

BORREL METODU İLE ÜRETİLEN KOYUN ÇİÇEK VIRUSUNUN KOYUNLARDA VE DOKU KÜLTÜRLERİNDE MUKAYESELİ OLARAK TİTRASYON TESTLERİNİN SAPTANMASI (*)

Ayhan AKÇORA

Etlik Veteriner Kontrol ve
Araştırma Enstitüsü Koyun
Çiçek Laboratuvarı Şefi

Ali Demir YONGUÇ

Etlik Veteriner Kontrol ve
Araştırma Enstitüsü Doku
Kültürü Laboratuvarı Şefi

GİRİŞ

Koyun çiçek hastalığı 13. asırdanberi bilinmesine rağmen bu hastalık üzerindeki ilmi çalışmalar 16. asır sonlarına doğru başlamıştır. Fransa'da ilk defa (1578) de koyun çiçeği görülmüş ve bu hastalığa «Picotte» adı verilmiştir. Bu tarihten bir asır sonra da hastalık İtalya'da görülmüştür (13).

Hastalık etkeni variola ovinæ adı verilen ve filtreleri geçen bir virustur. Bu virus Borrel (1902) tarafından bulunmuştur. Virus çiçek püstüllerinin epitel hücreleri içinde ve kısmende hücre aralarında bol miktarda bulunur.

Hastalık, hasta koyunlardan sağlamlara solunum yoluyla, temasla veya virusla bulaşmış eşya ile intikal eder.

Dört günlük inkubasyon devresinden sonra hastalık ateşle başlar. Hasta hayvanların derecesi 41 - 41,5 a kadar yükseilir. Ateşle birlikte deride kızarıklık, ödem, püstül meydana gelir. Bu lezyonlar genellikle deride, bazan da iç organlarda yaygın olarak görülür. (6,16).

Ateşli devrede virus kanda bulunur. Kan nakli sureiyle hastalık bulaştırılabilir. Buna mukabil sindirim yoluyla bulaşma meydana getirilememiştir. (7).

(*) Bu çalışma TUBİTAK VHAG - 321 no.lu proje desteğiyle yapılmıştır.

Yurdumuzda çiçeğe karşı muhtelif derecede duyarlık gösteren koyun ırkları mevcuttur. Bunlar arasında kıvırcık ve merinoslar hastalığa en duyarlı olanlardır. Karamanlar pek az derecede duyarlık gösterirler ve hastalığı çok hafif geçirmek suretiyle portör kalabilirler. (3, 17).

Arık ve Kurtul (3) kıvırcık koyunlardan elde edilen virüsü materyalin kıvırcık, dağaç ve mor karamandaki titrelerinin 5×10^{-6} , akkaramandaki titresinin ise 10^{-5} olduğunu saptamışlardır.

Hasan Başkaya ve arkadaşları yerli karaman ve kıvırcık koyunlardan Borrel usulü ile hazırlamış oldukları virusun 1/10.000 ve 1/100.000 titrelerinde çalıştığını bildirmişlerdir. (5).

Koyun çiçek virusunun koyundan başka diğer hayvanlara ve çeşitli doku kültürlerine adaptasyonu için çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Koyun çiçek virusu ilk defa 1907 tarihinde keçilere adapte edilmiştir. İlhami Özcebe ve arkadaşları 1958 yılında koyun çiçek virusunu keçilere adapte etmişler, pasaj sayısını artırmak suretiyle virusun keçilerde yüksek titre verdiğini görmüşlerdir. (12).

İran'da Rafyi ve Ramyar (15) keçi çiçek virusunu keçilerde seri pasajlardan sonra yumurtada geliştirmiş, koyun çiçek virusu ile arasındaki yakınlığı incelemişlerdir.

Arık ve Kurtul (4) koyun çiçek virusunu embriyolu tavuk yumurtasının Corio - allantoic - membran (C.A.M.) da seri ve devamlı pasajlar yaparak 25. pasaja kadar üretmişler ve koyunlara yapılan inokulasyonda virusun canlı olduğunu ve enjeksiyon yerlerinde tipik çiçek püstüllerinin meydana geldiğini saptamışlardır.

Koyun çiçek virusunun koyun embriyo deri hücre kültürlerinde cytopathogenic effect (CPE) meydana getirerek ürettiği bildirilmiştir. (8).

Nitzchke ve arkadaşları (10) koyun çiçek virusunun koyun troid, testis ve böbrek hücre kültürlerinde kolaylıkla ürettiğini saptamışlardır.

Koyun çiçek virusu troid hücre kültürü şişelerine ekildikten 5 dakika sonra üremiştir. 72 saatte titrenin 10^{-6} ya yükseldiği, 96 saatte hücre içinde üreyen ve üredikten sonra doku kültürü vasatına geçen virüslerin her ikisinin de titrelerinin $10^{-4,6}$ olduğu bulunmuştur.

Koyun çiçek virus suşunun koyun ve kuzu testis hücre kültürlerinde kolaylıkla üreyerek 36 saat içinde CPE meydana geldiği ve titrenin 4 gün sonra en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmiştir. (11).

Koyunçiçek virusu İran'da da kuzu ve dana böbrek hücrelerine adapte edilmiş ve aşı üretimine uygun titrede bir virus hazırlanmıştır. (2).

Kullanılan bu aşı virusunun doku kültüründeki titresinin $10^{-5,5}$ ile $10^{-5,8}$ TCID/50 ml. olduğu bildirilmiştir. (1).

Plowright ve Ferris (14) koyun çiçek virusunu koyun embriyo böbreği hücre kültürlerinde üretmişler, hücrelerde donuk ve kalınlaşmış değişiklikler şekillendiğini görmüşlerdir.

Aynı araştırmacılar virusu koyun ve sığır testis hücrelerinde üretmişler, koyun testis hücrelerinde dördüncü ve beşinci günde en yüksek titreye ulaştığını tesbit etmişlerdir. Koyun testis hücresinde ürettikleri virusun doku kültüründeki titresinin 0,2 ml. de 10^{-6} , koyundaki titresinin ise 0,2 ml de 10^{-7} olduğunu saptamışlardır.

W. B. Martin ve arkadaşları (9) koyun çiçek virusunu kuzu böbreği, kuzu testisi, koyun troid ve dana böbrek hücre kültürlerinde devamlı pasajlarla 90. pasaja kadar gelmişler ve 30. pasajdan sonra bunların virulansında azalma olduğunu bildirmişlerdir.

M A T E R Y A L V E M E T O D

Koyun çiçeğine hassas 21 baş saf kan kıvırcık koyun çalışmalarda kullanılmıştır. Koyunlar Trakya bölgesinin aşılanmamış ve hastalık çıkmamış yörelerinden seçilerek tarafımızdan satın alınıp getirilmiş ve belirli bir müddet gözetim al-

tında tutularak sağlık durumları kontrol edilmiştir. Titrasyonda Borrel metoduyla üretilmiş koyun çiçek virusu kullanılmıştır.

Doku kültürü testlerinde koyun böbrek hücresi, % 10 sığır serumlu Earle besi yeri ve sulandırma solüsyonu olarak ta fosfat buffer kullanılmıştır.

METOD

Çalışmalarımız için gerekli aşı virusu Enstitümüzde mevcut koyunlarda üretilmiştir. Her koyuna fosfat buffer solusyonuyla 1/8 oranında sulandırılmış tohum virustan sağ ve sol lumbalbölgelere deri altı yoluyla 250 şer ml. inokulasyondan sonra koyunların hergün termik ve lokal reaksiyonları kontrol edildi. Beş gün sonra koyunlar kesilerek viruslu lenf ve dokuları alındı. Viruslu dokular bir gece buz dolabında bekletilip ertesi günü kıyma makinasından geçirildi. 1/3 oranında fosfat buffer solusyonuyla sulandırılıp atomikste 3 dakika homojenize edildi. —20 C° de bir gece dondurulup çözdürüldükten sonra steril tülbentten süzüldü. Aynı kaplarda toplanan viruslu lenf ve dokudan bakteriyolojik ekimler yapıldı. Bu şekilde aşı virusu hazırlandı. Buradan 5 ml. alındı.

1000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki viruslu sıvının 1/10.000 den 1/1.280.000 e kadar fosfat buffer solusyonu ile iki katlı 8 dilisyonu hazırlandı. Koyunların lumbal bölgesi traş edilip alkolle silindikten sonra her dilisyondan bir koyunun üç noktasına 0,5 ml. deri içi yolla inokule edildi. İnokulasyon noktaları damgalanmak suretiyle işaretlendi. Koyunların hergün lokal ve termik reaksiyonları kontrol edildi.

Sonuçlar aşı protokolunda belirtildiği gibi inokulasyon noktasında 8 - 11 nci günlerde şekillenen ve en az 1 cm. çapında olan püstüllere göre değerlendirildi. Ve doz minimal reaksiyon (DMR) olarak ifade edildi. Refrakter çıkan koyunlar değerlendirmeye sokulmadı.

Bilinen metoda göre işlenen koyun böbreği 40 dakika tripsinizasyondan sonra 700 RPM de 15 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı döküldü. Dipte kalan hücreler fosfat buffer solus-

yonuyla yıkandıktan sonra tekrar 700 RPM de 5 dakika santrifüj edildi. Yine üstteki sıvı atılarak dibe çöken hücreler % 10 dana serumlu Earle besi yeri ile karıştırıldı ve tüplere 1,5 ml. miktarında ekildi. Üç gün sonra tüplerin besi yeri değiştirildi. İyi üreyen hücreler testlerin yapılmasında kullanıldı.

Koyunlar için hazırlanan virus dilisyonları hücre kültüründeki titrasyonlarda da kullanıldı. Her dilisyondan üç adet iyi üremiş koyun böbrek hücresine 0,5 ml. miktarında ekildi. Kontrol olarak üç tüp kullanıldı, Tüpler bir saat etüvde inkube edildikten sonra % 3 dana serumlu Earle besi yeri katıldı, etüve kondu ve CPE yönünden 12. güne kadar her gün mikroskop altında kontrol edildi. Değerlendirmeler bu süre içinde hücrelerde şekillenen CPE durumuna göre Reed ve Muench metoduyla yapıldı.

Sonuçlar; tissue culture infective dose % 50 = TCID₅₀ ml. olarak gösterildi.

S O N U Ç L A R

Koyunlarda ve doku kültüründe titre edilen 5 seri çiçek virusundan R. 29 seri no. lu aşı virusunun titrasyonu üç koyun üzerinde yapıldı.

Tehniği yukarıda bildirilen inokulasyonlardan sonra aşağıdaki belirtiler görüldü :

Dördüncü günde beden ısısı 1 kulak nolu koyunda 41,5°C, ye, 2 ve 3 kulak nolu koyunlarda 41,6°C. ye çıktı. Beşinci günden sonra beden ısısı düşerken lokal belirtiler (Nodul, Püstül) şekillenmeye başladı.

1/320.000 dilisyonda 1 kulak nolu koyunda iki noktada püstül, 2 ve 3 kulak nolu koyunlarda üçer noktada püstül görüldü. (Tablo 1)

Püstül durumuna göre 0,5 ml. viruslu materyalde 320.000,1 ml. materyalde 2 x 320.000 = 640.000 DMR olduğu saptandı. R. 29 seri nolu aşı virusunun koyundaki titresini 1/640.000 logaritmik olarak $10^{-5,80}$ dir.

Doku kültüründe : Virus ekiminden 6 gün sonra tüplerde CPE şekillenmeye başladı. 12. günde 1/160.000 ve altındaki dilisyonlarda CPE görüldü, daha yukarıki dilisyonlarda görülmedi. Kontrol tüplerindeki hücrelerde değişme olmadı.

Bu duruma göre R. 29 seri nolu aşı virusunun koyun böbrek hücre kültürlerindeki titresi $10^{-5,65}$ TCID/50 ml. dir.

R. 30 seri no. lu aşı virusunun titrasyonu üç koyun üzerinde yapıldı.

İnokulasyondan sonra görülen belirtiler :

Dördüncü günde beden ısısı 4 ve 5 kulak nolu koyunlarda 41,2°C. ye, 6 kulak nolu koyunda 41,3C. ye çıktı. Beşinci günden sonra beden ısısı düşerken lokal belirtiler (nodül, püstül) şekillenmeye başladı.

1/640.000 dilisyonunda 4 kulak nolu koyunda bir noktada püstül, 5 ve 6 kulak nolu koyunlarda üçer noktada püstül görüldü. (Tablo 2)

Püstül durumuna göre 0,5 ml. materyalde 640.000, 1 ml. materyalde 640.000 x 2 = 1.280.000 DMR olduğu saptandı. R. 30 seri nolu aşivirusunun koyundaki titresi 1/1.280.000 ligaritmik olarak $10^{-6,10}$ dur.

Doku kültüründe : Virus ekiminden 6 gün sonra tüplerde CPE şekillenmeye başladı. 12. günde 1/320.000 ve altındaki dilisyonlarda CPE görüldü, daha yukarıkidilisyonlarda görülmedi. Kontrol tüpleri normaldi.

Bu duruma göre R. 30 seri nolu aşı virusunun koyun böbrek hücre kültüründeki titresi $10^{-5,96}$ TCID/50 ml. dir.

R. 31 seri no. lu aşı virusunun tirasyonu üç koyun üzerinde yapıldı.

İnokulasyından sonra görülen belirtiler :

Dördüncü günde beden ısısı 7 kulak no. lu koyunda 41,1°C. ye, 8 kulak nolu koyunda 41,2°C. ye, 9 kulak nolu koyunda 41,3°C. ye çıktı.Beşinci günden sonra beden ısısı düşerken lokal belirtiler şekillenmeye başladı.

1/640.000 dilisyonda 7 kulak nolu koyunda bir noktada, 8 ve 9 kdlak nolu koyunlarda da üçer noktada püstül görüldü. (Tablo 3)

Püstül durumuna göre 0,5 ml. viruslu materyalde 640.000, 1 ml. materyalde $640.000 \times 2 = 1.280.000$ DMR olduğu saptandı.

R. 31 seri nolu aşı virusunun koyundaki titresi 1/1.280.000 logaritmik olarak $10^{-6,10}$ dur.

Doku kültüründe : Virus ekiminden 6 gün sonra tüplerde CPE şekillenmeye başladı. 12. günde 1/160.000 ve altındaki dilisyonlarda CPE görüldü, daha yukarıki dilisyonlarda görülmedi. Kontrol hücreleri normaldi.

Bu duruma göre R. 31 seri nolu aşı virusunun koyun böbrek hücre kültürlerindeki titresi $10^{-5,65}$ TCID/50 ml. dir.

R. 32 seri no. lu aşı virusunun titrasyonu altı koyun üzerinde yapıldı.

İnokulasyondan sonra görülen belirtiler :

Dördüncü günde beden ısısı 10 ve 13 kulak nolu koyunlarda $41,2^{\circ}\text{C}$. ye, 14 kulak nolu koyunda $41,4^{\circ}\text{C}$. ye, 15 kulak nolu koyunda $41,7^{\circ}\text{C}$. ye, refrakter çıkan 11 ve 12 kulak nolu koyunlarda $40,6^{\circ}\text{C}$. ye çıktı. Beşinci günden sonra beden ısısı düşerken lokal belirtiler şekillenmeye başladı. Refrakter çıkan koyunlarda yalnız nodül görüldü. Bu koyunlar değerlendirmeye dahil edilmedi. Değerlendirme dört koyun üzerinden yapıldı.

1/1.280.000 dilisyonda 13 ve 14 kulak nolu koyunlarda birer noktada püstül, 10 kulak nolu koyunda iki noktada püstül, 15 kulak nolu koyunda üç noktada püstül görüldü. (Tablo 4)

Püstül durumuna göre 0,5 ml. viruslu materyalde 1.280.000, 1 ml. materyalde $1.280.000 \times 2 = 2.560.000$ DMR olduğu saptandı.

R. 32 seri nolu aşı virusunun koyundaki titresi 1/2.560.000 logaritmik olarak $10^{-6,40}$ dir.

Doku kültüründe : Virus ekiminden 6 gün sonra tüplerde CPE şekillenmeye başladı. 12. günde virusun 1/1.280.000 dilisyonunda üç tüpten bir tanesinde CPE tesbit edildi. Kontrol tüpleri normaldi.

Bu duruma göre R. 32 seri nolu arı virusunun koyun böbrek hücre kültüründeki titresini $10^{-6,31}$ TCID/50 ml. dir.

R. 33 seri no. lu aşı virusunun titrasyonu altı koyun üzerinde yapıldı.

İnokulasyondan sonra görülen belirtiler :

Dördüncü günde beden ısısı 16 kulak nolu koyunda $41,2^{\circ}\text{C}$. ye, 17 ve 19 kulak nolu koyunlarda $41,3^{\circ}\text{C}$. ye, 20 kulak nolu koyunda $41,4^{\circ}\text{C}$. ye, refrakter çıkan 18 kulak nolu koyunda $40,8^{\circ}\text{C}$. ye, yine refrakter çıkan 21 kulak nolu koyunda da $40,9^{\circ}\text{C}$. ye çıktı.

Beşinci günden sonra beden ısısı düşerken lokal belirtiler şekillenmeye başladı. 18 ve 21 kulak nolu koyunlarda derece yükselmesine rağmen püstül şekillenmediğinden değerlendirme dört koyun üzerinden yapıldı.

1/1.280.000 dilisyonunda 17, 19, 20 kulak nolu koyunlarda birer noktada püstül, 16 kulak nolu koyunda iki noktada püstül görüldü. (Tablo 5)

Püstül durumuna göre 0,5 ml. virüslü materyalde 1.280.000, 1 ml. materyalde $1.280.000 \times 2 = 2.560.000$ DMR olduğu saptandı.

R. 33 seri nolu aşı virusunun koyundaki titresini $1/2.560.000$ logaritmik olarak $10^{-6,40}$ dir. „

Doku kültüründe : Virus ekiminden 6 gün sonra tüplerde CPE şekillenmeye başladı. 12. günde virusun 1/640.000 dilisyonunda üç tüpten bir tanesinde CPE tesbit edildi. Kontrol tüplerindeki hücrelerde değişme yoktu.

Bu duruma göre R. 33 seri nolu aşı virusunun koyun böbrek hücre kültüründeki titresini $10^{-6,10}$ TCID/50 ml. dir.

Tablo : 1 — Rekolt 29 Seri No.'lu Koyun Çiçek Virusunun koyunlardaki Titrasyon Sonuçları.

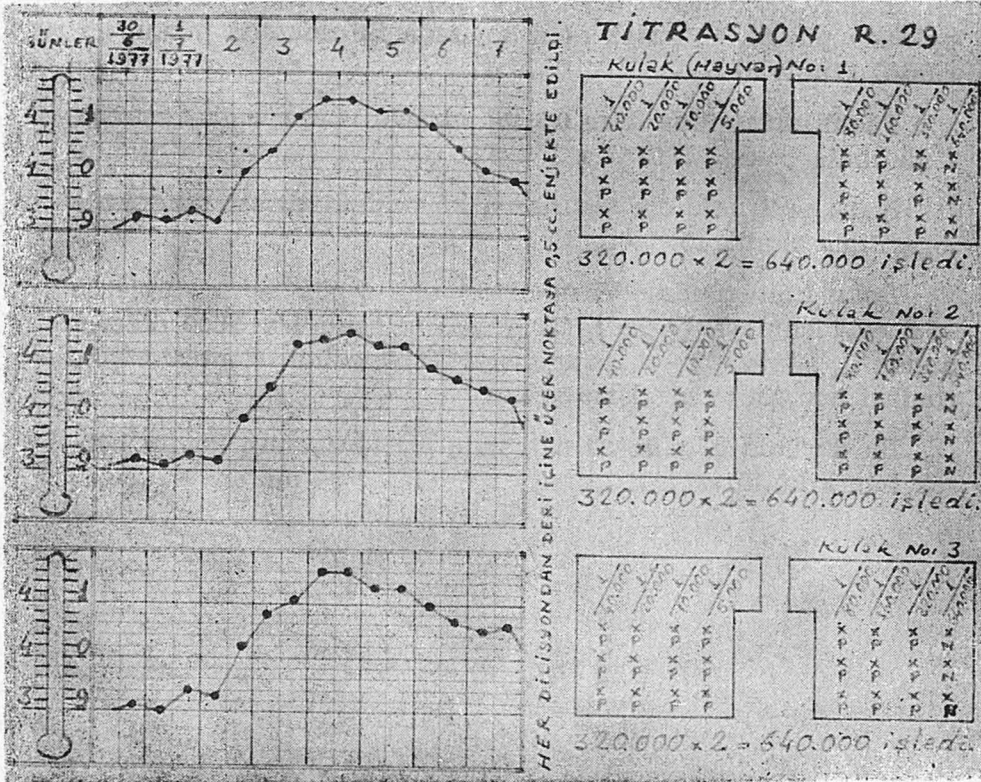
Tablo : 2 — Rekolt 30 Seri No.'lu Koyun Çiçek Virusunun koyunlardaki Titrasyon Sonuçları.

Tablo : 3 — Rekolt 31 Seri No.lu Koyun Çiçek Virusunun koyunlardaki Titrasyon Sonuçları.

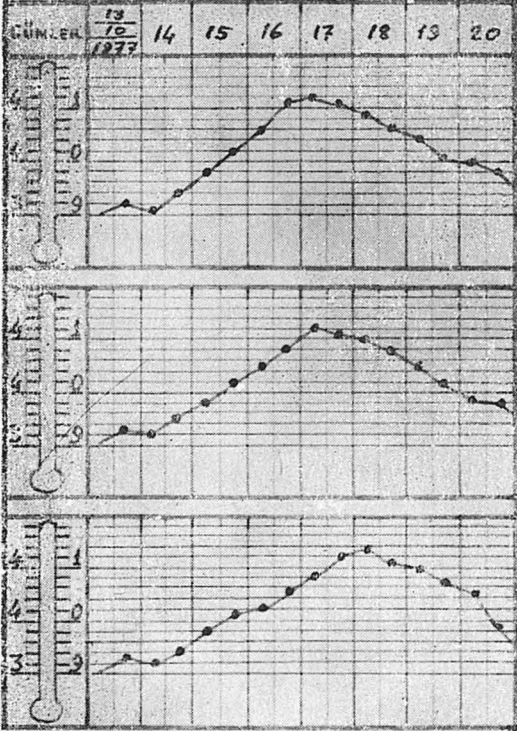
Tablo : 4 — Rekolt 32 Seri No.'lu Koyun Çiçek Virusunun koyunlardaki Titrasyon Sonuçları.

Tablo : 5 — Rekolt 33 Seri No.'lu Koyun Çiçek Virusunun koyunlardaki Titrasyon Sonuçları.

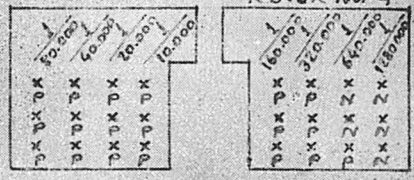
TABLO : 1



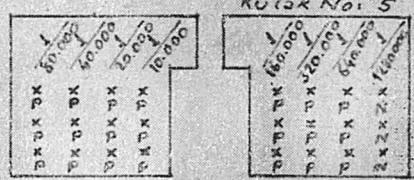
TABLO: 2



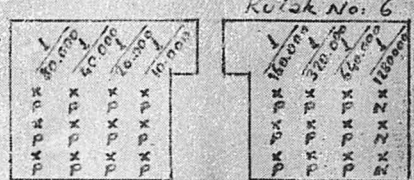
TITRASYON R. 30



$640.000 \times 2 = 1.280.000$ isledi.

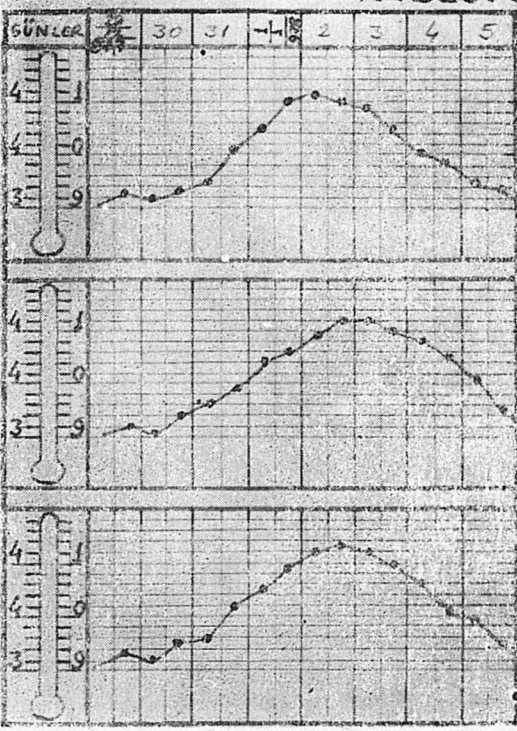


$640.000 \times 2 = 1.280.000$ isledi.

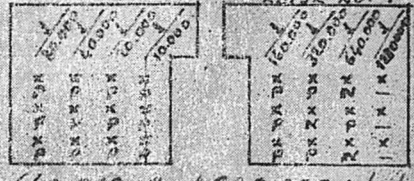


$640.000 \times 2 = 1.280.000$ isledi.

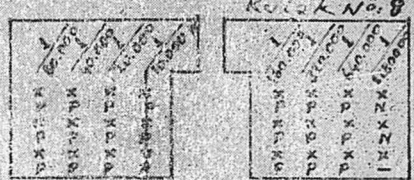
TABLO: 3



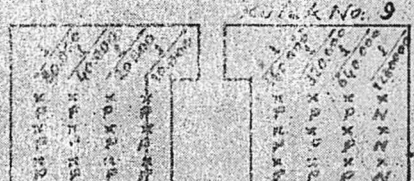
TITRASYON R. 31



$640.000 \times 2 = 1.280.000$ isledi.



$640.000 \times 2 = 1.280.000$ isledi.



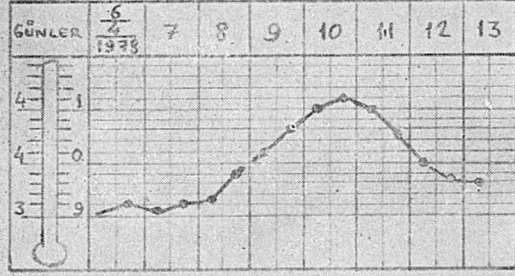
$640.000 \times 2 = 1.280.000$ isledi.

TABLO:4

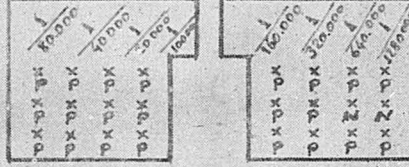
-11-

100.

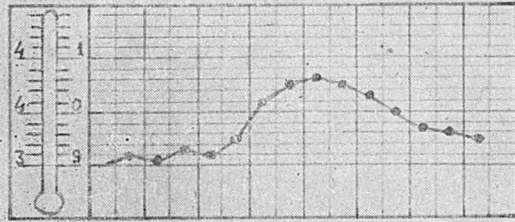
TITRASYON R.32



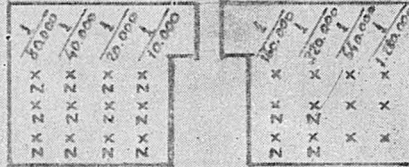
Kulak No: 10



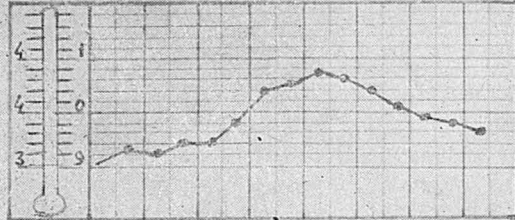
1.280.000 x 2 = 2.560.000 isledi.



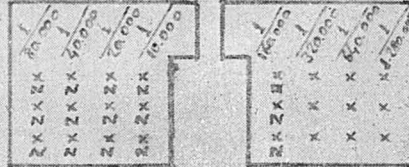
Kulak No: 11



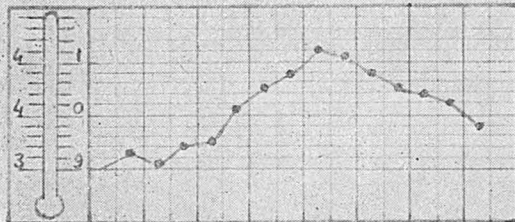
KOYUN REFRAKTER ÇIKTI.



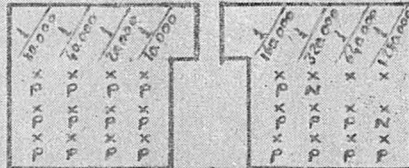
Kulak No: 12



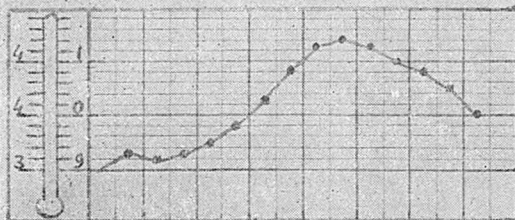
KOYUN REFRAKTER ÇIKTI.



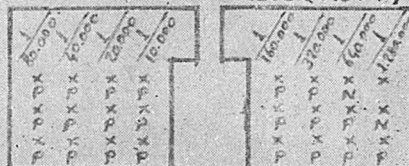
Kulak No: 13



1.280.000 x 2 = 2.560.000 isledi.



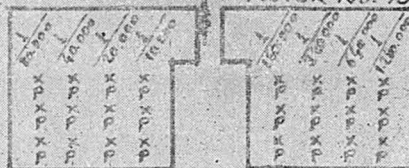
Kulak No: 14



1.280.000 x 2 = 2.560.000 isledi.

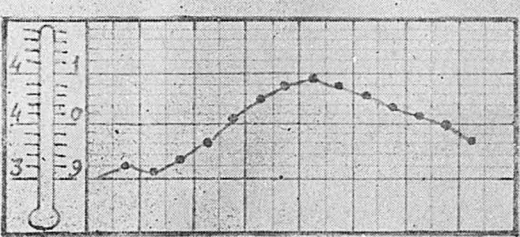
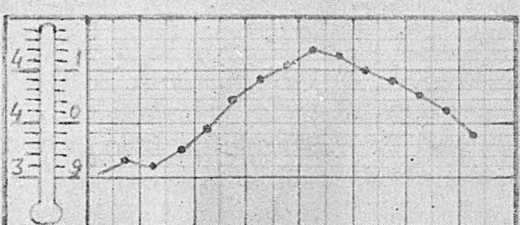
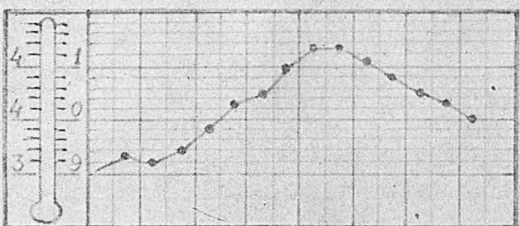
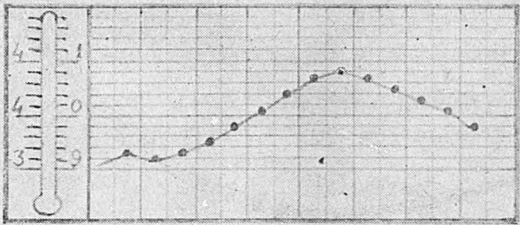
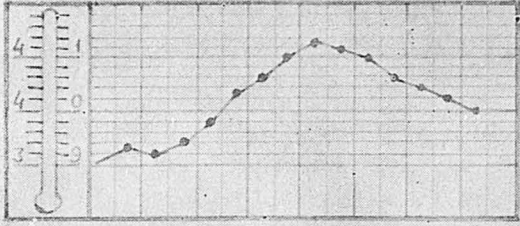
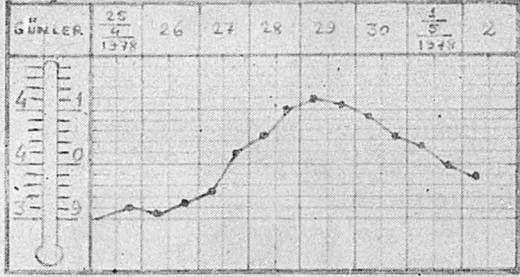


Kulak No: 15



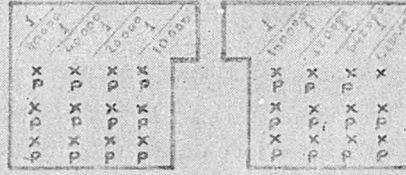
1.280.000 x 2 = 2.560.000 isledi.

HER DİLİŞONDAN DERİ İÇİNE ÜÇER NOKTAYA 0,5 CC. ENJEKTE EDİLDİ.



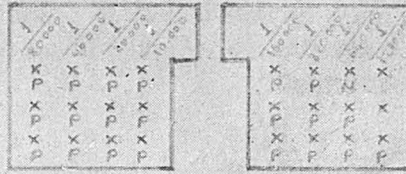
TITRASYON R.33

Kuluçka No: 16



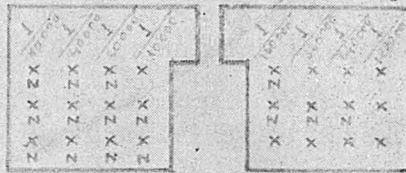
$1.280.000 \times 2 = 2.560.000$ isledi.

Kuluçka No: 17



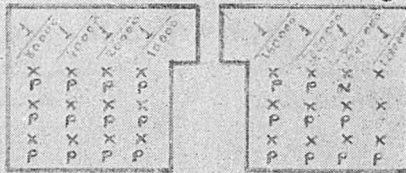
$1.280.000 \times 2 = 2.560.000$ isledi.

Kuluçka No: 18



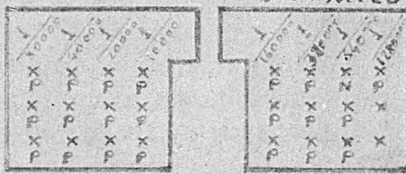
KOŞUN REFRAKTER ÇIKTI.

Kuluçka No: 19



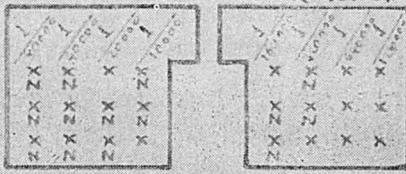
$1.280.000 \times 2 = 2.560.000$ isledi.

Kuluçka No: 20



$1.280.000 \times 2 = 2.560.000$ isledi.

Kuluçka No: 21



KOŞUN REFRAKTER ÇIKTI.

HER DİLİŞİMDEN DERİ İÇİNE ÜĞER NOKTAYA 0,5 CC. ENJEKTE EDİLDİ.

3 saat

TARTIŞMA

Bu çalışmada koyun çiçek virusuna karşı en duyarlı koyun ırkı olan safkan kıvrıcık koyunlarla birlikte koyun böbreği hücre kültürleri de denenmiştir. Çalışmamızda 21 baş koyun kullanılmış, daha iyi sonuç vermesi nedeniyle 6 - 18 aylık olanlar tercih edilmiştir. Titrasyonda kullanılacak koyunların aşısız olması birinci derecede önem taşıdığından gerekli koyunlar özellikle Trakya bölgesinin aşı tatbik edilmeyen yörelerinden temin edilmiştir.

a) R. 29 seri no. lu aşı virusunun koyunlardaki titresi $10^{-5,80}$, aynı virusun koyun böbrek hücre kültüründeki titresi ise $10^{-5,65}$ TCID/50 ml. dir.

b) R. 30 seri no. lu aşı virusunun koyunlardaki titresi $10^{-6,10}$, koyun böbrek hücre kültüründeki titresi $10^{-5,95}$ TCID/50 ml. dir.

c) R. 31 seri no. lu virusunun koyunlardaki titresi $10^{-6,10}$, koyun böbrek hücre kültüründeki titresi $10^{-5,65}$ TCID/50 ml. dir.

d) R. 32 seri no. lu aşı virusunun koyunlardaki titresi $10^{-6,40}$, koyun böbrek hücre kültüründeki titresi $10^{-6,31}$ TCID/50 ml. dir.

e) R. 33 seri no. lu aşı virusunun koyunlardaki titresi $10^{-6,40}$, koyun böbrek hücre kültüründeki titresi $10^{-6,01}$ TCID/50 ml. bulunmuştur.

Plowright ve Ferris isimli araştırmacılar çalışmalarında koyun testis hücresinde ürettikleri virusun aynı hücrelerdeki titresini 0,2 ml. de 10^{-6} , koyunlardaki titreyi ise 0,2 ml. de 10^{-7} bulmuşlardır.

Yaptığımız bu çalışmada koyun çiçek virusunun koyun böbrek hücresindeki titreleri koyunlardaki titrelere yaklaşmakla beraber aynı seviyede bulunmamıştır. Bu durum Plowright ve Ferris isimli araştırmacıların çalışmalarındaki elde ettikleri sonuçlara uygun düşmektedir.

Arık ve Kurtul isimli araştırmacılar Borrel metodu ile ürettikleri virusunkıvrıcık koyunlardaki titresini 5×10^{-6} bulmuşlardır.

İran'da kuzu ve dana böbrek hücrelerine adapte edilmiş virusun titresi $10^{-5,5}$ ile $10^{-5,8}$ TCID/50 ml. bulunmuştur.

Bilge Onar isimli araştırmacı troid hücre kültürüne adapte edilen virusun 72 saatte 10^{-6} titre verdiğini görmüştür.

Yaptığımız beş seri aşı virusunun koyunlardaki titresi 10^{-5} , ile 10^{-6} ,⁴⁰ arasında, doku kültüründe ise 10^{-5} ,⁶⁵ ile 10^{-6} ,³¹ arasında bulunmuştur.

Literatür kayıtlarına aldığımız araştırmacıların koyun ve doku kültürlerinde elde ettikleri titreleri ile bizim bulduğumuz titreler arasında bir yaklaşım görülmüştür.

Doku kültüründeki sonuçlarla koyunlardaki sonuçlar arasında tam bir paralellik görülüyorsa da genel olarak bir yaklaşım vardır.

Borrel metodu ile üretilen koyun çiçek virusu bugüne kadar saf kan kıvırcık koyunlarda titre edilmekte idi. Bu çalışmadan alınan sonuçlara göre virusun doku kültüründe de titre edilebileceği kanısına varılmıştır.

Virus titrasyonlarında kullanılan safkan kıvırcık koyun teminindeki güçlükler ve bazı koyunların da refrakter çıkması nedeniyle, zaman kaybının önlenmesi, ekonomik ve pratik olması yönünden bundan böyle titrasyonlarda koyun yerine doku kültürü kullanılabilir.

Bu araştırmada beş seri koyun çiçek aşı virusu saf kan kıvırcık koyunlarda ve koyun böbrek hücre kültürlerinde titre edildi. Virusun 1/10.000 den 1/1.280.000 e kadar 8 dilisyonu hazırlandı ve denemelerde bu dilisyonlar kullanıldı.

Koyunlardaki değerlendirmeler aşı protokolunda belirtildiği gibi püstül durumuna göre yapıldı ve sonuçlar doz minimal reaksiyon (DMR) olarak gösterildi. Refrakter çıkan koyunlar değerlendirmeye sokulmadı.

Klasik metoduyla hazırlanan koyun böbrek hücre kültürlerine virus ekimi yapıldı. Hücre kültürleri Cytopathogenic effect (CPE) yönünden 12. güne kadar her gün mikroskop altında kontrol edildi. Değerlendirmeler hücrelerde şekillenen CPE durumuna göre Reed ve Muench metodu ile yapıldı. Sonuçlar Tisse culture infective dose TCID₅₀ ml. olarak gösterildi.

Koyunlardaki titre $10^{-5,80}$ ile $10^{-6,40}$ arasında, koyun böbrek hücre kültürlerinde ise $10^{-5,65}$ ile $10^{-6,35}$ arasında bulunmuş ve tirelerde bir yaklaşım olduğu görülmüştür.

Ekonomik ve pratik olması ve zaman kaybının önlenmesi yönünden koyun çiçek virusu titrasyonlarında koyun yerine doku kültürü kullanılabilir.

S U M M A R Y

COMPARATIVE TITRATION TEST OF SHEEP POX VIRUS PRODUCED BY BORREL METHOD ON SHEEP AND SHEEP KIDNEY TISSUE CULTURE (*)

By.

Ayhan AKÇORA

Vet. Kont. Araşt. Ens.
Etlik, Ankara

Ali Demir YONGUÇ

Vet. Kont. Araşt. Ens.
Etlik, Ankara

This study was conducted to compare the titration of sheep pox virus produced by Borrel method on sheep and sheep kidney tissue culture. 8 dilutions of the virus with 1/10.000 to 1/1.280.000 were used for titrations.

Results in sheep were appeared according to the pustules and dose minimal reaction (DMR) after intradermicly injections of the vaccine virus dilutions. Any sheep refractory in the experiment were discarded. 21 sheep were used in the study and they were kıvırcık race which were more susceptible to the virus.

Results in the sheep kidney tissue culture were followed for cytopathic effect (CPE) under microscope for 12 days. CPE were appeared by the method of Reed and Muench and explained by tissue culture infective dose (TCID₅₀).

Titration on sheep were estimated as being with a range of $10^{-5,80}$ — $10^{-6,40}$ where as an tissue culture $10^{-5,65}$ —

(*) This study was supported by scientific and Technical Research Council of Turkey, with the project no. VHAG — 321.

10^{-6} ,³⁵ the results of the both virus titrations were similar to each other, but titrations of virus on sheep kidney tissue culture were obviously more economic and practical than the regular method with pustules on sheep.

K A Y N A K L A R

- 1 — Anon, 1973. Raport of the Meeting of the Standardisation Committee for Predaction of Sheep Pox Vaccine. Tehran 23 rd — 25 th may.
- 2 — Arık, F., Akçora, A., 1973. Cento Ülkeleri koyun çiçek aşısı üretimi ve standardizasyonu. Gıda — Tarım ve Hayvancılık Bakanlığına verilmiş rapor.
- 3 — Arık, F., Kurtul, Y., 1973. Çeşitli koyun ırklarından Borel metoduyla virus temini ve titrelerinin tayini. Pendik Vet. Kont. ve Araşt. Enst. Dergisi 6 (1) 79—90.
- 4 — Arık, F., Kurtul, Y., 1974. Koyun çiçek virusunun canlı embriyolu tavuk yumurtasında üretilmesi üzerinde çalışmalar.
- 5 — Başkaya, H. Gürtürk, S., Arda, M., 1956. Canlı virus ile hazırlanmış koyun çiçek aşısı. Türk Vet. Hek. Dern. Derg.; (118-119), 3109-3113.
- 6 — Borrel, A., 1903. Epithélioses infectieuses et Epithéliomas. Ann. de L'inst. Past. 2, 81-137.
- 7 — Erhan, M., 1968. Koyunların çiçek hastalığı. FAO koyun ve keçilerin virüsü hastalıklarının teşhisi semineri. Eylül 23-28 Pendik.
- 8 — Köylü, A., Nada, S.M. 1970. Koyun embriyo deri kültürlerinde koyun çiçek virusunun üretilmesi. Pendik Vet. Kont. ve Ars. Enst. Derg. 3 (1) 88-89 (1970).
- 9 — Martin, W. B., Ergin, H., Köylü, A., 1968 Koyun çiğine karşı atenuë bir aşı süşunun tekamülü, F.A.O. /U.N.D.P. koyun hastalıkları laboratuvarı, Pendik Konferans notları.
- 10 — Nitzschke, E., Buckley, L. S. and Ergin, H. 1967. Isolation and titration of sheep, and goad pox viruses in sheep thyroid cell cultures. Vet. Rec. 81, 216-217.
- 11 — Onar, B., 1973. Koyun çiçeği virusunun koyun tiroid hücre kültürlerinde üreme safhalarının incelenmesi. Pendik Vet. Kont. ve Araşt. Enst. Derg. 6 (1), 91-96.
- 12 — Özcebe, İ., Güley, M., Özaksit, A., 1958. Koyun çiğine karşı yeni bir aşı. OVI-CAP, Türk Vet. Hek. Dern. Derg., (136-137) 4-14.

- 13 — **Özmen, M.**, 1968. Koyun çiçeği ve aşıları. Bornova Vet Kont. ve Araşt. Enst. Derg., (17), 15-31.
- 14 — **Plovright, W., and Ferris, R. D.**, 1958. The growth and cytopathogenicity of sheep - pox virus in tissue cultures. Brit. J. Exp. Path. 93, 424-435.
- 15 — **Rafiyi, A., Ramyor, H.**, 1959. Serial passage in goat, and the developing egg, and relationship with sheep pox. J. Comp. Path. 69, 141-147
- 16 — **Ünlü, M.**, 1956. Koyun çiçeğine karşı kullanılan başlıca aşı metodları ve bunların mukayesesi. T. Vet. Dern. Dergisi. (118-119), 3068 - 3088.
- 17 — **Ünlü, M.**, 1959. Çiçek ve koyun çiçeği ile umumi savaş problemi ve yurdumuzdaki aşı tatbikatının geçirdiği safhalar. T. Vet. Hek. Dern. Dergisi, (148-149), 25-32.