

Vero hücrelerinde ısıya dayanıklı sığır vebası aşısı üretimi*

Özden KABAKLI¹, Elvin ÇALIŞKAN¹, A. Burak GÜNGÖR¹, Süreyya YÖNDEM¹,
İlkay DEMİRHAN²

¹Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Viral Aşı Üretim Laboratuvarı; ²Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 10.05.2010, Kabul Tarihi / Accepted: 16.06.2010

Özet: Vero hücrelerinde üretilen bir sığır vebası aşısının termostabilitesi %5 laktalbumin hidrolizat ve %10 sukrozdan oluşan stabilizatör ve 74 saat süren liyofilizasyon protokolü ile gerçekleştirildi. Stabilizatör ve liyofilizasyon protokolü +37°C, +42°C, +45°C ve +56°C'deki hızlandırılmış stabilite testi ile test edildi ve bu verilerden Arrhenius eğrisi yapıldı. Bu metotla üretilen liyofilize sığır vebası aşısı minimum gerekli infektif titre olan 10^{-2.5} DKID₅₀/ml titreyi +37°C'de 30 günden fazla sürdürmüştür. Aşının aktivitesi sığırlarda antikor titresini ile test edildi. Sulandırılmış aşının stabilitesi üç farklı dilüent ile test edildi. Sonuç olarak aşı virusunun 1 molar magnezyum sülfat solüsyonu ve normal fizyolojik tuzlu su ile sulandırıldığında, +37°C gibi yüksek ısıya sahip bir ortamda 4 saatten daha fazla infektif titresini koruduğu belirlendi.

Anahtar sözcükler: Canlı aşı, ısıya dayanıklı, sığır vebası, stabilite, vero hücre.

Production of a thermostable vero-cell adapted rinderpest vaccine

Summary: The thermo stability of a rinderpest vaccine produced on vero cells were evaluated using 5% lactalbumin hydrolysate–10% sucrose as a stabilizer and a lyophilization protocol that is takes 74 hours. The stabilizer and lyophilization schedules were examined using accelerated stability testing at +37°C, +42°C, +45°C and +56°C, and an Arrhenius plot was based on from these data. A lyophilized rinderpest vaccine was maintained the minimum required dose of 10^{-2.5} TCID₅₀/ml more than 30 days at +37°C. The biological activity of the vaccine by measured with antibody titration in cattle. The stability of the reconstituted vaccine was examined using three different diluent preparations. Finally, the infectivity of vaccine was stable even at high temperatures up to 4 h after reconstitution with magnesium sulphate molar solution or normal physiological saline.

Key words: Live vaccine, rinderpest, stability, thermostability, vero cells.

Giriş

Günümüzde kullanılan sığır vebası aşılarının çoğu Plowright tarafından primer dana böbrek (PDB) hücre kültürlerinde 92. pasajda attenue edilen Rinderpest Bovine Kabate O (RBOK) suşundan orjin alır (14). Ülkemizde de 1999 yılına kadar, primer buzağı böbrek hücre kültürlerinde attenüe RBOK suşundan üretilen canlı liyofilize sığır vebası aşısı kullanılmıştır (7, 20). Bu suş ile primer buzağı böbrek hücre kültürlerinde üretilen aşının tek ve önemli dezavantajı ısıya karşı hassasiyetidir (22). Günümüze kadar RP aşısı üretimi konusunda, aşının ısıya dayanıklılığı açısından pek çok çalışma yapılmıştır. Bunların bir kısmında farklı stabilizatörler ve farklı liyofilizasyon metotları denenirken (5, 13, 23) bir kısmında ise ısıya dayanıklı mutant suşlar elde ederek termostabil aşı üretme yoluna gidilmiş-

tir (17). Mariner ve ark. (11) tarafından laktobionik asit, hidrolize jelatin ve sorbitol (LGS), laktoalbumin hidrolizat ve sukroz (LS) ile hidrolize jelatin (BUGS)'den oluşan 3 farklı stabilizatör denenerek yapılan çalışmada %10 sukroz ve %5 laktalbumin hidrolizat'ın termostabiliteyi sağlayan en iyi stabilizatör olduğu bildirilmiştir. OIE standartlarında da (2) RP aşısı üretiminde %10 sukroz ve %5 laktalbumin hidrolizat önerilmektedir. Bunların yanı sıra RP aşılarında termostabiliteyi etkileyen diğer bir etken olarak liyofilizasyon ısıları ve süreleri üzerinde de çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla Mariner ve ark. (12) tarafından liyofilizasyon süresinde değişiklik yapılarak, vero hücrelerinde ısıya dayanıklı RP aşısı üretimi gerçekleştirilmiştir.

Termostabil sığır vebası aşısı soğuk zincire gerek kalmaksızın sahada 30 güne kadar kullanılmaktadır (10). Liyofilize aşılarda sahada kullanımı

Yazışma adresi / Correspondance: Özden Kabaklı, Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Viral Aşı Üretim Laboratuvarı, 06020, Etlık, Ankara, Türkiye E-posta: ozdenkabakli@gmail.com

*Bu araştırma TKB EMVKA ve TAGEM/HS/14/01/07/127 no'lu proje ile desteklenmiştir.

sırasında, sulandırma amaçlı kullanılan 1M MgSO₄, %0.85 NaCl ve distile su gibi diluentlerde termostabilite açısından pek çok araştırmacı tarafından denenmiş olup bunlar içinde 1M MgSO₄, %0.85 NaCl en uygun diluent olarak bulunmuştur (3, 20). Aşılardaki stabilite çalışmalarında, aşının yarılanma zamanını ve raf ömrünü belirlemede Arrhenius eğrisi ve degradasyon oranı belirleyebilen istatistik programları kullanılmıştır (1, 4, 6). Termostabilite çalışmaları için ise aşılar farklı ısılarda tutularak test edilmiştir (15, 18, 19).

Bu çalışmanın amacı Türkiye’de ilk kez ısıya dayanıklı sığır vebası aşısı üretmektir. Aşıda vero hücre hattının kullanım amacı, aşı virusunun üretilmesi sırasında primer hücrelerden kaynaklanabilecek teknik zorlukları ortadan kaldırmaktır. Aynı zamanda ısıya dayanıklı sığır vebası aşısı üretimi ile aşısının raf ömrü uzayacak ve sahada soğuk zincir şartlarına uyma gerekliliği olmadan rahatlıkla kullanılacaktır. Bu çalışma, diğer liyofilize aşılardan da benzer yöntemlerle ısıya dayanıklı olarak üretilmesi için bir basamak oluşturacaktır.

Materyal ve Metot

Virüs: Primer dana böbrek (PDB) hücre kültüründe 95’inci pasajdaki sığır vebası Kabate O suşu (KABATE O RP-Pirbright V19/13/92 BK 95) vero hücre kültürlerinde 3 pasaj gidildi. 98’inci pasajda vero hücrelerine adapte ana tohum virus stokları (MS-TRPV BK95 VERO3) oluşturuldu. Stoklar OIE’de (2) belirtilen kalite kontrol testlerine göre test edildi ve değerlendirildi. Benzer şekilde üretimi yapılan 3 seri deneme üretimi TRPV 1/08, TRPV 2/08, TRPV 3/08 olarak kodlanarak kalite kontrol testleri tamamlandı. Vero hücrelerinde üretimi yapıp steril bulunan ve titresi Spaermen-Kaerber metoduna göre belirlenen bulk virusa 1/1 oranında %5 laktalbumin hidrolizat ve %10 sukroz (pH 7.2) ihtiva eden stabilizatör ilave edildi, 1 ml’lik aşı şişelerine taksim edilerek; 74 saat süren ve vakumun 100 mTorr olarak sabitlendiği, Mariner ve ark. (12)’nin uyguladığı liyofilizasyon protokolu ile liyofilize edildi. Liyofilizasyon sonrası kalite kontrol testleri yapılarak -20°C’de muhafaza edildi. Daha sonra farklı ısılarda tutulan (+4°C, +37°C, +42°C, +45°C, +56°C) liyofilize aşıda ve farklı sulandırma sıvıları (1M MgSO₄, %0.85 NaCl-fizyolojik tuzlu su, distile su) ile sulandırılmış aşıda +37°C’deki stabilite testleri yapıldı.

Liyofilize formundaki aşının hızlandırılmış stabilite testi ve hesaplanması: -20°C’de muhafaza edilen liyofilize aşı viruslarından 100’er şişe örnek alınarak (+4°C, +37°C, +42°C, +45°C, +56°C) gibi farklı ısılarda tutuldu, bu gruplardan bir kısmı liyofilizasyonun ardından +37°C (±0.5°C) inkübatöre konuldu, ardından 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56, 70, 84, 106, 122, 140, 202’nci günlerde 2 şişe örnek alınarak -20°C’de titreleri test edilinceye kadar saklandı. Diğer örnekler +42°C, +45°C, +56°C ayarlanan su banyosuna konuldu ve takiben; +42°C’deki şişeler 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 29, 35, 43, 49’uncu günlerde, +45°C’deki şişeler 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 21, 29, 35, 43, 49’uncu günlerde, +56°C’deki şişelerden 0, 2, 4, 7’nci saatlerde ve 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 29, 35, 43, 49’uncu günlerde 2 şişe örnek alınarak -20°C’de titreleri test edilinceye kadar saklandı. +4°C, -20°C’de ve oda şartlarında saklanan aşılarda yapılan test sonucu 19 ay sonunda +4°C ve -20°C’de infektif titrede hiç düşme olmadığı tespit edildi. Aşının yarılanma ve raf ömrünün belirlenmesi amacıyla Mariner ve ark. (11)’nin bildirdiği şekilde azalma eğrisi ve Arrhenius eğrisi kullanıldı. Kabul edilebilir minimum titre 100 doz için 10^{-4.5} TCID₅₀ /ml ve tek doz için 10^{-2.5} TCID₅₀ /ml kabul edildi. Bu yöntemle dört farklı ısıda azalma değeri ile seçilen düşük ısılardaki düzeltilmiş “k” değeri, yarılanma ömrü ve tahmini “k” değeri belirlendi.

Sulandırılmış aşının stabilite testi: 1 şişe (100 doz) liyofilize aşı +37°C (±5°C)’deki su banyosu içinde daha önce ısıtılmış 100 ml’lik, 1M MgSO₄, %0.85 NaCl-fizyolojik tuzlu su ve distile su bulunan koyu renkli sulandırma şişeleri içinde ışık görmeyecek şekilde sulandırıldıktan sonra, tekrar +37°C’deki su banyosu içinde inkube edildi, inkube edilen örneklerden distile su için 30 dakika aralarla 8 saat süre ile 1M MgSO₄, %0.85 NaCl için 2 saat aralıklarla 8 saate kadar örnekler alınarak hemen buz içinde soğutulup test edilinceye kadar +2/+8°C’de buzdolabında bekletildi. Bu süre sonunda örneklerin hepsinde titrasyon testi yapıldı. Dilüsyonlara bağlı infektivite kaybı +37°C (±5°C)’deki sulandırılmış aşılardan titre ortalamalarına dilüsyon faktörü ilave edilerek (1.7 log₁₀ TCID₅₀) +4°C’de 1 ml distile su içinde dilue edilen aşılardan arasındaki titre farkı olarak hesaplandı.

Bulgular

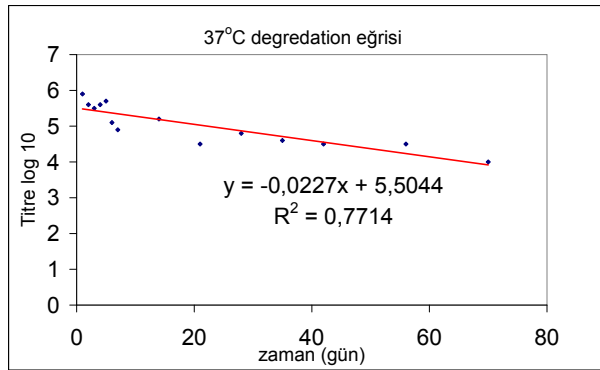
MS-TRPV BK95 VERO3 olarak kodlanan ana tohum suş ve TRPV 1/08, TRPV 2/08, TRPV 3/08 olarak kodlanan 3 seri deneme üretimi yapıldı. Ana tohum suşun infektif titresi $\log_{10}^{6.5}$ DKID₅₀/ml, TRPV 1/08, TRPV 3/08 serilerinin infektif titresi $\log_{10}^{6.0}$ DKID₅₀/ml ve TRPV 2/08 seri no'lu aşının infektif titresi $\log_{10}^{6.2}$ DKID₅₀/ml olarak bulundu. Ana tohum suş ve üç seri aşının sterilite, identifikasyon, güvenlik ve etkinlik testleri standartlara uygun bulundu.

Liyofilize formundaki aşının stabilite testi: Liyofilize aşının stabilite değerlendirilmesinde +4°C ve -20°C'de saklanan aşılarda, 19 ayın sonunda infektif titrede hiç düşme olmadığı tespit edildi. 37°C, 42°C, 45°C ve 56°C'de saklanan aşılardan belirli periyotlarla alınan örneklerin infektif titre değerleri ile yapılan regresyon analizleri ise Şekil 1'de gösterilmiştir.

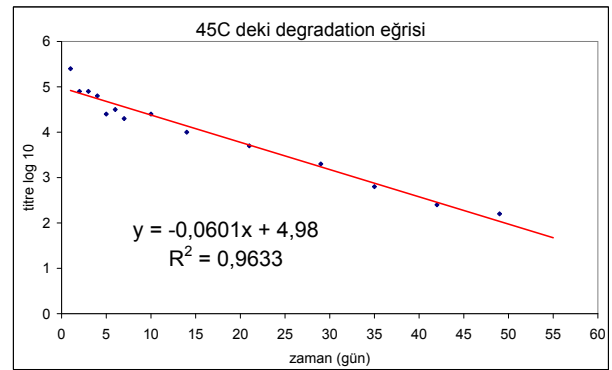
Regresyon analizi, 7'nci güne kadar infektif titrede hızlı bir düşüş olduğundan, 37°C, 42°C ve

45°C'de 7'nci günden sonraki değerler üzerinden yapılırken, 56°C'de 1'inci günden itibaren hesaplandı. Regresyon değerleri baz alınarak yapılan hesaplamalarda düzeltilmiş raf ömrü 37°C'de 40 gün, 42°C'de 19gün ve 45°C'de 8.5 gün olarak bulundu. Aşının yarılanma ömrü ise 37°C'de 12 gün, 42°C'de 6.5 gün ve 45°C'de 5.3 gün olarak bulundu. Farklı dört ısı derecesi ile elde edilen değerler Tablo 1 ve Şekil 2'de özetlenmiştir. Yapılan Arrhenius eğrisi sonucu $R^2=0.99$ ve $K=4.7$ ile iyi bir linearite göstermiş olup, +4°C'deki yarılanma ömrü 21 yıl olarak bulunmuştur.

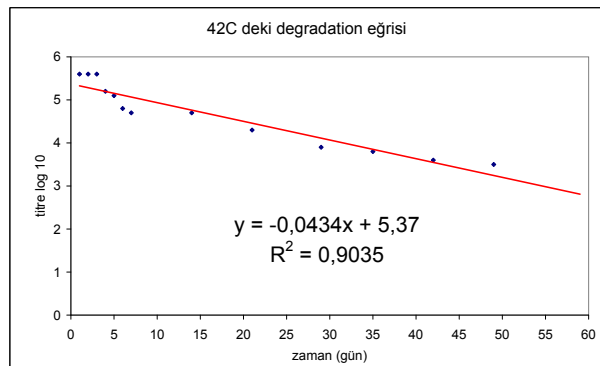
Sulandırılmış aşının stabilite testi: Farklı sulandırma sıvıları ile sulandırılmış aşılardan 37°C'de bekletildiğinde infektif titrelerindeki düşme değerleri (canlılık eğrisi) Tablo 2 ve Şekil 3'de \log_{10} bazında gösterilmiş olup, yarılanma ömrü olarak 0'ıncı saatteki infektif titresinin yarılandığı zaman baz alınmıştır. Magnezyum sülfat ve fizyolojik tuzlu su arasında önemli bir fark bulunmazken distile suda değerler düşük bulunmuştur.



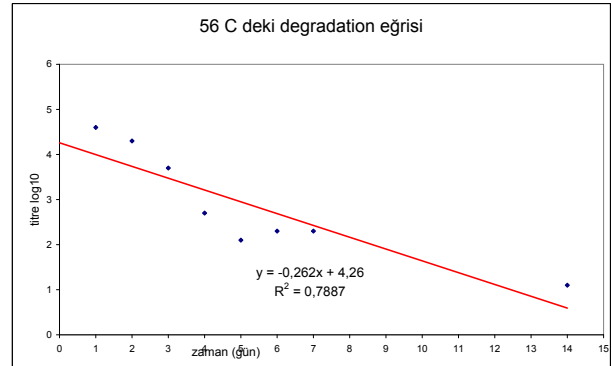
A



B



C



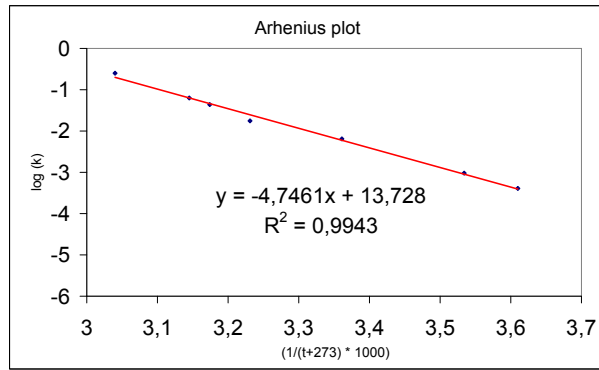
D

Şekil 1. Liyofilize TRPV aşısının A. 37°C, B. 45°C, C. 42°C ve D. 56°C'deki azalma eğrileri.

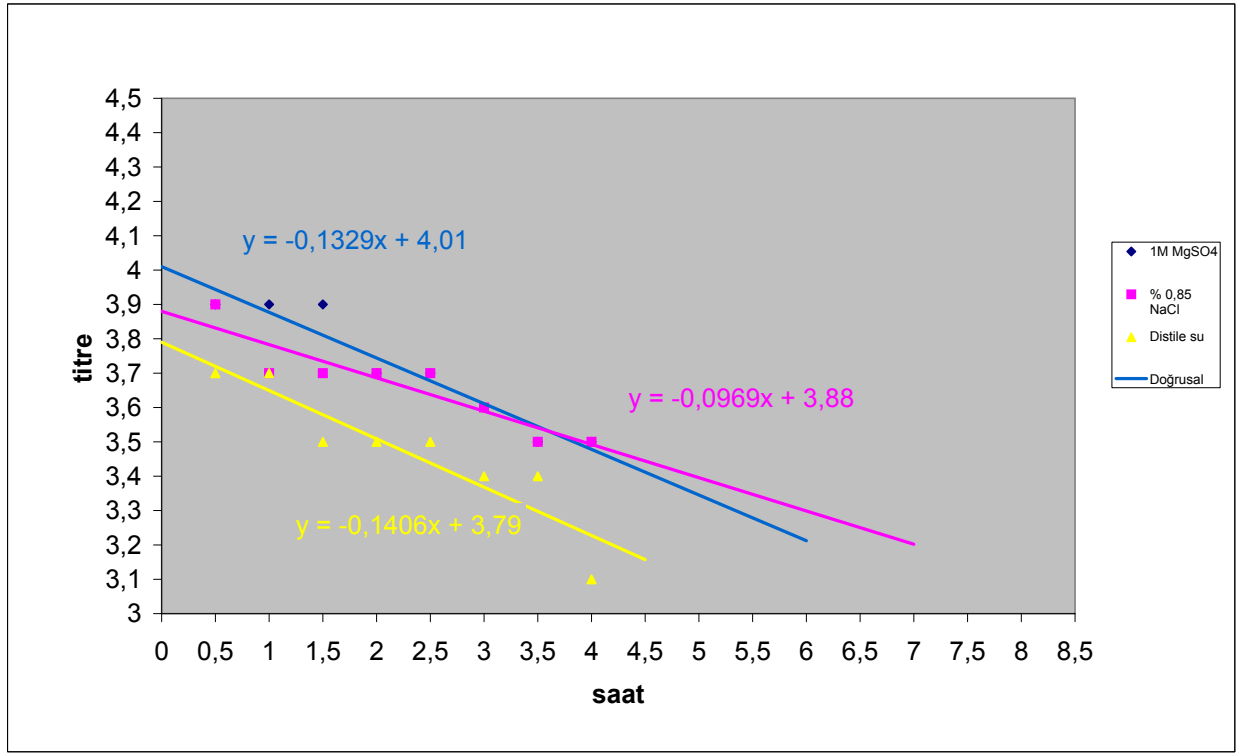
Tablo 1. Arrhenius eğrisi kullanılarak hesaplanan aşının stabilite değerlerinin özeti.

Isı (°C)	n ¹	Deneysel k ^{2,3}	Raf ömrü ⁴	Hesaplanmış k ⁵	Yarı ömür ⁶
4	-	-	-	0.000039	21 yıl
10	-	-	-	0.000092	9 yıl
25	-	-	-	0.0061	49 gün
37	10	0.0227	40.1 gün	0.0247	12 gün
42	6	0.0434	19 gün	0.0461	6.5 gün
45	8	0.06	8.5 gün	0.0568	5.3 gün
56	7	0.26	2.1 gün	0.199	1.5 gün

¹Örnek sayısı; ²k=gözlemlere dayanan verilerle hesaplanmış degradasyon sabiti; ³37°C, 42°C, 45°C azalma eğrisi için linear regresyon 7'nci günden başlamaktadır, 56°C için analiz 1'inci günden başlamaktadır; ⁴Düzeltilmiş raf ömrü, 10^{4.5} DKID₅₀/ml 100 doz minimum gerekli titre kabul edilerek düzenlenen azalma eğrisinin regresyon çizgisinden hesaplanmıştır; ⁵Düzeltilmiş k değerleri Arrhenius eğrisi linear regresyon analizinden elde edilmiştir; ⁶Yarılma ömrü düzeltilmiş k değerinden hesaplanmıştır; ** p<0.01 *** p<0.001.

**Şekil 2.** Dört ısı derecesindeki (56°C, 45°C, 42°C, 37°C) azalma sabit değerleri temel alınarak düzenlenen Arrhenius eğrisi grafiği.**Tablo 2.** Farklı sulandırma sıvıları ile sulandırılmış aşının 37°C'de stabilite testi.

	MgSO ₄ (Log ₁₀ DKID ₅₀ /ml)	NaCl (Log ₁₀ DKID ₅₀ /ml)	Distile su (Log ₁₀ DKID ₅₀ /ml)
1 ml içinde sulandırılmış aşının titresi	6.0	6.0	6.0
100 ml aşıda ilk titre kaybı	0.54	0.70	1.09
Süre (h)			
0.5	3.9	3.9	3.7
1	3.9	3.7	3.7
1.5	3.9	3.7	3.5
2	3.7	3.7	3.5
2.5	3.7	3.7	3.5
3	3.6	3.6	3.4
3.5	3.5	3.5	3.4
4	3.5	3.5	3.1



Şekil 3. Farklı sulandırma sıvıları ile sulandırılmış aşının 37°C'deki azalma eğrileri.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, primer dana böbrek (PDB) hücre kültüründe 95'inci pasajdaki sığır vebası Kabate O suşu (KABATE O RP-Pirbright V19/13/92 BK 95) vero hücre kültürlerinde 3 pasaj gidilerek 98'inci pasajda vero hücrelerine adapte ana tohum virus stokları oluşturuldu. Vero hücrelerine adapte sığır vebası virusunun titresi OIE normlarına göre değerlendirildi. Vero hücrelerine adapte termostabil RP aşısı üretimi konusunda yapılan çalışmada da Mariner ve ark. (12) primer dana böbrek hücre kültüründeki RP virusu, vero hücrelerinde 3 seri pasaj sonrası adaptasyonunu sağlamışlar ve vero hücrelerine adapte sığır vebası virusunun titresini OIE normlarına göre değerlendirmişlerdir.

RP aşısının deneme üretimini yaptığımız bu çalışmada stabilizatör olarak %5 laktalbumin hidrolizat ve %10 sukroz kullanıldı. Benzer amaçlı yapılan pek çok çalışmada, raf ömrünü uzatmak ve termostabiliteyi sağlamak amacıyla Morbillivirus grubu etkenlere karşı geliştirilen attenuue liyofilize viral aşılarda farklı stabilizatörler denenmiş ve bu çalışmalar sonunda, %5 laktalbumin hidrolizat ve %10 sukroz uygun bulunarak önerilen stabilizatör-

ler arasında yer almıştır (8). Plowright ve ark. (15) LS ile stabilize edilmiş RP aşısında 37°C'de günlük 0.0139 log₁₀ kayıp ile farklı 5 eğri değerinde başarılı bulmuştur. Mariner ve ark. (11) LS, (1:1, 3:1, 4:1) BUGS ve LGS gibi farklı stabilizatörlerle termostabil RP aşısı üretimini denemiş ve araştırma sonucunda iyi bir linearite gösteren LS stabilizatörü ile 33 güne kadar yüksek titre elde edildiğini bulmuşlardır. Termostabiliteyi sağlamak amacıyla bu çalışmamızın ana metodu olan liyofilizasyon aşamasında Mariner (12)'in önerdiği şekilde 100 milli Torr vakum altında, ana kuruma safhası 30°C'de 16 saat süren ve final raf ısısı 35°C olan 74 saat süren liyofilizasyon metodu kullanılmıştır. Liyofilizasyon sonunda aşı şişelerindeki %100 vakum, %2.5 nem oranı ve homojen krem renkteki aşı peleti görünümü ve liyofilizasyon öncesi infektif titre ile liyofilizasyon sonrası infektif titre arasındaki titre kaybının ortalama 0.18 olması liyofilizasyonun başarılı olduğunu göstermektedir. Mariner ve ark.(12) LS stabilizatör ile farklı liyofilizasyon metodlarını denemişler ve çalışmamız için örnek aldığımız liyofilizasyon metodunu başarılı bulmuşlardır. Sarkar ve ark. (18) PPR aşısında termostabilite için yaptıkları çalışmada geleneksel liyofilizasyon metodlarının yerine

Mariner (12)'in önerdiği ve OIE (2), standartlarında termostabil aşı üretimi için önerilen 74 saat süren liyofilizasyon metodu ile daha iyi sonuç elde edebileceklerini bildirmişlerdir. Geçmişten günümüze kadar yapılan aşılardaki termal inaktivasyon ve stabilite çalışmalarında araştırmacılar hızlandırılmış stabilite test ve raf ömrü belirlenmesi içinde Arrhenius eğrisini kullanmışlardır (4). Allison ve ark. (1)'da kızamık virusu aşısının stabilite değerlerini hesaplamada Arrhenius eğrisini kullanmıştır. Aynı şekilde Mariner ve ark. (11) RP aşısının stabilite değerlerini Arrhenius eğrisi ile belirlemişlerdir. Bu çalışmada da hızlandırılmış stabilite test ve raf ömrü belirlenmesi için Arrhenius eğrisi kullanıldı. Deneme aşımızın yarılanma ömrünü belirlemek için daha önce Mariner ve ark. (9, 11)'nın belirttiği şekilde ve OIE (2), standartlarına göre aşının orijinal titresinin yarıya düştüğü zaman temel alındı. Yaptığımız stabilite testi sonucu elde ettiğimiz değerler diğer araştırmacıların bulduğu değerlerle paralellik göstermektedir (11). Raf ömrü farklı ısılarda yapılan stabilite testi 37°C'de 40 gün, 42°C'de 19 gün ve 45°C'de 8.5 gün olarak bulundu. Elde edilen bulgular uyguladığımız liyofilizasyon metodu ve kullandığımız stabilizatörün aşının infektivite gücünü yüksek ısılarda dahi uzun süre korumasını sağladığını göstermektedir. Bu yöntemle üretilen sığır vebası aşısı araştırmamızın hedefi olan saha şartlarında soğuk zincire gerek duyulmadan raf ömrü 30 günden fazla (37°C'de 40 gün) olmaktadır. Arrhenius eğrisi sonucu +4°C ve -20°C aşımızın raf ömrününün 20 yıldan çok olduğu belirlenmiş olup, acil stok olarak saklama durumunda uzun yıllar infektivite gücünü koruyacağını göstermektedir. Uyguladığımız bu yöntemle RP aşısı üretildikten sonra stok yenilenme işlemini ortadan kaldıracığı için ülke ekonomisine katkı sağlayacaktır. Mariner ve ark. (10) aynı metotla ürettikleri termostabil sığır vebası aşısını soğuk zincire gerek duymadan 30 gün boyunca Nijerya'daki sığırlar üzerinde 1988 yılındaki aşılama kampanyasında saha şartlarında denemiş ve başarılı sonuç (%98 seropozitif) almıştır. Çalışmamızdaki metotla üretilen aşıda raf ömrü, 37°C'de ve karanlık ortamda 30 günden fazla bulundu. Türkiye şartlarında sıcak mevsimlerde ortalama hava sıcaklığı 37°C olup bazı bölgelerde 40°C'nin üzerine çıkmaktadır. Bu şartlarda aşırı yüksek sıcaklarda ve güneş ışığından korunduğu durumlarda ayrıca ilk 7 günde infektif titredeki hızlı düşüş göz önüne alınarak bu amaçla üretilen aşılarda başlangıç titresinin en az $10^{6.5}$

DKID₅₀/ml 100 doz olması durumunda aşımızın raf ömrü saha şartlarında soğuk zincire gerek kalmaksızın 1 ay olacaktır.

Değişik dilüentlerle yapılan stabilite çalışması sonucu 1M MgSO₄, %0.85 NaCl uygun dilüent olarak tespit edilmiş olup bu bulgular diğer araştırmacıların bulgularıyla benzerlik göstermektedir (11, 15). Sarkar ve ark. (18) LS stabilizatör ile hazırlanmış PPR aşısının 37°C'de karanlıkta bekletilmiş 1M MgSO₄ ve %0.85 NaCl içinde sulandırılması sonucunda 8 saate kadar önemli bir titre kaybı olmadığını bildirmişlerdir. Diğer araştırmacıların önerileri ve bizim araştırmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre 1M MgSO₄ ve %0.85 NaCl'nin her ikisi de dilüent olarak uygun bulunmuş olup, vero hücrelerine adapte termostabil sığır vebası aşısı için dilüent olarak %0.85 NaCl seçilmiştir.

Araştırmamız sonunda elde edilen bulgular ve diğer araştırmacıların önerileri doğrultusunda vero hücrelerine adapte termostabil sığır vebası aşısı; stabilizatör olarak %5 laktalbumin hidrolizat ve %10 sukroz kullanılıp, uyguladığımız liyofilizasyon metodu ile liyofilizasyon işlemi gerçekleştirilerek düşük nem ($\leq 2\%$) ve yüksek başlangıç titresini ($\geq 10^{6.5}$ DKID₅₀/ml), liyofilizasyon sırasında düşük titre kaybı ($\leq 10^{0.18}$ DKID₅₀/ml) elde edilerek sahada soğuk zincire gerek duymadan 1 ay kullanılabilir olacaktır. -20°C'de stok aşısı olarak saklandığında yıllarca stok yenilemeye gerek duyulmayacak ve dilüent olarak %0.85 NaCl kullandığında sulandırılmış aşısı sıcak mevsimlerde dahi 4 saate kadar güvenle kullanılabilir olacaktır.

Kaynaklar

1. Allison LMC, Mann GF, Perkins FT, Zuckerman AJ, (1981). *An accelerated stability test procedure for lyophilized measles vaccines*. J Biol Stand. 9, 185-194.
2. Anonim (2008). *Rinderpest*. In; OIE Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccines Chapter 2.1.15. www.oie.int/fr/normes/mmanual.
3. Asım A, Rashid A, Choudhary H, (2008). *Effect of various stabilizers on titre of lyophilized live attenuated Peste Des Petis Ruminants (PPR) Vaccine*. Pakistan Vet J. 28(4), 203-104.
4. Colinet G, Peetermans J, (1982). *Behavior of five commercial measles vaccines in an accelerated stability test*. J Biol Stand. 10, 241-247.
5. House JA, Mariner JC, (1996). *Stabilization of rinderpest vaccine by modification of the lyophilization process*. Dev Biol Stand. 87, 235-244.

6. Ihsak R, Howard CR (1990). *Thermal stability of yellow fever vaccines*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 85(3), 339-345.
7. İyigören B, Ünlü M, Yonguç AD, (1973). *Doku Kültürü Sığır Vebası Aşısı Uygulanan Bölgelerdeki Sığırların Bağışıklık Durumu Üzerine Araştırma*. Etlık Vet Bak Ens Derg. 4(3-4), 11-19.
8. Languet B, Precausta P, Mackowiak M, Dubourget P, Reynaud G, Duret C (1985). *Freeze dried vaccine against rinderpest: stability and activity study*. Comp. Immunol. Microbiol Infect Dis. 8(3-4), 285-295.
9. Mariner, JC, House JA, Sollod AE, Stem C, Van Den Ende MC, Mebus CA, (1989). *Heat Stable Rinderpest Vaccine Implementation Project*. Recommendations Adopted by The Pan African Rinderpest Campaign (PARC) at The Informal Meeting on Thermostable Vaccines Held at The International Office of Epizootics, Paris, France, September. 21-22, 1989.
10. Mariner, JC, House JA, Salifou S, Stem C, Van Den Ende MC, Mebus CA, (1990). *The serological response to a thermostable vero cell-adapted rinderpest vaccine under field conditions in Niger*. Vet Microbiol. 22(2-3), 119-127.
11. Mariner, JC, House JA, Sollod AE, Stem C, Van Den Ende MC, Mebus CA, (1990). *Comparison of the effect of various chemical stabilizers and lyoflization cycles on the thermostability of a vero cell adapted rinderpest vaccine*. Vet Microbiol. 21(3), 195-209.
12. Mariner, JC, House JA, Sollod AE, Stem C, Van Den Ende MC, Mebus CA, (1991). *Production of a thermostable vero-cell adapted rinderpest vaccine*. J Tiss Cult Meth. 13, 253-256.
13. Mariner, JC (1993). *The use of thermostable vero cell-adapted rinderpest vaccine as a heterologous vaccine against peste des petits ruminants*. Res Vet Sci. 54, 212-216.
14. Plowright W, Ferris RD (1962). *Studies with Rinderpest Virus in Tissue Culture. The use of Attenuated Culture Virus as a vaccine for Cattle*. Res Vet Sci. 3, 172-182.
15. Plowright W, Herniman KAJ, Rampton CS, Taylor WP (1970). *Studies on Rinderpest Culture Vaccine. III. Stability of The Lyophilised Product*. Res Vet Sci. 11, 71-81.
16. Plowright W, Herniman KAJ, Rampton CS (1971). *Studies on Rinderpest Culture Vaccine. IV. The Stability of Reconstituted Product*. Res Vet Sci. 12, 40-46.
17. Raut A, Singh RK, Malik M, Joseph MC, Bakshi CS, Suryanarayana V VS, Butchiah G (2001). *Development of a thermoresistant tissue culture Rinderpest vaccine virus*. Acta Virol. 45, 235-241.
18. Sarkar J, Sreenivasa BP (2003). *Comparative efficacy of various chemical stabilizers on the thermostability of a live-attenuated peste des petits ruminants (PPR) vaccine*. Vaccine 1. 21(32), 4728-4735.
19. Siddique MP, Rahman MB, Chowdhury SMZH, Kafi MA, Alam MS (2006). *Deterioration of efficacy of thermostable PPR live homologous vaccine incubated at room temperature or 14 Days*. Bangl J Vet Med. 4(1), 43-46.
20. Sütçü M, Erdem H (1976). *Dana böbrek hücre kültüründe attenué sığır vebası virusu üretimi aşı hazırlanması ve hazırlanan aşuların laboratuvar ve bağışıklık kontrolü sonuçları*. Vet Hekimler Dern Derg. 46(7-8-9), 34-35.
21. Tsukiyama K, Yoshikawa Y, Kamata H, Imaoka K, Asano K, Funahashi S, Maruyama T, Shida H, Sugimoto M, Yamanouchi K (1989). *Development of heat-stable recombinant rinderpest vaccine*. Arch Virol. 107, 225-235.
22. Woese C (1960). *Thermal inactivation of animal viruses*. Ann N Y Acad Sci. 83, 741-751.
23. Worrall EE, Litamoi JK, Seck BM, Ayelet G (2000). *Xerovac: an ultra rapid method for the dehydration and preservation of live attenuated Rinderpest and Peste des Petit ruminants vaccines*. Vaccine, 22; 19(7-8), 834-839.