

Böbrek Doku Kültürü Çalışmaları

Ahmet ÖZSOY *

Mahmut SÜTCÜ **

Doku kültürü üzerinde çalışan eski araştırmacılar geniş lâboratuvarlar kurup, içlerini koca koca aletlerle donatıp, parlak ışıklar, renkli mayiler kullanarak, siyah elbiseler giyerek doku kültürü yapımını karışık, bir sır haline getirmişlerdir.

Geçen on seneden bu yana doku kültürünün karışık ve sır oluşu ortadan kaldırılarak, büyük enstitülerin inhisarları altından kurtarılmıştır. Doku kültürü bu gün bir çok biyoloji laboratuvarlarının programında yer işgal etmektedir. Doku kültürü deyimi yanlışır. Çünkü kimse dokuyu kültüve edemez, ancak hücreyi kültüve edebilir.

Pek çok memleketin viroloji çalışmalarında (Teşhis, idantifiye, izolasyon ve virus üretme) başarı ile kullandıkları doku kültürü çalışmalarına bizde Ekim 1961 de başladık.

Çalışmalarımızın amacı : Şap hastalığına karşı hazırlanan aşı için lüzumlu virusu istenildiği kadar kolayca bu methodla üretmek, Deneme hayvanlarında yapılan testlerin ve teşhisin doku kültürü ile yapımını sağlamaktı. Bu maksatla böbrek doku kültürü çalışmasına ilk olarak koyun böbreği ile başladık. İkincisinde dana böbreği, üçüncüsünde ise embriyo (Sığır ve koyun) böbreği kullandık. Çalışmalarımızı bir yönden yürütmek için dana böbreği tercih olundu.

DOKU KÜLTÜRÜNÜN TARİHÇESİ :

Biyolojik düşüncenin bir parçası olarak hücre kültürü temeli cidden çok eskiye dayanır. Milattan önce dördüncü asırda Theophratus (M. Ö. 320) ve Aristotle (M. Ö. 360) nebat ve hayvanların homojen belirli maddelerden meydana geldiklerini bildirmişlerdir.

* Etlik. Vet. Bakt. Enstitüsü Müdürü.

** Etlik Vet. Bakt. Enstitüsü Doku Kültürü Lâb. Şefi.

O tarihten 2 bin sene sonra Hooke'un mikroskopyu bulması ve inkişaf ettirmesi ile (1667) Theophrastus'un Fiber (Lif) ve Aristotile'nin Bone (Kemik) diye isimlendirdikleri maddelerin homojen küçük ünitelerden meydana geldiğini göstererek bunlara Hücre adını vermiştir.

Hooke'un Hücre, Brown'ın Nucleus, Dujardin'in Protoplasm'dan müteşekkil üç fikir mahsulü bu madde hücre teorisine bağlı olarak kristalleştirilip (1838), bir botanist olan Schleiden (1838) ve bir zoologist olan Schwann (1839) taraflarından formülleştirildi.

Harisson (1907) kurbağa neuroblastını kültüve ederek fibrillaların merkezden itibaren gelişmelerini tetkik etti. Bu belkide ilk muvaffakiyetli doku kültürü idi.

Burrows ve Harrison (1910) civciv hücrelerini üretmede lenf yerine kan plazması konması fikrini ileri sürdüler.

Burrows ve Carrel (1912) embriyo mayii kullanmakla beslenme ve üremenin daha iyi olacağını ileri sürerek çeşitli dokuların üretilmesi metodlarını inkişaf ettirdiler.

Bu sıralarda Warren ve Margaret Lewis özel gıda vasatları üzerinde dikkatle çalışmaya başladılar. Tuzların, Karbon hidratların hücre üzerine tesirleri, osmotik kudret, ve diğer faktörler üzerindeki çalışmalarla hayvani doku hücrelerinin üretilmesi metodu ortaya konmuş oldu.

Müteakip on sene içinde 1910 dan 1920 ye kadar ise doku kültürü çeşitli hayvanlardan ne kadarının, hangi dokularının ne kadar zaman kültüve olabileceği üzerinde geniş olarak araştırılmasında kullanılmıştır.

Eberling ve Baker (1923 - 1939)... v esonrada Fischer tarafından doku mayilerinin filtrasyon, diyalis, presipitasyon ve özel ekstraksiyonlarının kolay metotlarla analizi önemli yardım yapmıştır.

Maitland ve Maitland (1928) basit bir vasat içine koydukları doku ile virus üretebilmişlerdir.

White (1931) ilk olarak bir çok hücre kültürü yapımına başladı.

Carrel ve Lindbergh (1938) organ kültürlerinde müşterek çalıştılar.

Gey (1933) Carrel şişesi yerine daha pratik olan roller tüp metodunu ortaya koydu. Gey'in Roller tüpü inkişaf ettirilerek bir çok suşların durumunu tetkik için pek çok tecrübede kullanıldı.

Morton, Morgan ve Parker (1950) belirli gıda maddelerini inkişaf ettirdiler.

Earl 1947 den beri plazma yerine selofan koymak, gıda vasatının değerini kaybettirmeden memnuniyet verici olarak sterilize etmek suretiyle birçok hücre kültürleri üzerinde önemli çalışmalar yapmıştır.

Murray 1953'de doku kültürü bibliografisi neşretmiştir.

Geçmişteki hücre kültürü tekniği altı esas içinde toplanıyordu :

1 — Hücre tipleri ve kullanılan vasatın kimyevi hususiyetini havi hücre besisi.

2 — Hücrenin hayat tarzının tecrübe ve kontrolüne ait : hücre metabolizması.

3 — Hücrenin yaşamak için yapmış olduğu : hormonal münasebet.

4 — Hücre ve hücre guruplarının çoğalmak için gösterdikleri faaliyet : Hücre çoğalması.

5 — Gıda, Hormon, metabolizmaya bağlı olmayan, hücre dışı zararlılara karşı hücre ve dokuların cevabı : Patoloji

6 — Özel karakterlerine bağlı belirli hücrelerin taşıdığı hayat tarzı : Genetik

Sen yıllarda doku kültürü tekniğinin inkişafı, mikrobiyoloji ve Virolojide kullanılması hastalıkları tanımamıza büyük yardım etmiştir. Veteriner tababette, doku kültürü ile araştırma teşhis ve münasip hayvan dokularında virus üretiminde büyük faydalar sağlanmıştır.

Ehli hayvanların birçok enfeksiyöz hastalıklarında amilin virus olmasına rağmen çalışmak için yeteri kadar patolojik materyalin temin edilememesi, münasip bir izole ve idantifiye metodu olmamasından zorluklar çekilmiştir.

Enders ve arkadaşlarının poliomyelitis virusunu insan hücrelerinde üretmeye muvaffak olmaları ve bu üremenin hücrede sitopatolojik değişim hasıl etmesi, virolojistin elinde bir çok viral ajanların izole, idantifiye ve kültüre edilmelerinde yeni bir alet olarak yer aldı.

Dulbecco hayvan viroloji tecrübeleri için plâk tekniği sistemini ortaya koydu.

Enfeksiyöz canin hepatitis virusunu üretmek için Muller, Thor-
dar - Christensen, Fieldsteel ve Emery köpek plazma doku kültürü
kullanmışlardır. Bu şahıslar köpek böbreği doku kültürü de yap-
mışlardır.

Cabasso ve arkadaşları aynı virusun Roller tüp köpek böbreği
dokusunda mükemmel ürediğini bildirmişlerdir. Mc. Clain ve mesai
arkadaşları veziküler ekzantema virusunu kültürüde domuz embrio
materyali plazma kültürü kullanmışlar. Madin ve Traum bu virusu
domuz böbrek ve testis dokusu monolayerinde üreyebileceğini ra-
por etmişlerdir. Mc. Clain ve Hackett yapılan çeşitli monolayer do-
ku kültürlerinde veziküler stomatitis virusunun üreme durumları-
nı grafiklerle izah, Bachrach ve arkadaşları da aynı virusun kobay
böbrek monolayer kültüründe ürediğini bildirmişlerdir.

Sellers şap, vezikülerstomatitis viruslarını domuz ve sığır böb-
rek monolayer hücre kültürlerinde üretmiştir. Madin ve arkadaşla-
rı sığır böbreği monolayer hücre kültürünü sığırların rinotrahitis
virusunu izole etmede kullanmışlardır.

MATERYAL VE METOT

Cam kapların yıkanması : Kullanılmış kaplar (Erlenmayer, be-
herglas, pipetler, dereceli ölçekler, şişeler) önce musluk suyunda yı-
kanarak kaba maddeler giderilir. Sonra bunlar % 01 nisbetinde
Na₂CO₃ ihtiva eden distilesu içine bırakılır. Kaplar içlerinde hava
kabarcıkları kalmamak üzere bu su ile doldurulur. Hava kabarcık-
larının bulunduğu yerlerde kalan proteinler iyice yıkanamıyacağı-
ndan böyle kaplar kirli görünüşlü olduğu gibi bilhassa hücre üre-
mesine engel olur. Sodyum karbonat solüsyonuna bırakılan cam
kaplar 65°C de bir saat ısıtılır ve fırça ile iyice fırçalanarak yıka-
nır. Çeşme suyunda her biri en az altı defa doldurulup boşaltıl-
mak suretiyle akar sudan geçirilir. Musluk suyunda yıkanan kap-
lar ayrı iki kaba konan, I ve II No ile işaretlenen distile sudan
önce bir No dan sonra iki No dan üçer defa doldurulup boşaltılmak
suretiyle geçirilir. Son olarak gene ayrı, ayrı iki kapta bir ve iki
No diye isimlendirilen içi deionize su bulunan kaplardan odistilede
geçirildiği şekilde muamele edilir. Son yıkanan deionize suda krli-
lik kmilyonda birden yukarı olmamalıdır.

Yıkanan kaplar ağızları aşağı gelmek üzere adi süzgeç kâğıtla-
rının üstüne konur, kurutulur. Roux buvati, erlenmayer, beherglas,
dereceli ölçekler ve şişelerin ağızları alüminyum kâğıtla kapatılır.
Pipetler alüminyum kaplı pipet kutularına, tüp vesaire ise, cam kap-

lara konarak kuru havada takım olunur. Doku kültüründe kullanılacak kapların ağızları hiç bir vakit kâğıt ve pamukla kapatılmaz. Çünkü pamuk voletil asit ihtiva ettiğinden hücre üremesine zarar verebilir. Petrol esaslı ve hayvani yağlarla bulaşmış kaplar ayrıca yıkanmalı zira sodyum karbonatlı su bunları çıkaramadığı gibi yağlı olmayan diğer kaplarda bunlarla müşterek yıkandığında bu yağlarla bulaşabilir. Böyle yağlı kaplar konsantre sülfürik asit mahlülünde tutulur çeşme suyunda yıkanarak yukarıdaki yıkama ameliyesine terk edilir.

Lâstik mantarların hazırlanması : Yeni mantarlar bir saat % 01 sodyum karbonat solüsyonunda 65°C de kaynatılır ve üç ayrı distile suda yıkanır. Kullanılmış mantarlar ise musluk suyuna konur ve yalnız distile suyla kaynatılır. Hepside deionize sudan geçirilip otoklav'a verilir.

SERUM : Hücre üretiminde çeşitli hayvan serumları kullanılmaktadır. Biz koyun seromu kullandık. Şap hastalığı geçirmediği bilinen ve enstitüde muhafaza olunan koyunlardan kan alınıp serum alâkadan ayrılarak binbeşyüz - ikibin devirde santrifüje edildi. Üst mayi alınarak her santimetre küpe 100 ünite penisilin, 100 mikro gram stoptomisin hesabıyla antibiyotik katarak Seitz EK den filtre edildi, + 4°C de muhafaza olundu.

FOSFAT BAFFIR SOLÜSYONU (PBS) :

Aşağıdaki terkibe göre hazırlandı.

NaCl	8	Gr.
KCl	0.2	Gr.
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	2,172	Gr.
KH ₂ PO ₄	0,2	Gr.
Deionize su	1000	cc.

Otoklavda tâkim edilerek + 4°C de saklanır ve günlük işlerde kullanılır. Normal PBS de bulunan CaCl₂ ve Mgcl₂6H₂O yukarıdaki terkipde kullanılmadı. Çünkü bu iki madde tripsinin faaliyetini aksatıyor.

Tripsin solüsyonu :

Yukarıda terkibi yazılı PBS solüsyonu bir eritici olarak kullanılıp, bir litreye 1/250 Bacto tripsinden 2,5 Gr. katmak suretiyle (% 0,25 nisbetinde) hazırlandı. Antibiyotiklerde ilâve olunarak Seitz EK dan süzöldü. + 4°C de muhafaza edildi.

GIDA VASATI :

Biz doku kültürü çalışmalarımızda yalnız Hanks vasatı kullandık. Ve bunu da ekseriya 5,5 litre üzerinden yaptık.

VASATIN TEKİBİ

NaCl	40	Gr.
KCL	2	Gr.
MgSO ₄ 7H ₂ O	1	Gr.
KH ₂ PO ₄	0,3	Gr.
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	0,535	»
Glucose	5	»
Phenol Red (% 10 luk)	5	cc.
CaCl ₂	0,7	Gr.
NaHCO ₃	1,750	Gr.
Lactalbumin Hydrolized	25	»
Deionize su	5500	cc.

Yapılış şekli : 3,5 litre deinozie su 6 ilâ 10 litrelik bir balona konup otoklavda taksim edilir. Münasip bir balona veya erlenmayere birer litre deinoize sudan konarak ayrıca iki litre suda hazırlanır. Yukarıda miktarları bildirilen maddeler sıra ile tartılarak (fenolred hizasına gelinceye kadar) bir balonun içerisinde eritilir. Bundan sonra sodyum bikarbonat tartılıp katılır. Bütün bu maddeler eridikten sonra kalsiyum klorür azar, azar dökmek ve karıştırmak suretiyle katılır. Kalsiyum klorürün en son katılmasındaki sebep bulanıklı kve bazen tortu yapmasındandır. Ve son olarak da fenolret ilâve edilir. İkinci balondaki deinozie su içine 25 Gr. laktalbumin hidrolozed tartılıp konur, erimeye terk edilir. Bunun normal derecede erimesi uzun sürdüğü için 50 - 60 derecedeki sıcak suda tutulması erimeyi kolaylaştırır. Vasata girmesi icap eden antibiyoikler : Penisillin 500,000 Ünite strobotomisin 0,5 Gr. Polimiksin 500,000 Ünite. Bunlar laktalbumin solüsyonu içine katılır. 3,5 litre steril su bulunan balona bu iki madde Seitz EK filtresinden süzülerek karıştırılır. Balonlara taksim edilir. Sterilite kontrolü için her birinden birer miktar tüplere alınarak 48 saat etüvde tutulur. Mayiin PH kontrolü yapılır. PH. = 7,1 - 7,3 olmalıdır.

Hazırlanan bu vasat + 4 derecede saklanır.

BÖBREK TEMİNİ :

Mezbahada henüz kesilmiş, mümkün mertebe genç hayvanlardan olmak üzere steril şartlar altında yağ tabakası ile birlikte

böbrek yerinden alınıp steril kavonoza konularak bekletilmeden labaratuvara getirildi. Bu şekilde mezbahadan temin edilen dana, koyun ve embriyo böbrekleri ile hücre istihsal ve üretilmesine çalışıldı.

HÜCRE İSTİHSALI :

Lâboratuvara getirilen böbrek önce % 1 nisbetinde sodyum hipoklorit solisyonunda bir dakika tutularak dezenfekte edildi. Sonra PBS. le iki defa yıkandı. Yağ tabakası kapsüla üzerinden tamamen temizlenerek kapsula soyuldu. Böbreğin Korteks kısmı medüllaya dokunmadan geniş bir petri kutusu içine ince bir tabaka halinde kesildi. İki böbrek hasılatı bir petri kutusunda toplanarak 3 - 4 mm. çapında olmak üzere kıyıldı. Kıyılan bu doku PBS ile bir kaç defa mayi berrak oluncuya kadar yıkandı. İçinde mağnetik çubuk olan 500 cc. lik erlenmayer'e kondu. Erlenmayere konan dokular iki metotla tripsinize edildiler.

a) 37°C lik su banyosunda tutulan tripsinli PBS den 120 cc. kadar erlenmayere koyarak 5 dakika su banyosunda tutuldu. Buradan alınıp, 5 dakikada mağnetik cihazda ajute edildi. Üsteki mayi döküldü, yeniden aynı miktar tripsinli PBS kondu. Bu defa su banyosunda 10 dakika, mağnetik cihazda 5 dakika tutularak ajute olundu. Gene üsteki mayi döküldü. Tekrar 200 cc. tripsinli PBS kondu, 1 - 2 saat oda derecesinde ajute edildi.

b) Yıkanmış böbrek dokusu üzerine doğrudan doğruya 200 cc. tripsinli PBS konarak + 4°C de ki soğuk odada bir gece mağnetik cihazda ajute edildi. Tripsinize olan doku üst mayii, steril tülbentten süzülüp, 800 devirde (rpm) santrifuje olarak üsteki mayi atıldı. Çöken hücre üzerine bir miktar Hanks vasatı konarak karıştırıldı., dereceli santrifuj tüpleri ile tekrar 800 devirde santrifuje edildi. Üstteki mayi atıldı, kalan hücre miktarı tesbit olunarak aynı miktar serumlu Hanks vasatı ile karıştırılarak yapışık olan hücreleri bir birlerinden ayırmak için pipetle bir kaç kere çekilip boşaltıldı.

HÜCRE ÜRETİMİ :

Tripsinize edilerek ayrılan ve santrifuj suretiyle yıka...nan böbrek hücreleri 10 % serumlu Hanks vasatı ile (Üretme vasatı) 1/200 nisbetinde suspanse edildi. Bu suspansiyondan Roux buvatına 100 cc. 4 onzluk şişelere 15 cc. ve tüplere de 4 cc. olmak üzere taksim edildi. Üremesi için 37° lik etüve kondu. 48 saat sonra hücre-

lerin şişe sathına yapıştıkları makroskopik ve mikroskopik olarak görüldü.

Ekimden 3 gün sonra vasat değişildi, yeniden Hanks vasatı kondu ve 4 gün daha üremeye terkedildi. 7 gün sonunda hücrelerin şişe sathını kapladığı, yani monolayer hasıl olduğu mikroskopik olarak görüldü. Ekimden 6-7 gün sonra hasıl olan monolayer virus ekimi için elverişli hale geldi.

BÖBREK MONOLAYER VE SUSPANSE HÜCRELERİNDE VİRUS ÜRETİMİ:

Hücre ekiminden 7 gün sonra satıhlarında monolayer hasıl olan roux buvatı ve 4 onzluk şişelerle, doğrudan doğruya 1/200 nisbetinde hücre ihtiva eden serumlu Hanks vasatı konan erlenmeyerlere 1/10 nisbetinde Hanks vasatı ile dilüe Şap virusu 0 tipi sığır pasajı laboratuvar suşundan buvatlara 5 cc. 4 onzluk şişelere 2 cc. olarak ekildi. Virusla hücrenin direkt temasını temin için yarım saat 37°C etüvde tutuldu. Serumsuz Hanks vasatından buvatlara 60 cc. 4 onzlara 10 cc. konarak 37°C etüvde 24 saat üremeye terk olundu. Zaman zaman mikroskop altında virusun hücrelerdeki stopatolojik tesirleri kontrol edildi. Enfekte hücrelerin normal şekillerini kaybederek yuvarlak şekil aldıkları, bu halin ilk pasajlarda geç ve az, sonraları çabuk ve çok husule geldiği görüldü.

İlk pasaj virusu ile memedeki farelerde yaptığımız titrasyondan iyi sonuç alınamadı. Pasajlara devam olundu, zaman zaman 5-8 günlük yavru farelerle yapılan titrasyonlarda en fazla titre LD₅₀10⁻⁵ alındı. Buna karşılık doku kültürü ile yapılan virus titrasyonlarında LD₅₀10^{-7,2} titre bulundu. Böbrek hücresi monolayer kültürlerinde virus 45 defa seri pasaj edildi.

İçinde 300 cc.... hücre suspansiyonu ve mağnetik çubuk bulunan 500 cc.lik erlenmayere aynı virustan 10 cc ekilerek 37° Clik etüvde mağnetik cihazda ajute ederek 24 saat tutuldu. Böylece 3 seri pasaj yapıldı. Bazı imkânsızlıklar sebebiyle pasajlara devam edilemedi.

Bu iki virus üretiminden gayrı ayrıca 1/5 nisbetinde Hanks solüsyonu ile dilue edilen sığır vezikül mayi 0 tipi şap virusu 7-8 günlük Monolayer hücre kültürüne yukarıda izah edildiği şekilde ekildi. Üzerine bu defa % 10 serumlu Hanks vasatı konarak 24 saat etüvde tutulduktan sonra cam filtreden süzöldü. Bu şekilde her 24 saatte bir pasaj yapmak suretiyle 7 pasaj yapıldı. 8 nci pasaj 10 günlük Monolayer hücre kültürüne yapılıp üzerine serumsuz Hanks kondu ve 37 derecelik etüvde 24 saat üretildi. Bu 8 nci pasaj

virusu ile bir seri 36 ve 40 ncı pasaj virusları ilede birer seri olmak üzere tecrübi olarak üç seri inaktive ve aliminyum hidrokside absorbe aşı hazırlandı. Bunların siterilite ve deneme hayvanlarındaki zararsızlık kontrolleri yapıldı. Immunité kontrolleri için henüz sığır temin edilemedi.

NETİCE VE MÜNAKAŞA :

Üç çeşit böbrek ile yapılan çalışmada böbreklerde hücre istihsalinde embriyo böbreği daha kolay ve çok miktarda hücre verdi.

Hücrelerin üremelerinde esaslı bir fark görülemedi. Çünkü emriyo böbreği ile ancak iki defa çalışıldı. Böbrek nescini tripsinle muamelede bir gece + 4 derecede tripsinlemeye bırakmak diğer sisteme nazaran daha pratik ve hücre temini bakımından müşkülâtsiz bulundu. Böbrek hücresi Monoleyer üretiminde bir çok güçlüklerle karşılaşıldı. Bunların başında kapların yıkanması gelmektedir. Bazı serilerde aynı şartlar altında yapılan hücre üretiminde bu vat ve şişelerden bazılarının iyi ürettiği, bazılarının zayıf ve bir kısmında da hiç ümediği görüldü. Bu da gösteriyorki yıkamanın hücre üremesinde büyük önemi vardır. Gıda vasatında seromun az veya çokluğu da üremede mühim rol oynamaktadır. % 10 ve % 5 lik serum kullanılan hücre kültürlerinde % 10 lukların % 5 liklere nazaran daha iyi ürettiği bariz olarak kendini göstermiştir. 15 - 20 gün muhafaza edilen kültürlerde hücrelerin uzun, şişkin ve granüllü şekillerine rastlandı. Bu halin husulü vasatın sık, sık değiştirilememesi ve hücrelerin ihtiyarlaması sonucu meydana geldiği düşünüldü. Yapılan hücre kültürlerinin çoğu virus üretmede kullanıldı. Embriyonun her istendiği zaman bulunamaması, mezbahada kesilen koyunların değişik yaşlarda olması ve üretmek istediğimiz virusa sığırların daha hassas olması, mezbahada kesilen danaların yaşlarının az çok tahmin edilmesi gibi düşüncelerle dana böbreği ile çalışmak uygun görüldü ve bütün kültürler bu yönde yapılmaya başlandı. Virus üretiminde bidayette üremede güçlük ve kontaminasyonlar olmuşsada zamanla bunların önüne geçildi. Doku kültürü çalışmaları kimyaca saf maddelerin kullanılmasını, yıkamanın tekniğe uygun olarak yapılmasını her hangi bir ihmâl ve lâkayidi gösterilmemesini istiyen bir mevzuudur.

Ö Z E T

Doku kültürü çalışmalarında dana, koyun ve embriyo böbreği olmak üzere üç nevi böbrek kullanıldı. Fazla hücre istihsal edilme-

si dolayısı ile bir gece tripsinlenmiye terk edilmesi tercih olundu. Monolayer böbrek hücresi üretimi embriyo böbreği temininin güç oluşu, koyunların ekseriya yaşlı kesilmeleri gibi sebeblerle dana böbreği ile yapıldı.

10 % koyun serumunu ihtiva eden Hanks vasatı ile hücreler daha iyi üredi ve 7 gün sonra ekime hazı rhale geldi.

Dana böbreği monolayer hücre kültüründe 0 tipi şap virusu 45 defa pasaj edildi. 36 ve 40 ıncı pasaj virusları ile inaktive deneme aşısı hazırlandı.

Suspense böbrek hücresi ile 0 tipi şap virusu 3 defa pasaj edildi. daha fazla pasaj imkânsızlıklar dolayısı ile yapılamadı.

Doku kültürü çalışmalarında rehberlik eden, gerek teknik ve gerekse ilmi yardımlarını esirgemiyen, karşılaştığımız müşkülleri halletmek için gayret gösteren F A O mütehassısı Dr. W. M. Molton'a teşekkürü bir borç sayarız. Bu çalışmaya gayret ve samimiyetle yardım eden kıymetli lâboratuvar arkadaşları mütehassıs Erdoğan Finci, Asistan Necati Ünlüleblebici, Güngör Okay ve Halil Örün'e de ayrıca teşekkürler ederiz.

S U M M A R Y

In experiments with tissue culture, three kinds of kidneys, namely, Calf, Sheep and embryo kidneys have been used. Due to excessive amount of cell production, at + 4° C Over night was preferred.

Kidney monolayer tissue culture was obtained through the use of calf kidney, because of difficulties of obtaining embryo kidney and due to the old age of sheep slaughtered.

Better cultivation of the cells was obtained with Hanks media which included 10 % Sheep sera. They were ready for use at the end of 7 days.

T type of Foot and Mouth Diseases virus has been passaged 45 times on monolayer cells cultur, obtained from calf kidney.

Inactivated vaccine was prepered with viruses of the 36 th and 40 th passages.

With kidney cell suspansion, 0 type virus of foot and mouth diseases has been passaged 5 times. No further passages proved to be possible.

L İ T E R A T Ü R

- 1 — Arda M. : A. Ü. Vet. Fakültesi Yayınları 107.
- 2 — Bachrach, L. H., Callis J. J., Hess. R. W. and Patt. E. R. : Virology, Vol. 4, No. 2, Octob. 1957.
- 3 — Bachrach L. H. : Virology, Vol. 12, No. 2, Octob. 1960.
- 4 — Brown F., Cartwright. B. and Stewart L. Doreen : Biochemica et Biophysica Acta 47 (1961).
- 5 — Brooksby B. J. and Ella Wardle : The Journal of Hygiene, Vol. 52, No. 1, March 1954.
- 6 — Comeron G. : Tissue culture teschnique 2nd. ed. 1950.
- 7 — Carl. J. De Boer and Howard L. Bachrach : The Journal of Immunology Vol. 86, No. 3, March, 1961.
- 8 — Fellowes N. O. : Annals of the New York Academy Sciences. Vol. 83, A-4, Jan. 1960.
- 9 — Galloway A. Ian : The Journal of the Royal Agricultural Society of England, Vol. 117, 1956.
- 10 — Hess. R. W. Bachrach L. H. and Callis J. J. : The Ame. J. of Veterinary Research. Vol. 21, No. 85, Novem. 1960.
- 11 — Marchant D. J, Hahn R. H. and Murply W. H. J. R. : Hand book of cell and organ culture. 1960.
- 12 — Martin B. W. and Chapman G. W. : Research in Veterinary Ccience. Vol. 83, No. I, Jan. 1961.
- 13 — Moulton M. W. : (Özel notları)
- 14 — Özsoy. A. : Türk Vet. Hek. Dergisi. Sayı : 124-125, 1957.
- 15 — Patty E. R. Bachrach L. H. and Hess R. W. : The Ame. J. Vet. Research, Vol. 21, No. 80, Jan. 1960.
- 16 — Pledger A. R. and Palatnick J. : Journal of Bacteriolohy. Vol. 83 No. 3.
- 17 — Palatnick J, and Pledger A. R. : The Society for experimental Biology and Medicine. Vol. 109, 1962.
- 18 — Platnick J. and H. L. Bachrach : The Society for experimental biology and medicine Vol. 105, 1960.
- 19 — Platnick J. and Bachrach L. H. : Virology, Vol. 12 No. 3, Novem. 1960.
- 20 — Pay F. W. T. : The Veterinary Record. Dec. 1957.
- 21 — Pay F. W. T. : Nature, Vol. 177, April, 1958.
- 22 — Patty E. R. and H. J. May : The Ame. J. Vet. Research, Vol. 22, No. 90, Sep. 1961.
- 23 — Pledger A. R. : Virology, Vol. 13, No. 3, March, 1961.
- 24 — Sellers F. R. : Band IX, Heft 5, 1959 des. Archiv für die gersemte virusforschung.
- 25 — Sellers F. R. : The Royal Society of Medicine. Vol. 50, No. 10, Oct. 1957.
- 26 — Sellers F. R., Burt M. Lesley, Alison Cumming, and Stewart L. D. : Band IX, Heft 5, des. Archiv für die gesamte virusforschung.
- 27 — Sheila F. Cartwright, T. W. F. Pay and W. M. Henderson : The Journal of general Microbiology, Vol. 16, No. 3, JUNE, 1957.
- 28 — White P. R. : The cultivation of Animal and Plant cells. 1954.

Koyunlarda Mavi Dil hastalığı ve aşı hazırlama tekniği (Blue Tongue and blue Tongue Vaccine - Modified Live Virus-chick Embryo Origin-Vacuum Dried)

Erdoğan FİNCİ (*)

Güngör OKAY (**)

Ö N S Ö Z

Komşumuz Suriye ve Irak'ta Mavil dil hastalığının devamlı olarak bulunması ve her an güney hudutlarından geçmesi ihtimaline karşı, koruyucu bir tedbir olarak Veteriner İşleri Genel Müdürlüğünün isteğiyle, F.A.O. Ankara Mümessili Dr. W. MOULTON'ın nezaretinde Etlik Veteriner Bakteriyoloji Enstitüsü Şap Seroloji ve Doku Kültürü lâboratuvarında mavi dil aşısı hazırlanmıştır.

L İ T E R A T Ü R B İ L G İ S İ

GENUS TORTOR — Tortor ovis — Blue Tongue — MAVİ DİL.

VİRUS: Blue Tongue virus (BTV)

SİNONİMLERİ: Blue Tongue (Mavi Dil), Pseudo Foot and Mouth Disease — Bloutong — Bekziekte — vail bek — Malarial cattarrhal fever.

HASSAS HAYVANLARI: Koyun, sığır. Deneysel olarak süt emen fareler ve yumurta embriyosu.

TARİHÇE: 1876 senesinden beri koyunlarda mavi dil hastalığı bilinmektedir. Virus 1905 senesinde THEILER (7) tarafından bulunmuştur. Hastalık daha ziyade yağışlı senelerde ilkbahar ve yaz aylarında devam eder. 1932 senesine kadar hastalığa tabii olarak yalnız koyunların tutulduğu zannediliyordu. Fakat BEKKER ve arkadaşları (7) nın bildirdiğine göre hastalık kuzey Afrika'nın birçok yerlerinde sığırlara da bulaşmaktadır. Mavi dil hastalığının Kıbrıs'ta, Suriye'de, İsrail'de, Doğu Afrika'da ve Amerika'nın bazı eyâletlerinde de bulunduğu bildirilmiştir (3).

(*) Şap Seroloji ve Doku Kültürü Lâb. Mütahassısı.

(**) Şap Seroloji ve Doku Kültürü Lâb. Asistanı.

ERDÖL (2) e göre memleketimizde 1944 yılı sonbaharında bu hastalık Hatay bölgesinde zuhur etmiş ve yüzlerce koyunun ölümüne sebep olmuştur. Hastalığın Suriyeden bulaştığı bildirilmiştir. Hastalık müteakip senelerde yine aynı mevsimde zuhur etmiş ise de mahdut vukuatla kısa sürmüştür.

VİRUSUN HUSUSİYETLERİ : Mavi dilin elementer cisimciklerinin uzunluğu 100 milimikrondur. Bütün viruslar gibi bekletilmeye karşı dayanıksızdır. Buna rağmen virus ihtiva eden kan, oda derecesinde en az 2 sene aktif kalabilmiştir. NEITZ (7) ın bildirdiğine göre 25 sene sonra da canlı bulunabilmiştir. Virusun bulunduğu bölgelere göre antijenik durumu çok az farklı birçok tipleri vardır.

VİRUSUN YETİŞTİRİLMESİ : Mavi dil virusu (BTV) yetişkin yumurta embriyosuna adapte edilebilir. En iyi yetişmesi 8 günlük yumurta sarısında olur. Aynı zamanda chorio - allantoic - membranda da (CAM) yetiştirilmektedir. (6). İnokulasyondan sonra yumurtalar 24 saat 35° C da bırakılır. 24 saat sonr a33,5° C lik inkubatöre konur. Virusun karakterine bağlı olarak 3 - 4 gün içinde ölüm husule gelir. (11). Virusun başlangıçta embriyoya adaptesi biraz güçtür. Bununla beraber riboflavin noksanlığı ile beslenmiş tavukların yumurtasına adaptasyonunun daha kolay olduğu kaydedilmektedir. Böyle yumurtaya adapte olduktan sonra normal yumurtaya adapte olması gayet kolaydır. Mavi dil virusu (BTV) Mc. KERCHER (7) in tavsiye ettiğine göre yumurtanın chorio - allantoic - membranına (CAM) inokule edilirse, adaptasyon daha da kolay olmaktadır.

LORANT ve LOYD (5) iki Amerikan mavi dil (BTV) suşunu sığır böbrek hücre kültüründe yetiştirmişlerdir. Aynı araştırmacılar doku kültüründen bir aşı da hazırladıklarını bildirmektedirler. HAIG (12) beş tane mavi dil (BTV) suşunu koyun böbreği hücre kültürüne adapte etmiş ve karakteristik cyto - pathologic (CP) değişiklikleri incelemiştir.

Süt emen farelere de virus adapte edilebilmiştir (5). Farelere inokulasyon intracerebral olarak stok virusun (% 50 yumurta embriyonu suspansiyonu) % 1 dilusyonundan 0,03 cc. yapılmıştır. İlk inokulasyonda değişiklik meydana gelmemiş fakat 3ve daha fazla kör pasajlardan sonra 5 ve 6ncı farelerin çoğu ölmüştür. Enfekte fare beyin suspansiyonunun 1/10 dilusyonu ile sığır böbrek hücre kültürüne inokule edildiğinde cyto - pathologic (CP) değişiklikler meydana gelmiştir.

BULAŞMA : Mavi dil temas ile bulaşmaz. Rakım itibariyle yüksek olmayan, yağmurlu ve sıcak iklimlerde ilkbahar ve yaz aylarında görülmesi hastalığın at vebası gibi mevsime bağlı olduğunu gösterir. Gene at vebasında olduğu gibi Afrika ve Amerika'da Clucoides cinsi sineklerin hastalığın bulaşmasında önemli bir rol oynadığı kabul edilmiştir. Bulaşmada kan emici sineklerin bulunması hastalığın yayılmasında önemli bir faktördür. Melaphagus ovinus'un da mavi dilin bulaşmasında rolü olduğu kaydedilmektedir. Kanada'da yapılan deneysel çalışmalarda bu hususta epeyce malûmat toplanmıştır. Bu deneylerde Kıbrıs suşu (3 - Cyprus strain) kullanılmıştır (7).

Bazı koyunların, sığırların ve hattâ (Blesbuck) Afrika antiloplarının virusu taşıdıkları ve hastalığa yakalanmadıkları bir problemdir. Sığırların kanında virus, inokülasyondan 24 gün sonra da bulunabilmiştir. Koyunlarda inokülasyondan sonra virusun kanda kalma müddeti 60 gün kadardır.

HASTALIĞIN SEMPTOMLARI : Mavi dil koyunlara bulaştıktan 2 gün sonra hayvanların derecesi yükselir. Bazılarında yalnız derece yükselmesi olur ve hayvan kısa bir zamanda iyileşir. Diğerlerinde hastalığın tipik şekilleri görülür. Ağızda hassasiyet ve ağrı, yemede güçlük, dilin, dudakların ve damağın şişmesi siyanöz bir durum alması, burunda akıntı, ishal, ilerleyen bir zayıflık ve nihayet ölüm. Koyunlarda ölüm % 30 civarındadır.

Sığırlardaki semptomlar da koyunlardakine benzer. Ağızdan salya akması, devamlı çiğneme hareketi burunda akıntı, erozyonlar ve kabuklaşma. Bazı hallerde boyun, sırt ve kuyruk etrafındaki deride (X Disease) denilen hyper keratosis meydana gelebilir. Ayakların koronar sahasında ve meme başlarında şişlik ve yangının bulunduğu da kaydedilmektedir. Fakat MASON ve NEİTZ (5) deneysel inokülasyonlarla sığırlarda bu lezyonları husule getirememişlerdir. Bazan sığırlarda da ölüm husule gelirse de, büyük bir çoğunluğu iyileşir.

PATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER : Mavi dilde önemli patolojik değişiklikler daha ziyade ağızda ve dilde bulunur. Ağızda epitel tabakasının dökülmesinden sonra mukoz membranlarda hiperemi meydana gelir. Ülser dudakların iç kenarında, damakta ve dilde görülür. Dil epitel tabakasının dökülmesi ile mavi (MAVİ DİL) ve ekseriya gangrenöz bir hale gelir. Mide ve barsakların mukoz membranları hiperemik ve ödematözdür. Bazan mide ve barsaklarda küçük hemorajilere de rastlanabilir.

TEŞHİS: Mavi dilin kat'i teşhisi hassas koyunlara virus verilerek izolasyon ve identifikasyonu ile ve bağışık koyunlarda koruma testi ile yapılır. Mavi dil bazan şap (FMD) veya sığır vebası ile (Rinderpest) karışabilirse de, son iki hastalığın temas yolu ile çok çabuk yayılması mavi dilin ise, temasla yayılmaması ile ayırt edilebilir. Teşhiste complement fiksasyon testinden de faydalanılmaktadır. Fakat neticeye çok zor gidildiğinden bu metod teşhiste fazla kullanılmamaktadır.

DENEYLERİMİZ

Hepsi de 60 pasajda embriyoya adapte ve embriyo emülsiyonununun kurutulması ile elde edilmiş viruslar olup ampullerde saklanmaktadır.

<u>Tipler</u>	<u>İ s i m l e r i</u>
1	BİGGARS BERG
2	VRYHEİD
3	CYPRUS
3	THEİLER
5	MOSSOP
6	STRATHENE
7	UTRECHT
8	CAMP
9	UNIVERSITY FARM
10	PORTUGAL
11	NELSPOORT
13	BYNESPOORT
14	KOLWANI
15	EVENLODE

MATERYAL VE METOD: Mavi dil aşısı, modifiye edilmiş uygun bir BTV suşunda hazırlandığı gibi, birden fazla suştan da hazırlanabilir. Her serî aşî zararsızlık, virus titresi ve patojenik mikro organizma ihtiva etmesi bakımından teste tabî tutulur.

METOD: Aşî hazırlama tekniğı hakikatte pek zor değildir. Virus suşunun 8 günlük embriyonlu yumurtada seri pasajlarını yapmak icabetmektedir. Bizim kullandığımız BTV aşî virusu 60 pasajda yumurta sarısına adapte edilmiş MOSSOP TİP 5 suşudur. Embriyonlu yumurtalar 8 gün 37° C da inkubatörde bırakılır. 8 gün sonra yumurtalar kontrol edilir. Canlı olanlar inokülasyon için hazırlanır. Yumurtaların karanlık odada elektrik ışığı altında hava kesesi sınırı tesbit edilir. Yumurta sarısının olduğu yönde (embriyo-

nun aksi tarafında) hava kesesinin işaretlenmiş bulunan sınırından 1 cm. içerde hava kesesi üstünde bir delik açılır. Yumurtalar dik olarak dizilir. İçinde 0,2 cc. inokulum (1 cc. Mossop virus + 9 cc. H₂O) bulunan bir şırınga ile delikten girilir. Ani bir darbe ile zarlar ve sarızarı delinir. Darbe ani olduğundan yumurta zarları nokta halinde delinir ve yumurta sarısı diğer tabakalara dağılmaz. İnokulasyon yapılır ve iğne geri çekilir. Yumurta kabuğundaki delik parafin veya mumla kapatılır. Yumurtalar hava kesesi yukarıya gelmek üzere dik olarak 35° C lık inkubatöre konur. 24 - 48 saat sonra muayene edilir. Bu müddet içindeölenler nazarı itibare alınmaz. 48 saat sonra 33,5° C lik inkubatöre konur ve muayene edilir. Yumurtalar 7 veya 9 günlük ise, yukarıdaki yumurta sarısına yapılan 0,2 cc. inokulum yerine 0,3 cc. kullanılması tavsiye edilmektedir.

Virus suşuna ve inokulumdaki virus titresine bağlı olarak sadece birkaç saat fasıla ile bütün embriyolar 3 - 4 gün içinde ölürler. En yeni ölmüş veya ölmekte olan embriyolar karışım halde toplanır. (Yaptığımız aşıda biz yumurta muhtevisini olduğu gibi topladık) Ölümün perşembe ve cuma günleri olması için ekimlerin pazartesi günleri sabahları yapılması uygundur. Toplanan embriyolara herhangi diluent bir mayi katmadan evvel atomix (mixer) de emülsiyon yapılır. Atomix'in etrafına buz konur ve kısa fasılalarla çalıştırılır. Isınmadan kat'î surette kaçınmalıdır. Atomixte yapılan emülsiyon steril, ölçülü bir silindire dökülür. Aynı miktar distile veya deiyonize su ilâve edilir. Sonra b umiktara müsavi miktar Buffer - Laktoz - Pepton katılır.

BUFFER - LACTOSE - PEPTON VASATININ HAZIRLANMASI

A — KH ₂ PO ₄	26,4 gr.
Na ₂ HPO ₄ - 2H ₂ O	180,0 gr.
Distile su	30 litre

PH 7,4

B — % 2	Difco pepton
% 10	Lactose

A bölümünde ollanlar tartılarak bir kaba konur, pH 7,4 e ayarlanır. Sonra üstüne % 2 hesabiyle Difco pepton (biz Bacto pepton kullandık) ve yine % 10 hesabiyle lactose konur. (Kullanılan pepton neutral pepton olmalıdır. asit olmamalıdır). Bu maddeler iyi-

ce karıştırılır ve eritilir. Pepton sebebiyle pH aside doğru kaydığından tekrar 7,4 e ayarlanır. 1 cc. ye 100 ünite penicilline ve 100 mikrogram streptomycin ilâve edilir. Yarım saat oda derecesinde bekletildikten sonra muhafaza için + 4 derecede buzluğa konur. Lâboratuvarımızda $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bulunmadığından yerine $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (30 litre için 270,0 gr.) kullandık.

Hazırlanmış bulunan yumurta emülsiyonuna Buffer - Lactose - Pepton karıştırıldıktan sonra tekrar atomixten geçirilir. İki katlı tülbentten süzülür. Bu safhada her cc ye 100 ünite penicilline ve 100 mikrogram streptomycin ilâve edilir. 0,75 cc. miktarında ampullere taksim edilir ve freeze - dryer'de kurutulur. Kullanmak için 100 cc. steril suda eritilir ve bu suspansiyon koyunlara 1 cc. olarak subcutan yapılır. (1 cc. = Bir doz), Bu şekilde beher ampul 100 doz aşı eder.

VIRUS TİTRASYONU: Aşılanan hayvanlarda aşının muafiyet meydana getirecek şekilde canlı virus ihtiva ettiğinden emin olmak için virus titresini tâyi netmek lâzımdır. Hazırlanan son aşı 10 misli (asgarî 5 misli) sulandırılır. Herbir dilusyondan 8 günlük yumurta sarısına 0,2 cc. inokule edilir. 48 saat sonra ışıktaki muayeneye tabî tutulur, ölenler atılır ve test'te nazarı dikkate alınmaz. İnokulasyondan 5 gün sonraya kadar sabah ve akşam yumurtalar muayene edilir. LD₅₀ hesapları REED ve MUENCH metoduna göre yapılır.

KABUL EDİLEN TİTRE: Emülsiyonun kurutmadan evvelki titresini standart olandan aşağı titrede olmamalıdır. Titre log, 5 den aşağı düşmemelidir. Her virus suşu için standard bir titre kabul edilmektedir. Donarak kurutulduktan sonra aşığı 7 gün 37° C da inkube ederiz. Bu müddet zarfında titredeki düşüş log. 0,5 den fazla olmamalıdır. Bütün emülsiyonlar + 4 derecede muhafaza edilmelidir.

Birkaç kelime ile şunu da kaydetmek yerinde olur ki, yaptığımız bu mavi dil (BTV) aşısı tek bir virus aşısıdır. Dört veya daha fazla aşı emülsiyonu freeze - dryer'e konmadan müsavi miktarda karıştırılmakla polivalan aşı hazırlanmıştır. Birçok suşların bir araya getirilmesi daha komplike bir iştir.

MOSSOP TİTRASYON: Yapılan aşidan birini kurutulmadan evvel, diğeri kurutulduktan sonra olmak üzere iki defa LD₅₀ (Reed ve Muench) tâyini yapılmıştır.

A — Kurutmadan evvel :

1 cc. virus dilusyonu + 9 cc. H₂O

10^{-3} den 10^{-9} a kadar dilusyonlardan (her dilusyondan 5 yurttaya) 0,2 cc. yumurta sarısına inokule edilmiştir. Reed ve Muench metoduna göre LD_{50} $10^{-6,2}$ bulunmuştur.

B — Kurutulduktan sonra :

0,75 cc. tüpteki virus, 0,75 cc. H_2O ile eritilmiş ve bundan 10 misli dilusyonlar yapılmıştır. 10^{-3} den 10^{-9} dilusyonuna kadar 8 günlük yumurta sarılarına her dilusyondan 5 adet olmak üzere 0,2 cc. inokule edilmiştir. Yumurtalar aşı hazırlanması kısmında bahsedildiği gibi 48 saat $35^{\circ} C$ de bırakılmış, sonra $33,5^{\circ} C$ de inkubatöre konmuştur. 2nci günden 5inci güne kadar ölenler her gün muayene edilerek Reed ve Muench metoduna göre LD_{50} $10^{-5,6}$ bulunmuştur.

STERİLİZASYON TEST'İ : Sterilizasyon testlerine pek lüzum yoktur. Fakat son hazırlanan aşı, patogen mikro organizmaların mevcudiyetini ortaya koymak için, farelerde test'e tabî tutulur. En az 8 fare, son hazırlanan aşidan 0,5 cc. intraperitoneal yolla inokule edilir. Müşahade müddeti inokulasyondan sonra 7 gündür Testin memnuniyeti verici olması bu farelerin canlı kalması ve aşıya ait herhangi bir semptom göstermemesiyle kaimdir.

ZARARSIZLIK KONTROLU : Daha evvel mavi dile karşı aşılammış kuzulara subcutan olarak asgarî 2 cc. aşı tatbik edilir. Bu hayvanlar hergün müşahade altında bulundurulur. Enjeksiyonun yapıldığı günden başlamak üzere 14 gün müddetle (pazar günleri hariç) her gün dereceleri alınır. Kontrolun tatminkâr olması için 14 günzarfında hayvanların mavi dil hastalığının belirli semptomlarını göstermemesi ve hararet derecelerinin hastalığa belge olacak şekilde yükselmemesi lâzımdır. Aşılammayı takip eden günde ateş yükselebilir, fakat 14 gün müddetle hastalığın semptomlarının ortaya çıkmaması halinde bu ilk günkü yükseliş nazarı itibare alınmaz (11).

BAĞIŞIKLIK : Araştırmalar hastalığı geçirenlerin bağışıklık kazandıklarını göstermektedir. Serum - virus enjeksiyonları ile ilk zamanlarda bağışıklık meydana getirilebilmiştir. Daha sonraları serumun yalnız başına tedavi edici bir kıymet taşıdığı anlaşılmıştır. Birçok pasajlarla attenüe edilen canlı virus koyunlarda uzun senele muvaffakiyetle kullanılmıştır. Tek tük hayvanlar aşı enjeksiyonlarına karşı hafif bir reaksiyon göstermektedirler. Bu reaksiyon aşılandıktan sonra şiddetli güneş ışığına maruz kalan hayvanlarda çok daha fazla olmaktadır. Aşiyı meydana getirilen muafiyet

bir mevsimden fazla devam etmemektedir. Yıllık ve 6 aylık aşılama tavsiye edilmektedir (11).

Mavi dil virusunun (BTV) çoğaltılması için kullanılan yumurta embriyonu, aşı hazırlanmasında da tesirli ve iktisadîdir. Bizim yaptığımız aşı da budur. Bağışıklığın 6 ay sürdüğü kabul edilmektedir. Bu çeşit bir aşı pratikte rahatça kullanılabilir, tatbikatı kolay ve zararsızdır.

Afrika'da quadrivalan bir aşı çok kullanılmaktadır. U.S.A. da da yalnız b irantijenik tipten hazırlanan monovalan bir aşı tatbik edilmektedir. SCHULTZ ve DELAY'ın bildirdiklerine göre gebe koyunlarda kullanılan yumurta embriyon aşısı yavru kaybına sebep olabilir. Gebeliğin 5 ve 6 ncı haftasında intra uterin yavrular çok hassastırlar.

H Ü L Ä S A

Tecrübevî çalışma maksadı ile Ankara - Etlik Bakteriyoloji Enstitüsü Şap Seroloji ve Doku Kültürü Lâboratuvarında mavi dil aşısı hazırlanmıştır.

Aşının hazırlanması için 14 çeşitli suç Meksikadan getirtilmiştir. Bu çalışmada 60 pasajla yumurta embriyosuna adapte edilmiş Mossop suşu kullanılmıştır.

8 günlük embriyonl uyumurta sarısına (BTV) Mossop suşunun 1/10 dilusyonundan 0,2 cc. inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonra 48 saat zarfında ölenler nazarı itibare alınmamıştır. Müşahade inokulasyondan sonra 5 gün devam etmiştir. İnokulasyondan sonra 3 - 5 gün içinde ölen yumurtaların muhtevisi toplanmıştır. Bu yumurta muhtevası aynı miktar Buffer - Laktoz - Pepton vasatı ile karıştırılmıştır. Herbir cc. için 100 ünite penicilline ve 100 mikrogram streptomycin ilâve edilmiştir.

Bu karışım 0,75 cc. miktarında ampullere taksim edilmiş ve freeze - dryer'de kurutulmuştur. Aşı titrasyonu Reed ve Muench metoduna göre kurutulmadan evvel ve sonra olmak üzere iki defa yapılmıştır. Kurutmadan evvelki titrasyona $10^{-6,2}$ kurutmadan sonraki titrasyon $10^{-5,6}$ olarak tesbit edilmiştir.

Aşının muafiyet denemeleri henüz yapılmamıştır.

S U M M A R Y

Blue Tongue vaccine was prepared at Foot and Mouth Disease Serology and Tissue Culture Laboratory of Etlik Bacteriology Institute, Ankara, for experimental study.

To prepare the vaccine 14 of several strains of the virus were brought from Mexico. Mossop strain which had been suitably attenuated by 60 serial passages in embryonating chicken eggs was used in this study.

Fertile eggs, preincubated for 8 days, were inoculated with 0,2 ml of 1/10 dilution of Mossop strain via yolk sac route. Death of embryos during the first 48 hours after inoculation, were discarded. Observation continued for 5 days. The contents of the eggs of embryos which haddied within 3th. to 5th. days postinoculation, were collected. The contents of the eggs were mixed with equal volume of Buffer - Lactose - Pepton medium, 100 units of penicilline and 100 microgram streptomycin per milliter were also added.

The mixture was dispensed in 0,75 ml quantities into each ampule and desiccated in Freeze - Dryer - appartus. The titration of the vaccine examined by the method of Reed and Muench before and after desiccation. It was calculated that the titration before desiccation was $10^{-6,2}$ after desiccation was $10^{-5,6}$

L I T E R A T Ü R

- 1 — CAMERON G. 1950)
Tissue Culture Technic, 2nd. ed. Newyork.
- 2 — ERDÖL Z. A. (1945)
Koyunlarda mavi dil (Bluetongue) hastalığı, Türk Veteriner Cemiyeti yayını.
- 3 — FRANZ HUTRA, JOSEPH MAREK and RUDOLPH MANNIGER (1949)
GER (1949)
Blue Tongue.
- 4 — GORHAM J. R. (1957)
A simple technic for the inoculation of chorio-allantoic-membrane of chicken embryos. Am. J. Vet. Res. 18 : 891 - 692.
- 5 — GRAY D. P. and BANNISTER G. L. (1961)
Melaphagus ovinus, Veterinary Science, Sept.
- 6 — HAIG (1956)
The cyto-pathogenic action of bluetongue virus on tissue cultures. Onderstepoort J. Vet. Res. 27/171 - 177.
- 7 — IVAL A. MERCHANT - PACKER, 1956
Veterinary Bacteriology and Virology,
- 8 — KALMER, SPAULDING, ROBINSON (1951)
Approved Laboratory Technic, Fifth edition .
- 9 — KERCHER, D. C. Mc. KRORK B. R. Mc. and J. L. HOURRIGAN (1956)
Blue Tongue of sheep, Animal Diseases.

- 10 — **LORANT KEMENY, LOYD E. DREHLE (1961)**
The use of Tissue Culture-propagated blue tongue virus for vaccine
Veterinary Research, Volume XII, Sept.
- 11 — **MOULTON, W. (1962)**
F. A. O. Ankara Mümessili, Şahsi komünikasyon.
- 12 — **REED L. J. and MUENCH H. (1938)**
A simple method of estimating fifty percent endpoints.. Am. J., Hyg.
27/493 - 497
- 13 — **TAYLOR, R. M. (1952)**
Studies on certain viruses isolated in the tropics of Africa and South
America : Their growth and behavior in the embryonaed hen egg. J.
Immunal 68/473 - 497.