

**BÜYÜK MİKYASTA ŞAP VİRUSU İSTİHSALİNDE BHK - 21
(YAVRU HAMSTER BÖBREĞİ) HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN
KULLANILMASI ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR (*)**

**G. OKAY, — H. C. GIRARD, — M. SÜTÇÜ, — M. ŞENTÜRK, — M. ORAL,
C. BOZ, — O. BAYRAMOĞLU, N. YALIM, N. ÜNLÜBLEBİCİ**

Şap Enstitüsü, P. K. 714, Ankara

Zamanımızda hazırlanan inaktive Şap aşıları :

- 1) Canlı sığır enfekte dil epitelinin elde edilen (Tabii virusla).
- 2) Sığır dili epitelinin canlı kısımlarında üreyen virusla, (Frenkel Kültür virusu).
- 3) Dana veya domuz böbrek hücrelerinde üretilen virusla, (Böbrek Kültürü virusu); elde edilmektedir.

Bu her üç metodla tesirli aşılar hazırlanmaktadır. Bununla beraber bu üç metod da sığır veya genç dana temini gibi faktörlerle sınırlıdır. Kesimin bilhassa mevsime bağlı olduğu memleketimizde, bu husus, daha büyük bir ehemmiyet kazanmaktadır.

Netice olarak; lâboratuvarların, sığır kesimine veya bir çift böbrek için bir buzağı mübayaasına bağlı kalmaksızın, çalışabilmesini temin edecek bir teknik İngiltere'nin Pirbright lâboratuvarında geliştirilmiş bulunmaktadır. Bu teknik, Baby Hamster Kidney (BHK - 21) Cell line (Yavru Hamster Böbrek Hücre dizisi) nin Şap virusu istihsalinde kullanılmasıdır.

Bu hücrenin sonsuz üreme kabiliyetine ilâveten :

- a) Şap virusuna hassas olduğu Mowat ve Chapman (11),

(*) Bu çalışma Ankara Veteriner Şap Enstitüsünde yapılmıştır.

b) Derin Suspansiyon kültüründe ürettiği Capstick, Telling, Chapman ve Stewart (6).

c) Tümör doğurma kapasitesinin münhasıran hamsterlere olduğu ve, bunun ancak, herhangi bir muameleye tabî tutulmamış canlı hücreler vasıtasıyla meydana getirilebildiği Capstick ve Garland (4); Kane, Pay ve Bracewell (8); tarafından gösterilmiş ve Keeble ve Heymann (9); Ubertini, Nardelli, Dal Prato, Panina ve Barei (18); ve Segura ve Rivenson (16) tarafından da teyid edilmiştir.

Bunlara ilâveten; Rivenson ve Segura (14); Polatnick ve Bachrach (13) BHK hücrelerini döner (Rolling) yuvarlak şişelerde üreterek bunlardan yüksek titreli viruslar elde etmişlerdir. Ayrıca, Amighi (1); Nottebohm ve arkadaşları (12); Bengelsdorff ve Schneider (2); Schneider, Jaeger ve Bengelsdorff (15) da BHK-21 hücrelerinde üretilmiş virus ile tesirli inaktive Şap aşuları hazırlamışlardır.

Son olarak Mammerick ve Leunen (10) BHK-21 hücrelerini önce suspansiyon kültüründe sonra rolling sistemde monolayer olarak üreterek, bundan aşular hazırlamışlardır.

İki seneden beri biz de, lâboratuvarımızda, BHK hücre kültürü tekniğini geliştirmek ve aşı istihsalinde kullanmak için çalışmaktayız.

Burada bildireceğimiz hususlar, hücrenin monolayer tekniği ile sabit kültür şişelerinde, suspansiyon tekniği ile Bellco ve New Brunswick fermentörlerinde üretildikten sonra rolling sistem yuvarlak şişelerde hücrenin virusla enfekte edilmesi ve bu virusun aşı istihsalinde kullanılmasıdır.

Çalışmalarımız, kullanılan üretme vasatı hariç olmak üzere, Brescia (İtalya) Lâboratuvarının tekniğine uymaktadır.

M A T E R Y A L

V A S A T L A R

1) Üretme vasatı (HYL)

% 0.5 Lactalbumin hydrolysate ve % 0.01 Yeast Extract ihtiva eden Hanks' Dengeli Tuz Solusyon'udur. (pH 7.3)

Suspense hücre çalışmalarında bu vasata % 1 nisbetinde Trypsin ve Phosphate Broth ilâve edilmektedir.

2) Hücre pasajı için Trypsin ve Versene Solusyonu :

% 1 Trypsin ve % 1 Versene ihtiva eden Hanks' Dengeli Tuz Solusyonudur. pH 7.5)

3) Antibiyotikler :

Gerek üretme vasatı gerekse Trypsin, versene solusyonuna herbir litre için 100.000 ünite penicillin, 0.1 gram streptomycin, 200.000 ünite colimycin ve 50.000 ünite mycostatin ilâve edilmektedir.

4) Hücre Sayımı için % 0.5 lik Trypan bleu kullanılmaktadır.

M E T O D

HÜCRELERİN MUHAFAZASI

BHK Tohum Hücresi suspense veya monolayer halinde üreyen kültürlerden 3.0×10^6 /ml olacak şekilde, her tüpte 10 ml, % 10 glycerin, % 10 Sığır Serumunu ihtiva eden HYL vasatı içinde -70 °C Revco Ultra Deep - freezer'de saklanmaktadır. Bu şekilde hücreler 2-3 ay müddetle emniyetle saklanabilmekte, ölüm nisbeti çok az olmaktadır.

DONDURULMUŞ HÜCRELERİN ÇÖZDÜRÜLÜP HÜCRE KÜLTÜRÜNDE KULLANILMASI

Monolayer Hücre Kültürü :

— 70 °C lik Deep - freezer'den çıkarılan 10 ml. lik donmuş hücre suspansiyonu 37 °C lik su banyosunda çözündürüldükten sonra 100 ml % 10 serumlu HYL vasatında sulandırılır ve Roux şişesinde 37 °C lik etüvde üremeye bırakılır. 18-20. saatte glycerin ihtiva eden vasat dökülerek, yerine % 10 serum ihtiva eden HYL vasatı konur. 2-3 günde hücre üreyerek şişe sathını tamamiyle kaplar.

Bu hücreler trypsin, versene solusyonu ile şişe sathından ayrılır, santrifüj edilmeksizin % 10 serum ihtiva eden üreme vasatı ile karıştırılarak Bellco Suspanse Kültür cihazına aktarılır.

Suspansiyon Hücre Kültürü :

Genel olarak 2 Roux şişesinden alınan hücreler 400 ml vasat ihtiva eden Bellco cihazı (1500 ml kapasiteli) için tohum hücre olarak kullanılır.

Bellco cihazı içindeki hücre suspansiyonu, teflon kaplı mağnetik çubuk vasıtasıyla, 36.5 °C lik su banyosunda dakikada 300 devir yapacak şekilde alttan döndürülmektedir. Bu maksat için 8 adet Bellco cihazını aynı anda çalıştırabilen su banyosunu kullanmaktayız.

Bellco cihazında serî pasajlarla çoğaltılan hücreler fermentörlerde hücre üretilmesi için tohum olarak kullanılmaktadır.

Elimizde mevcut cihaz 5 ve 10 litrelik fermentörleri havi (New Brunswick Scientific Co., U.S.A.) tarafından çizilmiş orijinaline yakın ve Brescia, İtalya'da F. Davini ve Pluda firması tarafından yapılmıştır.

Fermentörler içindeki hücre suspansiyonu, 36.5 °C lik su banyosunda, üstten, dakikada 350 devirle dönen bir mil tarafından karıştırılmaktadır.

Fermentörlerde üretime genellikle 5.0×10^4 hücre/ml olarak başlanılmakta ve 5 litre kapasiteli fermentörde 3.5 litre, 10 litrelik fermentörde ise 7 litrelik hücre suspansiyonu ile çalışılmaktadır. 24 üncü saatten itibaren süperfisiyal olarak steril hava verilmekte ve vasatın pH'sı 7.2 - 7.4 arasında tutulmaktadır. Keza 24 üncü saatte % 1 miktarında Tryptose Phosphate Broth ilâve edilmektedir.

Enkubasyonun 48.inci saatinde toplanan hücre bir gece + 4 °C de bekletilerek çöktürüldükten sonra üsteki vasat atılmakta ve hücre 1 ml de 50.000 olacak şekilde % 10 sığır serumlu HYL vasatında sulandırılarak, otomatik tevzi cihazı (Filmatic Filler, National Instrument Co., Baltimore, U.S.A.) ile 1 litre kapasiteli rolling sistem şişelerine 150 ml olmak üzere tevzi edilmektedir.

3 günde hücreler şişe sathını tamamen kaplıyacak şekilde üremektedir. Bu süre içinde vasat değiştirilmemektedir.

Rolling Şişelerde Virus İstihsalı

Hücre üremesi şişe sathını tamamen kapladığında, şişedeki vasat boşaltılmakta ve 0.1 TCD₅₀ virus/hücre olacak şekilde virus ilâve edilen HYL vasatı herbir şişeye 100 ml tevzi edilmektedir.

Kullanılan virus tipine göre (7) enkubasyonun 24 - 30 uncu saatlerinde toplanmaktadır.

Çalışmalarımızda A₂₂ tipi Şap virusu kullandığımız için toplama zamanı 30 saat olarak ayarlanmıştır.

Tohum virus olarak Dana Böbreğine ve BHK Hücrelerine (5 - 6 pasajda) adapte edilmiş virus kullanılmış, her ikisi arasında CPE ve elde edilen aşı virusunun enfektivite ve antijenitesi yönünden büyük bir fark görülmemiştir.

Titrasyonlar

a) Enfektivite :

Virusların enfektiviteleri tüplerde üretilen BHK Hücre Kültüründe virusun cyto - pathique lezyon göstermesi ile değerlendirilmiştir.

b) Antijenite :

Virusun ARCTON 113 (fluorocarbon) ile muamele edilmeden (AT) ve edildikten sonraki (ATAT) antijenik titreleri Semi - kantitatif Complement - Fixation test'i ile yapılmıştır.

AŞI

a) Hazırlama :

Virusî mayi önce % 1 nisbetinde Chloroform ile karıştırılıp, bir gece + 4 °C de bekletilip santrifüj edilmiş, bunu takiben % 0.6 Chloroform ile karıştırılıp tekrar + 4 °C de bir gece bekletildikten sonra, santrifüjü müteakip Seitz K - 5 Klarifikasyon filtre kâğıdından süzölmüştür. Bu işlemlerden sonra % 0.05 nisbetinde Formol ile 26 °C de 48 saat müddetle inaktive edilerek % 10 Saponin'den herbir doz için 0.25 ml olmak üzere karıştırılarak bir sığır dozu aşısı 5 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

b) Epruvasyon :

Herbir seri aşının epruvasyonu memleketimizin hastalık bulunmayan yerlerinden temin edilen ve antikor taşımayan üç baş danada yapılmıştır. Aşılı hayvanlarla birlikte iki baş dana da kontrol hayvanı olarak kullanılmıştır.

Aşılamaı takip eden 21 inci günü aşılana ve kontrol olarak kullanılan hayvanlar tabii virusun enfektivitesine göre hazırlanan ve 0.1 ml sinde 10.000 LD₅₀ ihtiva eden virus dilusyonu ile intra-dermo-lingual yolla 2. noktaya inokule edilerek epruve edilmişlerdir.

NETİCELER

a) Hücre :

BHK - 21 hücresinin suspanse olarak Bellco cihazı ve New Brunswick fermentörlerinde, 48 saatte, başlangıç hücre sayısına (5.0 X 10⁴/ml) nisbetle ortalama 5 misli üreyerek 2.5 X 10⁵ hücre/ml elde edilmektedir.

b) Aşı virusu :

Aşı virusunun enfektivite (IT) ve antijenik (AT) ve Arcton 113 ile muamele edildikten sonraki (ATAT) antijenik titreleri Tablo I de gösterilmiştir.

c) Epruvasyon :

Epruvasyon neticeleri (Tablo : 1) de gösterilmiştir. Bu netice-
aşılamaın hayvanlarda % 100 bağışıklık doğurduğunu göstermektedir.

MÜNAKAŞA

BHK hücrelerinin üretilmesinde İran, Razi Enstitüsü Direktörü Dr. Kaveh tarafından tavsiye edilen HYL vasatını kullandık. Bir süre Yeast Extract kullanmaksızın hücre üretmeye çalıştık, fakat muvaffak olamadık. Yeast Extract ilâvesinden sonra hücre üretiminde herhangi bir güçlükle karşılaşmadık.

Sabit kültürlerde 20 - 30.000 hücre/ml ve Rolling sistemde 50.000 hücre/ml başlangıç hücre sayısı ile, hücre kültürünün, şişe sathını üç gün içinde tamamiyle kapladığı görüldü.

Monolayer (Tek satır) üreyen bu hücreyi suspansiyon kültüründe üretmek için önce Bellco cihazında, sonra New Brunswick fermentörlerinde denemeye başladık ve suspansiyon kültür serisi pasajlarına devam ettik.

Bu arada değişik başlangıç hücre konsantrasyonları üzerinde çalıştık. 50 - 60.000 hücre/ml olarak başladığımızda 4-6 misli üreme elde ettiğimiz halde, 100 - 120.000 hücre/ml ile başladığımızda 2 - 3 misli üreme elde edebildik. Kullandığımız vasatın besi değeri ve tampon gücü zayıf olması ile başlangıç hücre sayısının fazla olduğu hallerde, yani ikinci durumda, pH kontrolü güçleştiği gibi; kanaatimizce, vasattaki besi değeri hücrenin daha fazla çoğalmasına yetecek kadar değildi. Bu durumu telâfi edebilmek için üremenin 24 üncü saattında % 1 miktarında Tryptose Phosphate Broth ilâve ettikse de genellikle fazla üreme elde edemedik.

Tryptose ilâvesine devam ederek, suspansiyon hücre kültürüne 50.000 hücre/ml olarak başlamayı tercih ettik.

Mevcut Rolling sistem etüvümüzün fazla büyük olmaması sebebiyle 2 adet 10 litrelik fermentörden elde ettiğimiz tohum hücre etüvü dolduracak kadar hücre suspansiyonu hazırlanmasına kâfi gelmektedir.

Monolayer sistemde hücre konsantrasyonunu azaltıp çoğaltmakla üreme süresini arzu edilen zamana ayarlamak mümkündür. Meselâ dana böbrek kültüründe 6-7 gün olan üreme süresi BHK hücrelerinde 3 gün olabilmektedir.

Memleketimizde genç yaşta ve standart dana böbreği bulma güçlüğü dolayısıyla; BHK hücrelerinin cell line (Hücre dizisi) olması sebebiyle uniform karakterde oluşu da, ayrıca, virus istihsalinde bir avantaj teşkil etmektedir.

BHK hücrelerinin dondurularak saklanabilmesi ve istenildiğinde kullanılması, primer kültürde tatbiki mümkün olmayan, fevkalâde bir husustur.

Hernekadar, bütün doku kültürü metodlarında olduğu gibi BHK hücre kültürünün de titizlikle takibi gerekli olmasına rağmen primer böbrek kültüründeki böbrek işlenmesi ve uzun süre trypsin'le ekstraksiyon gibi mecburiyetler olmadığı için daha az kontaminasyon ihtimali ile çalışmak mümkündür.

(T A B L O : 1)

Virusların Enfektivite ve Antijenite Değerleri ve Aşıların Eprüvasyon Neticeleri
 (Aşı Seri No. 1 virusunun elde edilmesinde Tohum olarak Dana Böbreğine adapte, diğerlerinde ise BHK Hücrelerine adapte virus kullanılmıştır.)

Aşı Seri No. (Batch Nr.)	Virus Tip — A	IT 0.1 ml.	AT				ATAT				Eprüvasyon Neticeleri Results of challenge				
			1:2	1:4	1:6	1:8	1:2	1:4	1:6	1:8	Dil (Tongue)	Ağız (Mouth)	Ayaklar (Feet)		
1	MAP-9/BHK/9	106,5	4	4	4	3.5	4	4	2				O	O	O O O O
													O	O	O O O O
													X	O	O O O O
													Kontrol		
													X	X	X X X X
2	MAP-9/BHK/9	107,5	4	4	4	2	4	4	3.5				O	O	O O O O
													O	O	O O O O
													O	O	O O O O
													Kontrol		
													X	X	X X X X
3	MAP-10/BHK-12	106,25	4	4	4	4	4	4	4	3			O	O	O O O O
													O	O	O O O O
													O	O	O O O O
													Kontrol		
													X	X	X X X X

Son olarak, Polatnick ve Bachrach' (13) ın bildirdiği üzere aynı büyüklükte bir şişe sathında üreyen BHK hücresi, Dana Böbreği hücresinden adet olarak 5-10 misli fazla olmaktadır. Bu da aynı şartlarda, BHK hücre kültüründen Dana Böbrek Hücre kültürüne nazaran 5-10 misli virus elde edilebileceğini göstermektedir. Burada, mukayeseli çalışma yapmamış olmamıza rağmen, önceki neticelerle karşılaştırıldığında, BHK hücre kültüründen dana böbrek hücresine nazaran, genellikle, daha yüksek bir titre aldığımızı görmekteyiz.

BHK hücresinden elde edilen viruslarla hazırladığımız aşılardan sonuçları da yukarıda söylenenleri teyid eder şekildedir.

BHK viruslarıyla hazırlanan aşılardan tatbikatında, bazı ülkelerde, hayvanlarda allerjik reaksiyonlara rastlandığı bildirilmektedir. Çalışmalarımızda böyle bir durumla karşılaşmamakla beraber aşılarımızın saha tatbikatı ve bilhassa revaksinasyon neticelerini yakinen takip etmekteyiz.

SONUÇ

BHK hücresi Trptose ve serum ile takviye edilmiş HYL vasaında Suspansiyon Kültüründe üretilmekte, ve suspansiyon hücre, monolayer hücre kültürü için tohum olarak kullanılabilir.

Monolayer BHK hücre kültüründen elde edilen Şap virusu, aşı hazırlanmasına esas teşkil edecek antijenik güçtedir. Bu virusla hazırlanan aşılardan epruvasyon neticeleri tatminkârdır.

Netice olarak; bu metod, Şap aşısı istihsalinde başarı ile kullanılabilir ve ekonomiktir.

TEŞEKKÜR

BHK - 21 hücresini göndermek nezaketinde bulunan İran, Razi Enstitüsü Direktörü Dr. Kaveh'e teşekkür ederiz.

Çalışmalarımızda bizlere büyük yardımları dokunan Asistan Y. Kıvılcım, E. Şenel, H. Erdem ve Ç. Gürsoy'a teşekkürlerimizi bildiririz.

Ö Z E T

BHK - 21 Hücre Dizisi % 0.5 Lactalbumin hydrolysate, % 0.01 Yeast extract ve % 10 Sığır serumu ihtiva eden Hanks' Dengeli Tuz Solusyonu (HYL) içinde önce monolayer sabit hücre kültürlerinde üretilmiştir.

Vasattan Yeast extract çıkarıldığında BHK - 21 hücrelerini üretmek mümkün olamamış ve BHK hücrelerinin HYL vasatında üretilmesinde Yeast extract ilâvesinin şart olduğu anlaşılmıştır.

Monolayer üremeye adapte olmuş hücre Belco cihazı ve New Brunswick fermentörlerinde serî pasajlar yapılarak suspansiyon kültürüne adapte edilmiştir. Suspansiyon hücre kültürü çalışmalarında, üremenin 24. cü saatinde vasat % 1 Tryptose Phosphate Broth ile takviye edilmiştir.

New Brunswick fermentörleride pH ayarlaması 24. cü saatden itibaren 300 cc/ dakika superfisiyal steril hava verilerek yapılmıştır.

Suspansiyon kültürü çalışmalarında başlangıç hücre sayısı $1.0 - 1.2 \times 10^5$ /ml olduğu hallerde, 48 saate, 2 - 3 misli çoğalma elde edilmesine rağmen, 5.0×10^4 hücre/ml ile başlandığında ortalama 5 misli üreme elde edilmiştir. Başlangıç hücre sayısının fazla olduğu birinci durumda 24. cü saatten itibaren pH kontrolü de güçleşmiştir. Halbuki, 5.0×10^4 hücre/ml ile başlandığında superfisiyal hava vermekle pH 7.2 - 7.4 arasında tutulabilmektedir.

Rolling sistemde kültür hazırlanabilmesi için enkubasyonun 48. ci saatinde toplanan hücre suspansiyonu bir gece + 4 °C de bekletilerek hücreler dibe çöktürülmüş, ertesi günü, üstteki mayı a¹ olarak, dibe çöken hücreler % 10 sığır serumlu HYL vasatında 50.000 hücre/ml olacak şekilde sulandırılmış, 1 litre kapasiteli yuvarlak şişelere 150 ml tevzi edilerek rolling sistem etüvüne konulmuştur.

Hücrenin üreyip şişe sathını tamamen kaplaması 3 gün içinde olmaktadır. Bunu takiben şişelerdeki vasat boşaltılmış ve 0.1 TCD₅₀ virus/hücre olacak şekilde (Dana böbreğine veya BHK hücrelerine 5 - 6 pasajda adapte olmuş virus) virus ilâve edilen HYL vasatından herbir şişeye 100 ml konularak enfeksiyonun 30. cu saatinde toplanmıştır. Bu anda hücreler şişe sathından tamamen kalkmış bulunmaktadır.

Aşı istihsalinde kullanılacak bu virus önce % 1 nisbetinde chloroform'la karıştırılıp bir gece + 4°C de bekletilerek, ertesi gün, 10.000 rpm de santrifüj edilmiş; aynı işlem ikinci defa % 0.6 nisbetinde chloroform'la tekrarlanmıştır. Aşı hazırlanmadan evvel ayrıca, Seitz K - 5 klarifiye filtre kâğıdından süzölmüştür.

Virusun BHK hücrelerinde enfektivite titresi CPE test'i ile, arcton 113 le muameleden önce (AT) ve sonra (ATAT) antijenik titreleri de semi - kantitatif complement - fixation test'i ile yapılmıştır.

5 ml lik sığır aşısı dozuna 2 ml virus ilâve edilmiştir.

Aşılar formolle inaktive olup, adjuvant olarak saponin kullanılmıştır.

Virusun enfektivite ve antijenik titreleri ile eprüvasyon sonuçları çok tatminkâr olup, (Tablo : 1) de gösterilmiştir

**(STUDIES ON BHK - 21 CELL CULTURE FOR THE LARGE
SCALE PRODUCTION OF FOOT - AND - MOUTH DISEASE
VIRUS)**

SUMMARY

This study is carried out at the Foot and Mouth Disease Institute, P. K. 714 Ankara, Turkey.

BHK - 21 cell was first grown in monolayer stationary cultures using Hanks' BSS containing 10 % bovine serum, 0.01 % yeast extract, and 0.5 % lactalbumin hydrolysate (HYL).

These cells did not grow in Hanks' lactalbumin medium without yeast extract. So yeast extract must be considered as an essential part for BHK cell development in Hanks' lactalbumin medium.

BHK - 21 cell adapted to monolayer culture was then serially passed in Bellco apparatus and in New Brunswick fermentors to adapt to suspension culture.

HYL medium was supported with 1 % tryptose phosphate broth added at the 24th hour of culture.

The pH of the suspension, in New Brunswick fermentors, was adjusted with sterile air on the surface, after 24 hour of incubation, at the ratio of 300 cc/minute.

When the initial cell count was 1.0 to 1.2 X 10⁵/ml, the cells increased only 2 - 3 times, but when the initial cell number was only 5.0 X 10⁴/ml the increase was an average of 5 times. In the

first case, when initial cells were more concentrated, the pH was difficult to regulate at the second day of incubation, whereas, in the later case with the addition of air on the surface, the pH between 7.2 - 7.4 was easier.

The cell suspension was harvested at the 48 th hour of incubation and left overnight at + 4°C for sedimentation.

To carry out the rolling flask monolayer cell culture, the supernatant of suspended cell culture was decanted, and the cells were diluted to 50,000/ml in HYL medium containing 10 % bovine serum, then 150 ml put into each 1 litre capacity rolling flask and placed in the incubator. The confluency of the cells was almost 100 % on the 3 rd day. For virus culture, the growth medium is removed and replaced with 100 ml of HYL, without serum, containing virus (either calf kidney virus or virus adapted With 5-6 passages to BHK cells) in amount of 0.1 TCD₅₀/cell.

The virus was harvested at the 30 th hours of infection. At this time, there was a nearly complete lysis of cellular monolayer.

This vaccine virus was then treated with 1 % chloroform and kept overnight at + 4°C; the next morning it was centrifuged at 10,000 rpm in a Westfalia separator, the same treatment was repeated with 0.6 % chloroform. The virus was then filtered through Seitz K - 5 clarifying filter pad.

Infectivity titer of the virus was carried out on the BHK cell cultures grown in tubes according to the CPE of the virus, antigenicity before (AT) and after arcton 113 treatment (ATAT) were determined by semi - quantitative complement - fixation test.

5 ml cattle dose of vaccine contained 2 ml of virus.

The vaccines were formalin inactivated at 26 °C for 48 hours and contained saponin as adjuvant.

The infectivity and antigenic titers of vaccine viruses and the results of vaccine challenges were very satisfactory as shown in (Table : 1)

LİTERATÜR :

- 1 — Amighi M. (1964) : Bull. Off. Int. Epiz. 61, 934 - 944
- 2 — Bengelsdorff H. J. ve Schneider B. (1964) : Bull. Off. Int. Epiz. 61, 1197 - 1208
- 3 — Capstick P. B. (1963) : Proc. Roy. Soc. Med. 56, 1062 - 1064
- 4 — Capstick P. B. ve Garland A. J. (1965) : Bull. Off. Int. Epiz. 64, 215 - 223
- 5 — Capstick P. B., Garland A. J., Chapman W. G., ve Masters R. C. (1965) : Nature 205, 1135 - 1136
- 6 — Capstick P. B., Telling R. C., Chapman W. C. ve Doreen L. Stewart (1962) : Nature, 195, 1163 - 1164
- 7 — Girard H. C. Sütçü M., Şentürk M., Okay G., Bayramoğlu O., Ünlülehbici N., Oral M., Boz C., : Concentrated Foot and Mouth Disease Vaccine From Cell Culture. Report of the meeting of the Research group of the FAO Standing Technical Committee at the Animal virus Research Institute Pirbright 14 - 16 Sept. 1966 P. 66
- 8 — Kane G. J., Pay T. W. F., ve Bracewell C. D. (1965) : Bull. Off. Int. Epiz. 64, 225 - 230
- 9 — Keeble S. A. ve Heymann C. S. (1965) : Nature 206, 1125 - 1126
- 10 — Mammerick M. ve Leunen J. (1966) : Bull. Off. Int. Epiz. 65, 337 - 348
- 11 — Mewat G. N. ve Chapman W. G. (1962) : Nature, 194, 253 - 255
- 12 — Nottebohm A., Gaggero A. C., Gomes I. ve Cunha R. C. (1954) : Bull. Off. Int. Epiz. 61, 919 - 933
- 13 — Polatnick J. ve Bachrach H. L. (1964) : Appl. Microbiol. 12, 368 - 373
- 14 — Rivenson S. ve Segura M. (1963) : Rev. Invest. ganaderas 16, 293 - 299
- 15 — Schneider B., Jaeger O. ve Bengelsdorff H. J. (1964) : Bull. Off. Int. Epiz. 61, 1013 - 1023
- 16 — Segura de Aramburu M. ve Rivenson S. (1968) : Rev. Invest. Agropecuarias, Vol. V No. 4, 31 - 37
- 17 — Ubertini B., Nardelli L., Dalprato A., Panina G. ve Santero G. (1963) : Zbl. Vet. Med., Reihe B., 10, 93 - 101
- 18 — Ubertini B., Nardelli L., Dal Prato A., Panina G. ve Santero G. (1963) : Report of the meeting of the Research Group of the standing Technical committee at the animal virus Research Institute, Pirbright England 14 - 16 Sept. 1966 p. 55 - 65.