, -70°C'lik deepfreeze, elektrikli pipet, embriyolu SPF yumurta, HP-1 aşı tohum virusu 196, 272 ve 400 ncü pasajları, pens, makas, bistüri, forseps, otomatik ve normal enjektör, otomatik pipet ve uçları, steril disposable doku kültürü flask ve petripleri, thoma veburker lam ve lameli borosilikat camdan mamul rolling şişe ve diğer doku kültürü cam malzemeleri.

### B) Kimyasal Malzemeler

Minumum Essential Medium-MEM, glutamine, bovine calf ve fetal calf serum, NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Tryptose Phosphat Broth- TPB, NaHCO<sub>3</sub>, Tripsin, procain penisilin-G, Dihidro streptomisin sülfat, fungizone, kanamycine, trypan blue, EDTA, etil alkol, iode, T.C. Vitamin.

### Aşı Suşu

Bu çalışmada Attenüe, apatojen Fowl Pox virus Hp-1'in 205.nci pasajı aşı suşu olarak kullanıldı.



## Aşı Tohum Virusunun Üretilmesi

Aşı tohum virusu, dönen (rolling) doku kültürü sistemiyle 10-12 günlük SPF embriyolardan elde edilen primer civciv embriyo fibroblast hücrelerinde (1° CEF) hazırlandı.

Yumurtalardan alınan embriyolar steril koşullarda petriyeler içine alındıktan sonra kafası kesilip, iç organları çıkarılan embriyo grupları bir araya toplandı, makasla küçük parçacıklara ayrılarak parçalanmış doku hücreleri 37°C'de üç kere PBS içine yıkandı, sonra 37°C'de % 0.05 Tripsinli PBS (pH=7) ile tripsinleme işlemine tabi tutuldu, elde edilen hücreler, içinde % 10 steril buzağı serumu bulunan kodeler içine toplandı, hücreler gazlı bezden süzülerek büyük hücre grupları uzaklaştırıldı ve süzüntü düşük hızda santrifüje edilerek hücreler çöktürüldü. Çöken hücreler, % 8-10 steril yeni doğmuş buzağı serumu, % 10 triptose fosfat buyyon (TPB), 100 IU/ml. peniciline; 100 µg/ml. streptomycine ve 2 µg/ml fungizone bulunan Minimal Esansiyel Medium (MEM) içine alındı ve hücreler sayıldıktan sonra (her cm<sup>2</sup>'de 3x10<sup>5</sup> hücre) içlerinde 150 ml Minimal Esansiyel Medium-Growth (MEM-G) bulunan 1200 cm<sup>2</sup>'lik rolling doku kültürü şişelerine inokule edilip, rolling doku kültürü şişeleri 38°C'de rolling intübatörde şişelerin yüzeyinde tam bir monolayer kültür oluşana kadar inkübe edildi, sonra vasatlar sterilite kurallarına uyularak boşaltılıp, rolling şişelerde primer CEF katmanı, -80°C'de saklanan ve 37°C'de su banyosunda eritilen 10<sup>7.0</sup> TCID-50/ml dozda 10 ml virusla enfekte edildi. Enfekte edilmiş kültürler, hücrelerin çoğu enfekte olana kadar yani yaygın olarak cytopathic effect (CPE) görülene kadar 38°C'de 4-5 gün inkübe edildiler.

Yaygın CPE görüldükten sonra şişeler çalkalanarak veya hücre kazıcısıyla hücreler sıyrılıp mediumla birlikte toplandı, daha sonra ultrasonik parçalayıcı ile 10 sn. ara ile 3 defa 20 sn. süreyle parçalandı, 13 defa aynı şekilde pasajlar devam edildi. 205. nci pasaja erişilince elde edilen virus süspansiyonunun titresi hesaplandı ve % 5.5 Laktoz ilave edilip 5 ml. miktarda şişelere taksim edilip liyofilize edildi ve -80°C'de saklanmaktadır.



## Aşı Üretimi

Aşı dönen (rolling) doku kültürü sistemiyle primer civciv embriyo fibroblast hücrelerinde (CEF) hazırlandı. Primer CEF, 10-12 günlük embriyolu SPF yumurtalardan hazırlandı. Yumurtalardan alınan embriyolar steril koşullarda petriker içine alınıp, kafası kesilen ve iç organları çıkarılan embriyo grupları bir araya toplandı. Makasla parçalanmış dokular 37°C'de üç kere PBS içinde yıkandıktan sonra, 37°C'de % 0.05 Tripsinli PBS (pH=7) ile tripsinleme işlemine tabi tutuldu. Elde edilen hücreler, içinde % 10 steril buzağı serumu bulunan buz içindeki kodelere toplanıp, hücreler gazlı bezden süzülerek büyük hücre grupları uzaklaştırıldı ve süzüntü düşük hızda santrifüje edilerek hücreler çöktürüldü. Çöken hücreler, % 8 steril yeni doğmuş buzağı serumu, % 10 Triptose fosfat buyyon (TPB), 100 IU/ml. penicilline; 100 µg/ml. streptomycine ve 2 µg/ml. fungizone bulunan Minimal Esansiyel Medium (MEM) içine alındı. Hücreler sayıldıktan sonra her cm<sup>2</sup>'de 3x10<sup>5</sup> hücre bulunacak şekilde içlerinde 200 ml Minimal Esansiyel Medium-Growth (MEM-G) bulunan rolling doku kültürü şişelerine inokule edilip 38°C'de rolling inkübatöre kondu. 24 saat sonra şişelerin yüzeyinde tam bir monolayer oluştuğundan sonra rolling şişelerden sterilite kurallarına uygun olarak vasatlar boşaltılıp, her şişeye 1000 TCID<sub>50</sub>/0.5 ml. doz ihtiva edecek şekilde 10 ml. virus süspansiyonu inokule edildi. Rolling inkübatörde bir saatlik adsorbsiyondan sonra, şişelere % 10 TPB, % 4 fetal veya yeni doğmuş buzağı serumu, antibiyotik ve antimikotik içeren ME medium kondu ve sitopatik efekt (CPE) yaygın bir şekilde görülene kadar 4-5 gün inkübe edildiler. CPE oluştuğundan sonra virus içeren doku kültürü sıvası ve hücreler bir kaba toplandı. (Şişeler kuvvetlice çalkalanarak veya hücre kazıcısıyla yüzeyden alındılar). Daha sonra düşük devirde santrifüje edilip üstteki virusla doku kültürü sıvası alındı ve dipteki hücre paletlerini homojen etmek için 50-60 ml. miktarda kodelerde sıvı bırakıldı, palet halindeki hücreler suspanse edilip hepsibir kaba toplandı ve MSE-Sonik parçalayıcıda maximum amplitude'da 30 sn. süre ve 10 sn.lik beklemelemlerle 8 defa buz içinde tutularak parçalandılar, bu parçalanmış hücrelerde diğer medium içine ilave edilip, üzerine de % 5.5 Laktoz ilave edildikten sonra 5 ml. miktarda steril koşullarda şişelere taksim edilip liyofilize edildi ve bu liyofilize aşılar -20°C'de muhafaza edilmektedir.

## Aşı Testleri

Aşı tohum virusuna uyguladığımız tüm sterilite, zararsızlık, diğer etkenlerin kontrolü, titrasyon ve bağışıklık testleri üretilen bu aşılarda detaylı bir şekilde bulgular bölümünde anlatıldığı şekilde uygulandı.

## BULGULAR

1. Münih Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji, Enfeksiyöz ve Salgın Hastalıklar Enstitüsünden Prof.Dr.Dr.h.c. A. MAYR'dan temin edilen attenüe apatojen Fowl Pox virus HP-1 suşu 192 FHE pasajının, civciv embriyo fibroblast doku kültüründe 13 defa pasajı yapılarak aşı suşu olarak kullanılacak 205.nci pasaj elde edildi. Her pasajdan numuneler alınarak saklandı. Orijinal 192.nci pasajın titresi yapıldı ve  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml. bulundu.

2. Aşı suşu; Uluslararası Biyolojik Maddeler Sterilite Kontrolü Standart Metodlarına göre aerobik ve anaerobik bakteri, salmonella spp., PPLO ve mantar yönünden incelendi ve steril bulundu.

3. Diğer etkenler yönünden aşı suşunun kontrolünü yapmak için 1.5ml. HP-1 tohum virusu, 3 ml. spesifik FPV antiserumu ile karıştırılıp 15 dk. beklendi.

a) Bu karışım ayrı ayrı 10'ar adet 10 günlük embriyolu SPF yumurtanın allantoik boşluğuna, CAM'ına ve 10'ar adet 5 günlük embriyolu SPF yumurtanın sarı kesesine inokule edilip 7 gün süreyle beklendi. Bu süre sonunda embriyoların hepsi canlı kaldı, herhangi bir anormallik görülmedi ve yapılan muayenede allantoik sıvılar HA yönünden negatif bulundular.

b) Yukarıda hazırlanan virus + antiserum karışımından HA testi yapıldı, karışım HA negatif bulundu.

c) Tohum virusu üretimi ve aşı üretim bölümünde anlatılan şekilde 60 mm'lik petrilere hazırlanmış 5 adet primer CEF ve 5 adet civciv böbrek -CK hücre kültüründen üretim vasatları uzaklaştırıldıktan sonra, 0.1 ml. virus + antiserum karışımı inokule edildi. CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C'de 1 saatlik adsorbsiyondan sonra % 2 fetal veya yeni doğmuş buzağı serumu ilave edilmiş MEM konup (2 ml.), kültürler 5 gün boyunca sitopatik efekt (CPE) yönünden incelendiler.

İnkubasyonun sonunda sitopatik efekt görülmedi.

4. Aşı suşunun zararsızlık yönünden kontrolü için 40 adet SPF 1 günlük duyarlı civcivlere aşağıdaki işlem uygulandı:

1. Grup

Her civcive aşı dozunun 10 katı miktar sulandırılıp, ağızdan içilerek ve tüy follükülerine sürülerek uygulandı.

2. Grup

Hiçbir işlem yapılmadan kontrol olarak bırakıldı.

İnokulasyondan 3 hafta sonra her gruptan 5 civciv alınarak öldürüldü, otopside gözle ve histolojik olarak çiçek lezyonları yönünden incelendi, ileride yapılacak serolojik testler için her birinin kan serumu alındı, işaretlendi ve -20°C'de saklandı. Üçüncü haftada 1. gruptaki civcivlerin herbirine tekrar aşı dozunun 10 katı miktarı ağızdan içirilerek ve tüy follükülerine sürülerek uygulandı.

İkinci uygulamadan iki hafta sonra tüm civcivler çiçek hastalığının belirli semptom lezyon ve diğer ölüm sebepleri yönünden gözlemlendi. Hastalıkla ilgili herhangi bir lokal veya sistemik reaksiyon, solunum ve sinir sisteminde hiçbir belirti görülmedi.

Daha sonra birinci inokulasyondan 3 hafta sonra ve ikinci inokulasyondan 2 hafta sonra toplanmış kan serumları aşağıda belirtilen hastalıkların antikollarının mevcut olup olmadığını belirlemek için test edildi ve negatif bulundu.

Hastalıklar	Test Tipi
EDS-76	HI
Enfeksiyöz Bronşitis	AGP veya HI
Influenza-A	HI
Mycoplasma Gall-Synoviae	SPAT
Newcastle	HI
Gumboro	AGP
Adeno Virus	AGP
Reo Virus	AGP
ILT	AGP
Salmonella Pullorum-Gall	Aglutinasyon

5. Aşı suşunun bağışıklık testi için 40 adet 21 günlük SPF civciv iki gruba ayrılarak izolatörlere kondu, hepsinin kan serumları alınarak FP, IB, ND, EDS-



76, AI, Mycoplasma Gall-Syn., IBD, Salmonella, ILT, Adeno ve Reo Virus hastalıkları yönünden HI, AGP, Aglutinasyon, SPAT veya ELISA testlerinden biri ile incelendiler, sonuçta sero-negatif bulundular. Daha sonra 20 adedi bir saha dozu miktarda  $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub> aşı ile 3 hafta aralıkla iki defa aşılandılar. Son aşılamaı takiben 2 hafta sonra aşı ve aşısız piliçler HP-1 orijinal virulent suşla veya FP-92 virulent suşu ile intravenöz olarak  $10^6$  veya tüy follükülü metoduyla  $10^{4.8}$  EID<sub>50</sub>/piliç dozunda eprüve edildiler. Bütün kontroller intravenöz eprüvasyondan sonra generalize çiçek enfeksiyonu ve tüy follükülü ile eprüve edilenler ise ağır lokal püstüler form enfeksiyonu gösterirken aşılların hepsi sağlam kaldılar.

6. Aşı suşunun titrasyonu yapıldı, bunun için steril bir enjektöre alınan 5 ml. steril PBS veya FTS ile 1000 doz aşı sulandırılıp, 10 katlı sulandırma tekniğine göre  $10^{-1}$ 'den  $10^{-10}$ 'a kadar tüpler buz içinde bulundurulmak üzere dilüsyonu yapıldı.

Daha önce anlatılan tekniğine uygun olarak 60 mm.lik petrilere hazırlanmış CEF kültürlerine her dilüsyondan 0.1 ml. miktarda 5'er adet olmak üzere inokülasyon yapıldı. 37°C'de 1 saat adsorbsiyondan sonra petrilere 4 ml. medium ilave edildi. İnokule edilenler ve kontrol olarak bırakılan petrilere 5 gün süreyle % 5 CO<sub>2</sub> li etüvde inkübe edildiler vesitopatik efekt-CPE yönünden kontrol edilerek Sperman-Kerber metodu ile hesaplanması yapıldı. Aşı tohum virusunun TCID<sub>50</sub> titresi  $10^9$ /ml. olarak bulunduki buda istenen seviye üzerindedir.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Tavuk difteri-çiçek hastalığına karşı attenüe edilmiş HP-1 suşundan hazırlanmış, dondurularak kurutulmuş olan bu canlı virus aşısında, aşılama dozu hayvan başına  $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub> 'dir.Civcivlerde aşılamadan 5 gün sonra immunité oluşmaktadır. Bu aşılamada solunum ve sindirim kanalı müköz membranların koruması, kanat zarı ile yapılan aşılamadan daha hızlı ve iyidir. Homolog eprüve suşa ve heterolog saha suşlarına karşı immunité şekillenmekte ve oral, kutan ve intravenöz eprüvasyonlara eşit oranda rezistanslık göstermektedir. Aşı 5 günlükten büyük civcivlere uygulanmakta, aşılama programına ve hastalığın bölgedeki riskine göre ilk aşılama 5.nci günde, ikinci



aşılama 26.ncı günde ya da ilk aşılama 21 günlük iken ikinci aşılama 35.nci günde içme suyu yöntemiyle hayvanlara uygulanmalıdır. Aşı tatbikata kurutulmuş olarak sevk edilecektir. Aşılar +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmeli ve şişelerin üzerindeki son kullanma tarihi gözönünde bulundurulmalıdır. Buzdolabından çıkarılan ve açılan aşılar geciktirilmeden derhal kullanılmalıdır.

Aşı; güneş ışığına, sığağa, dezenfektanlara ve deterjanlara çok hassas olup, özellikle korunmalıdır. Aşılacak hayvanların her türlü stres'ten uzak ve tam sıhhatli olmaları gerekir. Önerilenden az dozda aşı tatbikatı yapılmamalıdır.

Aşılama 2-4 saat önce hayvanlar susuz bırakılmalı, aşılama başladıktan 2 saat içinde de aşı suyunun bitirilmesi gerekmektedir. Her civcivin suluklara yetişip yetişmediği ve suluklara direkt güneş ışığı gelmemesi kontrol edilmelidir.

1 şişe aşı 1000 doz olup, 5 ml. saf, klorsuz ve dezenfektansız su ilave edilip, eritilir. Aşağıda belirtilen şekilde hesaplanan aşılama suyunun 1 lt.sine 2 gr. yağsız süt tozu konmalıdır. İyi kalitede içme suyu kullanılmalı, suluklar temiz olmalı ve dezenfektanlar ile temizlenmemelidir.

Genel olarak 1 civciv için 1 doz aşı aşağıdaki miktarlardaki su içinde bulunmalıdır.

2 haftalığa kadar her civciv için 5-10 ml. su,

3 ile 8 haftalığa kadar her civciv için, 20-30 ml. su hesap edilmelidir.

Aşılama sonra hayvanların kümesteki yaşam şartlarına çok dikkat edilmeli, kümes ısı, yem, su v.s. yeterli nitelikte olmalıdır.

Sonuç olarak; bu aşının avantaj ve dezavantajlarını aşağıdaki şekilde sıralayabiliriz.

Dezavantajları:

1. Aşılama dozu daha fazla virus içermelidir bu da aşının üretim maliyetini arttırmaktadır.

2. İmmunite uzun süre devam etmediğinden ikinci aşılama gereklidir.

3. Hayvanlar tek tek aşılanmadığından, diğer içme suyu aşılamalarına benzer şekilde antikor seviyelerinde farklılıklar gözlenebilir.

4. Hatalı teknik uygulamalardan dolayı (suyun sertliği, klor ve dezenfektan içermesi, sulandırma hatası v.s.) aşılama başarısız olabilir.

5. Deri yoluyla yapılan aşılama gibi sonuçlar gözle izlenemez.

Avantajlarına gelince;

1. Müköz membranların korunması çok hızlı olduğundan, bu yollardan virus girişi bloke edilir.
2. Merkezi immunité daha hızlı oluşur.
3. Fiziki stresler hiçbir şekilde oluşmaz.
4. Sekonder enfeksiyon komplikasyonu, etrafa virus saçılması v.b. kötü etkiler yoktur.
5. Hayvanların estetik görünüşü bozulmaz.
6. Neonatal dönemde immunizasyon mümkündür.
7. Alerji riski kesinlikle yoktur.
8. Çok sayıda hayvanın hızla kısa zamanda aşılması mümkündür.

### TEŞEKKÜR

Münih Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji, Enfeksiyöz ve Salgın Hastalıklar Enstitüsünden Prof.Dr.Dr.h.c. A.MAYR'a, Hannover Veteriner Fakültesi Kanatlı Hastalıkları Klinik Başkanı Prof.Dr. U.NEUMANN'a, İngiltere Weybridge Merkez Enstitüsünden Dr. C.A.WILKINS'e araştırma esnasındaki yardımlarından dolayı teşekkürü borç biliriz.

### KAYNAKLAR

1. BAXENDALE, B. 1971: Studies of Three Avian Pox Viruses and The Development of an Improved Fowl Pox Vaccine. Vet.Rec. 88: 5-10.
2. BUSCAGLIU, C., BANKOWSKI, R.A., MIERS, L. 1984: Cell Culture Virus neutralization Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Evaluation of Immunity in Chickens Against Fowlpox. Avian Dis. 29: 672-680.
3. CUNNIGHAM, C.H. 1973: A Laboratory Guide in Virology, 7.th Ed. Burgess, Minneapolis. 80-82.
4. DA MASSA, A.J. 1966: Extrinsic Transmission of Avian Poxviruses. Avian Dis. 10: 57-66.
5. DANNER, K., HERLYN, M., GERBERMANN, H., MAYR, A. 1975: Perorale Immunisierung Gegen Pocken. Zbl.Vet.Med. 22: 274-284.
6. EL-ZEINE, A., NEHME, S., GHORAIB, V., HASBANI, S., TOTH, B. 1974:

Preparation of Fowl Pox Vaccine on Chicken -Embryo- Dermis Cell Culture. Avian dis. 18: 495-506.

7. GELENCZEI, E.F. and H.N. LASHLER. 1968: Propagation of Avian Poxvirus on Tissue Culture. Avian Dis. 12: 142-150.

8. GÜRSOY, N. 1987: Tavukçulukta Temel Bilgiler ve Önemli Hastalıklar. Difteri-Çiçek Hastalığı. 1.Baskı. 88-90.

9. GÜVEN, S., SARISAYIN, F., NADAS, Ü.G., DEMİRÖZÜ, K. 1983: Difteri-Çiçek Hastalığı. Kanatlı Hayvanların İnfeksiyon Hastalıkları ve Laboratuvar Teşhis Yöntemleri. Pendik Vet.Kont.Arş.Enst. Yayın No:7. 100-107.

10. HOFSTAD, M., H. JOHN BARNERS, B.W. CALNEK and Et. Al. 1984: Fowl Pox Disease. Disease of Poultry, 8.th Edition. 524-534.

11. JOHNSON, R.H., VAUGHAN, R. 1962: Production and Use of Fowl Pox Vaccine in Nigeria. Bull. Epiz. Dis. Afr. 10:441-450.

12. MAYR, A. 1963: Propagation of Avian Pox Virus on CEF. Berl. Muench Tieraerztl Wochenschr. 76: 316-324.

13. MAYR, A., DANNER, K. 1975: Oral Immunization Against Pox. Studies on Fowl Pox as a Model. Develop. Biol. Standard., 33:249-259.

14. MENASCET, I., NARDELLI, L. 1964: A Comparative Method For Determination of Virulence of Strains of Fowl Pox Virus. (Translation) Veterinaria Italian. XV: 177-189.

15. MOCKETT, A.P.A., SOUTHEE, D.J., TOMLEY, F.M., DEUTHER, A. 1987: Fowl Pox Virus: It's Structural Proteins and Immunogens and the Detection of Viral Specific Antibodies by ELISA Avian Path. 16: 493-504.

16. SICCARDI, F.J. 1974: The Addition of Fowl Pox and Pigeon Pox Vaccine to Marek's Vaccine For Broilers. Avian Dis. 19: 362-365.