

## MAREK AŞISINDA KULLANILAN ÇEŞİTLİ SULANDIRMA SIVILRININ BAĞIŞIKLIK ÜZERİNDE İNVİVO VE İNVİTRO ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Aysel ERGÜN

Hamdi GİRĞİN

Dündar EREN

**GİRİŞ** : 1978 yılında üretimine başlanan Marek aşısı HVT FC - 126 suşu ile civciv embryo fibroblast kültürlerinde hazırlanan hücreye bağımsız (cell-free) ve lyofilize bir aşıdır.

Aşının iki sulandırma sıvısı vardır. Birincisi E.D.T.A. (disodyum etilenamin tetraasetat) diğeri, formülü materyal bölümünde yazılmış bulunan SPGA (sukroz, fosfat, glutamat ve albumin) dir. SPGA sıvısı laboratuvarımızda aşının toplanması, çatlatılması, titrasyonu ve aşının uygulanması esnasında sulandırma sıvısı olarak kullanılmaktadır (3,5,11,12).

Calnek ve arkadaşları (1970) yılında % 20 glikoz, sorensen tamponu içinde % 8 yağsız süt, % 2 NZ amin + glikoz, SPGA, SPG + NZ amin, PBS + EDTA, SPGA + EDTA tesbit edici ve seyreltilerini mukayeseli olarak çalışmışlar ve en iyi titrasyon sonuçlarını SPGA ile liyofilize edilen aşılarından elde etmişlerdir.

Benzeri çalışmalar daha sonraları (1973) Churchill ve arkadaşları, 1982 yılında ise Thornton ve arkadaşları tarafından sürdürülmüştür.

Aşının kurutulması ve titrasyonu esnasında tesbit edici ve seyreltiler olarak kullanılan SPGA sıvısının, aşının uygulanması esnasında kullanıldığına ait bir açıklıkta bulunmamaktadır. Esasen her ticari firmanın kendine has bir sulandırıcısı mevcuttur. Bizim müşahadelerimize göre 1979 yılından beri uygulanmakta olan Marek aşısını sulandırma sıvısı olan SPGA + 4°C'de saklansa bile bir aydan sonra tortu yaptığı ve bununla içeriğindeki sığır serum albumininden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada SPGA'nın getirdiği pratik ve ekonomik güçlükler dikkate alınarak yeni bir sulandırma sıvısı ve bu sıvının invitro ve invivo etkileri araştırılmıştır (2, 6).

## MATERYAL ve METOR

— Değişik seri nolu HVT FC 126 suşu ile primer embiryo fibroblast kültürlerinde hazırlanmış hücreye bağımsız (cell-free) lyofilize aşılar.

— Değişik formüle sahip sulandırma sıvıları, formülleri aşağıya çıkarılmıştır.

### SPGA

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,52 gr.	<b>1 Nolu Sulandırma Sıvısı</b>	
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,40 gr.	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	2,58 gr.
Sakk.	74,42 gr.	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,52 gr.
Na-glutaminat	0,92 gr.	Sakk.	20,00 gr.
Sığır S. Alb.	10,00 gr.		

### 2 Nolu Sulandırma Sıvısı

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	2,58 gr.
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,52 gr.
Sakk.	20,00 gr.
Pepton	10,00 gr.

### 3 Nolu Sulandırma Sıvısı

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	2,58 gr.
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,52 gr.
Pepton	10,000 gr.

Bu miktarlar 1 litre için olup pH ise : 7,2 - 7,4 tür.

— Hücre Kültürü : Federal Almanya'dan gelen SPF yumurtaların 9 - 11 günlük embriyolarından bilinen metodla primer embriyo fibroblast kültürleri hazırlanmıştır (6, 7, 8,).

— Civcivler : Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsünden alınmış olup 8.4.1982 çıkışlı hem et hemde yumurta yönlü pley-muth'tır. Civcivler günlük iken denemeye konulmuş ve aşağıdaki şekilde gruplandırılmıştır.

SPGA sulandırma sıvısı için 100 adet

2 Nolu » » » 100 adet

2 Nolu sulandırma sıvısının sulandırıldıktan 1.5 saat sonraki aktivite kontrolü için 100 adet

Aşısız kontrol grubu için 50 adet.

— Yem Ankara Yem Sanayiinden alınmıştır.

— Aşılanmış civcivlerin epüvasyonunda kullanılmak üzere yerel eprüve suşu

**METOD :** Çalışmalarımızda kendi istihsalimize ait lyofilize Hindi Herpes virus (HVT) Marek aşıları kullanılmıştır. Kültür denemeleri ve titrasyon 6, 7, 8 nolu literatürlerin ışığı altında yapılmıştır. Farklı olarak 60 mm. çapında plastik petri ve CO<sub>2</sub>'li etüv bulunmadığı için yerine 60 mm. çaplı erlenmayer kullanılmıştır. Üretim ve muhafaza vasatı olarak M. 199 'dan yararlanılmış yalnız muhafaza vasatı için serum % 5'ten % 2'ye düşürülmüştür.

Her aşının, formülleri verilmiş sulandırma sıvıları ile 10<sup>-2</sup> 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> dilisyonları yapılarak her bir dilisyondan 5 erlenmeye 0,05 ml. damlatılarak 30 - 45 dakika ausorbisyona bırakılmıştır Absorbsiyonu takiben vasat hücreler üzerinde ilave edilerek 5 - 6 günlük inkubasyona bırakılmıştır. Daha sonra % 4,4 formülle kültürler tespit edilip kurutulduktan sonra hücre kültürleri üzerindeki plâkalar gözle sayılmıştır. Böylece Marek aşısının tavuk embriyo fibroblast kültürlerinde plâk oluşturma özelliğinin değişik formüle sahip sulandırma sıvılarının inhibe edici etkileri SPGA sulandırma sıvısı ile mukayesesi yapılmıştır.

**Eprüve Suşu :** Marek aşısının çıkarılması esnasında ayrılmış bulunan yerel petogen suş halen - 20°C'de muhafaza edilmektedir. Suş hastalığın akut seyrettiği bir kümeden ayrılmış olup iç organ süspansiyonudur. Denemeye başlamadan önce 50 adet civciv bu suşla I.A yolla 0,2 ml. verilmek suretiyle enfekte edildiler. İnokülasyondan bir ay sonra Marek Hastalığına ait klinik belgeler görülmeye başladı. Ölenlerin histopatolojik yoklamalardan da enfeksiyonun Marek hastalığı olduğu tespit edildikten sonra canlı kalanların kanları eprüvasyonda kullanılmıştır (1,10).

Civcivler, günlük iken ve yine laboratuvarımızda üretilmiş olan 28 seri nolu aşı ile I.M olarak aşılanmışlardır. Aşılamayı müteakip 14. günde daha evvel enfekte edilmiş hasta hayvanların kanlarından 0,2 ml. I.A verilmek suretiyle yapay olarak eprüve edilmişlerdir. (% 5 oranında)

Eprüvasyondan sonra civcivler aynı bakım ve beslenme koşullarında üç ay gözlem altında tutulmuşlardır (10).

**SONUÇ** : Çalışmamızın ilk 6 ayında 2, 3, 10 ve 77 serin nolu aşuların bahsedilen metotla titrasyonları yapılmış ve sonuçlar aşağıya çıkarılmıştır.

Aşı Seri No : 2 kontamine

Aşı Seri No : 3

	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
SPG	Çok sayıda plâk	104 66.2	116 —
1 nolu sulandırma sıvısı	—	100	—
Aşı seri no : 77			
SPGA	Çok sayıda plâk	Çok sayıda plâk	92
1 nolu sulandırma » » » SIVISI	» » »	» » »	42

**Aşı seri No : 10 Sıvıların hiçbirisinde plâk teşekkülü olmadı**

Bundan sonra ikinci 6 aylık dönemde yeni kaynakların ışığı altında 1 nolu sulandırma sıvısı geliştirilerek bunların SPGA ile mukayesesi yapılmıştır (tablo 1, 2).

29 ve 76 seri nolu aşuların 3 ayrı zamanda yapılan titrasyon sonuçlarında plâk oluşumu görülmemiş bu sonuçlar bütün sulandırma sıvılarında aynı olmuştur.

Tablo — I

Aşı Seri No : 17

Sulandırma Sıvısı	Virus Plâk Sayısı Dilisyonu		Değerlendirme
	10 <sup>-2</sup>		
SPGA	10 <sup>-3</sup>	Plâklar belirgin değil	Değerlendirme yapılmadı
	10 <sup>-4</sup>	Plâk Yok	
1 Nolu sulandırma sıvısı	10 <sup>-2</sup>		
	10 <sup>-3</sup>	Sayılamayacak kadar	Değerlendirme yapılmadı
	10 <sup>-4</sup>	Plâk Yok	
2 Nolu sulandırma sıvısı	10 <sup>-2</sup>		
	10 <sup>-3</sup>	Bir erlende çok sayıda	Değerlendirme yapılmadı
	10 <sup>-4</sup>	Plâk Yok	
3 Nolu sulandırma sıvısı	10 <sup>-2</sup>		
	10 <sup>-3</sup>	Plâk yok	» »
	10 <sup>-4</sup>	Bir erlende plâk var	

Aşı Seri No : 30

	10 <sup>-2</sup>		
SPGA	10 <sup>-3</sup>	105 + 141 + 90 + 59	98,75
	10 <sup>-4</sup>	Hücre dökülmesi var	
1 Nolu sulandırma sıvısı	10 <sup>-2</sup>		
	10 <sup>-3</sup>	Bir erlende plâk var	Değerlendirme yapılmadı
	10 <sup>-4</sup>	Plâk yok	
2 Nolu sulandırma sıvısı	10 <sup>-2</sup>		
	10 <sup>-3</sup>	132 + 113	Değerlendirme yapılmadı
	10 <sup>-4</sup>	72 + 38	
3 Nolu sulandırma sıvısı	10 <sup>-2</sup>		
	10 <sup>-3</sup>	Hiç plâk yok	
	10 <sup>-4</sup>		

Tablo — II

Aşı Seri No : 17

Sulandırma Sıvısı	Virüs Dilisyonu	Plâk Sayısı	Değerlendirme
SPGA	10 <sup>-2</sup>	215 + 195 + 197 + 148	186.25
	10 <sup>-3</sup>	103 + 109 + 63 + 62	84.25
	10 <sup>-4</sup>		
1 Nolu sulandırma sıvısı	10 <sup>-2</sup>	142 + 122 + 108 + 157	132.25
	10 <sup>-3</sup>	106 + 74 + 72 + 137	97.25
	10 <sup>-4</sup>		
2 Nolu sulandırma sıvısı	10 <sup>-2</sup>	126 + 181 + 162 + 208	169.25
	10 <sup>-3</sup>	108 + 102 + 91 + 56	89.25
	10 <sup>-4</sup>		

Aşı Seri No : 31

SPGA	10 <sup>-2</sup>	571 + 450 + 468 + 420	477.2
	10 <sup>-3</sup>	111 + 77 + 98 + 129	103.2
	10 <sup>-4</sup>	Plâk yok	
1 Nolu sulandırma sıvısı	10 <sup>-2</sup>	372 + 409 + 269 + 259	235.5
	10 <sup>-3</sup>	106 + 111 + 125 + 82	105.2
	10 <sup>-4</sup>		
2 Nolu sulandırma sıvısı	10 <sup>-2</sup>	422 + 282 + 268 + 366	327
	10 <sup>-3</sup>	111 + 98 + 11 + 86	101.5
	10 <sup>-4</sup>	Plâk yok	

Aşı Seri No : 28

SPGA	10 <sup>-2</sup>	iki erlende plâk var	Değerlendirme yapılmadı
	10 <sup>-3</sup>	Plâk yok	
	10 <sup>-4</sup>	Plâk yok	
1 Nolu sulandırma sıvısı	10 <sup>-2</sup>	Plâk yok	Değerlendirme yapılmadı
	10 <sup>-3</sup>	Plâk yok	
	10 <sup>-4</sup>	Plâk yok	
2 Nolu sulandırma sıvısı	10 <sup>-2</sup>	iki erlende plâk var	Değerlendirme yapılmadı
	10 <sup>-3</sup>	Plâk yok	
	10 <sup>-4</sup>	Plâk yok	

Aşı Seri No : 32

Sulandırma Sıvısı	Virus Dilisyonu	Plak Sayısı	Değerlendirme
SPGA	$10^{-2}$	iki erlende plâk var	Değerlendirme yapılmadı
	$10^{-3}$	Plâk yok	
	$10^{-4}$	Plâk yok	
1 Nolu sulandırma sıvısı	$10^{-2}$	Plâk yok	Değerlendirme yapılmadı
	$10^{-3}$	Plâk yok	
	$10^{-4}$	Plâk yok	
2 Nolu sulandırma sıvısı	$10^{-2}$	iki erlende plâk var	Değerlendirme yapılmadı
	$10^{-3}$	Plâk yok	
	$10^{-4}$	Plâk yok	

3 Nolu sulandırma sıvısı 1 aylık iken + 4°C ve oda derecesinde tortu yaptığından tablo 2'deki çalışmalarda yer almıştır. Bu sonuçlar 2 Nolu sulandırma sıvısının SPGA'ya yakın değerler verdiğini göstermiştir. Öte yandan 1, 2 nolu sulandırma sıvıları dayanma sürelerini tesbit etmek amacıyla hazırlandıktan sonra 6 ay hem oda derecesinden hemde + 4°C de tutulmuşlardır. Bu süre zarfında pH'larında 0,1 lik bir düşme görülmüştür.

Değişik formüllü sulandırma sıvılarının titrasyon ve dayanma süresi dikkate alınrsa, SPGA'ya en yakın sonucu 2 Nolu sulandırma sıvısı vermektedir. Bunun içindirki bağışıklık kontrolleri için yalnız SPGA ve 2 Nolu sulandırma sıvısı denemeye alınmıştır.

SPGA ile sulandırılmış aşı ile aşılınmış grupta epürasyondan yaklaşık 34 gün sonra ölümler başlamıştır. Total ölüm oranı % 15,5'tir. Ölenlerin otopsi ve histopatolojik yoklamalar sonucu % 14,5'nin Marek hastalığından % 1'nin ise coccidiososten olduğu saptanmıştır. Denemenin sonunda canlılar kesilmek suretiyle otopsileri yapılmış ve iki tane visceral Marek olgusuna rastlanmıştır. Yine kesim sonucu ortalama canlı ağırlık ise 1.276 gr. bulunmuştur. (10). İki nolu sulandırma sıvısı ile sulandırılmış aşı ile aşılınan grupta ise ilk ölüm olayı epüvasyondan sonraki 40. günde başlamış ve hızlı devam etmiştir. Total ölüm oranı % 28.1'dir. Ölenlerin otopsi, bakteriyolojik, parazitolojik ve histolojik yoklamalarında % 23'nün Marek hastalığı, % 5'nin Coccidiois yalnız bir vak'alarında spiroketosis olduğu tesbit edilmiştir.

Denemenin sonunda canlıların kesilmek suretiyle yapılan otopsi ve histopatolojik yoklamalarında bir tane visceral Marek olgusuna rastlanmıştır.

İki nolu sulandırma sıvısı ile sulandırılmış aşının Müessesemiz fen kurulu kararı gereğince, sulandırıldıktan 1,5 saat sonraki aktivite kontrolü istenmişti. Bu nedenledir ki, bir grup civcivlerde aşı sulandırıldıktan 1,5 saat sonra aşılınmışlardır. Ve diğer gruplarda olduğu gibi aşılardan sonraki 14. günde eprüve edilmişlerdir. Eprüvasyondan 35 gün sonra ilk ölümler başlamış olup total olarak % 13 civarındadır. Otopsi, bakteriyolojik, parazitolojik ve histopatolojik muayenelerde % 9 Marek hastalığından meydana geldiği tesbit edilmiştir. Canlıların kesim sonrası yapılan muaye-



nelerinde ise bir adet visceral marek hastalığı tesbit edilmiştir. Yine kesim sonrası ortalama canlı ağırlık ise 1.333 gr.'dır.

Aşısız kontrol gruba gelince; İlk ölümler epruvasyondan 34 gün sonra başlamıştır. Total ölüm oranı % 73.3'tür. Ölenlerin otopsi, bakteriyolojik, parazitolojik ve histopatolojik müayenelerinde hepsinde akut Marek hastalığı tesbit edilmiştir. % 8.8'inde de Marek hastalığına coccidiosis eşlik etmektedir. Kesim sonrası muayenelerinde ise 3 pozitif vak'aya rastlanmıştır. Ortalama canlı ağırlık ise 0,642 gr. dır. (1, 2, 10, 13).

**TARTIŞMA** :Hindi Herpes virusu gibi doku kültürlerinde plâk oluşturma özelliğine sahip virusların titrelerinin tesbitinde Agar overlay metodu uygulanmaktadır. Teknik imkansızlıklar nedeniyle halen laboratuvarımızda agar - overlay yerine sıvı vasattan yararlanılmaktadır. Araştırma çalışmalarımızda böyle yürütülmüştür. Bu metodun agar - overlaya nazaran daha az hassas olduğuda bilinmektedir. Bu nedenledir ki her seri aşının iki veya üç defa titrasyonu yapılmış ve tablo 1 ve 2'de görüldüğü gibi 2 Nolu sulandırma sıvısı SPGA'ya yakın sonuç vermiştir.

Esasen literatür verileri ve ticari firma etiketlerinde Marek virusunun süspanse edici ortamda fosfatların dışında şeker ve protein kaynağına ihtiyaç olduğu anlaşılmaktadır. Sıvıların formüle edilmesinde bu noktaya sadık kalmaya özen gösterilmiştir (3, 11, 12.)

Nitekim titrasyon çalışmalarının değerlendirilmesi için yapılan bağışıklık ve epüvasyon kontrollerinde de epüvasyon sonucu meydana gelen ölüm yüzdesi hem SPGA'ya yakın hemde Marek aşısı protokol limitleri içerisindeydir. Ne varki, 2 nolu sulandırma sıvısında görülen % 18 oranında ki ölümle, sıvının sulandırıldıktan 1.5 saat sonra uygulanan grupta ise % 9 oranında meydana gelen ölüm olayı paradoks teşkil etmektedir. Biz bu sonucu coccidiosis hastalığının en ağır bu grupta görülmesine bağlıyoruz (9).

Önemle belirtmek isteriz ki SPGA sıvısı virusun parçalanması, aşının kurutulması ve titrasyonunda tesbit edici ve süspanse edici vasat olarak kullanılacaktır. Yalnız halen kullanıldığı gibi uygulama esnasında aşı sulandırma sıvısı olarak SPGA yerine, 2 Nolu sulandırma sıvısının daha pratik ve ekonomik olacağını düşünmekteyiz.

## Ö Z E T

Marek aşısının uygulanması esnasında kullanılmak üzere, değişik formüle sahip sulandırma sıvılarının, SPGA sulandırma sıvısı ile invitro ve invivo mukayesesi yapılmış ve 2 nolu sulandırma sıvısı SPGA'ya yakın sonuç vermiştir.

## S U M M A R Y

### IN VIVO AND VITRO COMPARATIVE STUDIES ON THE DILUENTS OF MAREK'S DİSEASE VACCİNE.

Studies have been carried out by means of invivo and invitro to compare the different formulated diluents with SPGA to find out more stable and cheaper diluent to be used during the applications of Marek's disease vaccine in the field.

The second diluent has given the similar results which are close to SPGA.

L İ T E R A T Ü R

- 1 — BAŞKAYA, H., Mimbay, A. 1974 Marek Hastalığı Ankara Üniversitesi Vet. Fak. Yayınları 299.
- 2 — BÜLOW, V. V., Monreal, G. 1974. Control of Marek's Disease by vaccination in west Germany. Acta. Vet. Brno, 43, 161 - 167.
- 3 — CALNEK, B. W., Hitchner, S.B. and Adldinger, K., 1970. Lyophilization of Cell - Free Marek's Disease Herpes virus and a Herpes virus from Turkeys. Applied Microbiology 723 - 726
- 4 — CHUCCHILL, A.E. and Baxendale, W., Carrinton, G. 1973. Viremia and Antibody Development in Chicks Following the administration of Turkey Herpes virus. Vet. Rec. 92. 327 - 334.
- 5 — CHURCHILL, A. E. and Baxendale, 1972. The standardization and Testing of the Different farms of Marek'e disease vaccine. Progr. Immunobiol. Standard., Vol. 5 pp. 120 - 125.
- 6 — INGWERSEN, P., Monreal, G., Beyer, G. 1974. Untersuchungen zur standardisierung der titration von lyophilisierten puten Herpes Vakzinen gegen die Marek's Krankheit. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 87, 389 - 392.
- 7 — INGWERSEN, P., Krafit, V., Monreal, G. 1974 Untersuchungen Über die Haltbarkeit von Impfstoffen gegen die Marek'sche Krankheit. Dtscht. Tierärztl. Wschr. 81, 297 - 324.
- 8 — KRAFT, V., Ingwersen, P. and Monreal, G. 1973. Zur Methodik der titration von lyophilisierten und zellassozierten Marek Vakzinen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 86. 283 - 285.
- 9 — RICE, T. and Reid U.W. 1972. Coccidiosis Immunity following Early and late Exposure to Marek's Disease. Avian Disease.
- 10 — SİPAHIOĞLU, A., Girgin, A., Fuhr, R. 1978 Tavukların Marek ve Leucosis hastalıklarının araştırılması ve Marek hastalığına karşı etkin bir aşı hazırlama. Etiik Vet. Microb. Enst Cilt : 4 Sayı : 11 - 12.
- 11 — THERTON, H., Heberrrt, N., Musket, J.C., Reed, N.E. and Nicholas, R.A.J. 1982. Collaborative study of the assay for virus content of Marek's'e disease vaccines using a reference preparation. Journal of Biological Standardization 10 135 - 146.
- 12 — ZENELLA, A. 1972. Marek's Disease Preparation and control of vaccines and control of vaccines and Results of vaccinatoin Progr. Immunobiol standart., vol. 5, pp. 149 - 155.
- 13 — ZYGRAICH, N. Petermans, J. Collinet, G. and Huygelen, C. 1972 Marek's Disease with Turkey Herpes virus. Progr. Immunobiol Standart. Vol. 5 pp. 136 - 140.