

Frenkel Metodu ile Şap Virusu Üretilmesi

Macit ORAL (*)
Halil ÖRÜN (**)

Cemil BOZ (***)
Necdet YALIM (****)

G İ R İ Ş

Çift tırnaklı hayvanlarda, halk arasında şap denilen hastalığı ilk defa 1764 te MICHEL SAGAR idantifiye etmiş ve TOGGIA tarafından LA FIEVRE APHTEUSE (Şap) ismi verilmiştir. Bunu takip eden zamanlarda şap virusu üzerinde yapılan çalışma ve araştırmalar etkenin daha iyi tanınmasına hizmet etmiş, bu hastalığa hassas hayvanlarda seyri ve dolayısıyla sebep olduğu ekonomik zararların hesaplanmasını kolaylaştırmıştır.

1830 dan itibaren etkenin hasta hayvandan, hassas hayvanlara deneysel olarak nakledilebildiği tesbit edilmiş ve bakteriyolojik etüdüleri LÖFFLER ile FROSCH'la başlayıp 1897 de patojen etkenin filtrabl olduğu açıklanmıştır.

Şap hastalığına hasredilmiş sayısız çalışmalar bu konuda az olan bilgileri şaşılacak derecede zenginleştirmiş, dikkati hastalığın etiyojisine ve profilaksisine çekmiştir.

1920 de WALDMANN ve PAPE, 1898 de HECKER tarafından işaret edildiği gibi kobayların enfeksiyöz ajanı deneysel olarak aldıklarını isbatlamışlardır. 1922 de VALLEE ve CARRE aydınlatıcı demonstrasyonlar ortaya koyarak şap hastalığında aktif ve passif bağışıklığı tetkik etmişlerdir. Nihayet 1938 de Waldmann ve lâboratuvar arkadaşları prensiplere uygun müessir bir aşılama tekniği ortaya koydular. Şapın deneysel etüdülerini tamamlamayı hedef tutan bilgili ve reel araştırmalar durmadan gelişti. Buna paralel olarak bir çok enstitü kuruldu. Fransa'da Alfortta NOCARD 1901

(*) Şap Seroloji Lâboratuvarı Şefi.

(**) Şap Aşı İstihsal ve Kontrol Lâboratuvarı Mütchassısı.

(***) Şap Seroloji, Lâboratuvarı Mütchassısı.

(****) Şap Seroloji, Lâboratuvarı Mütchassısı.

de ilk araştırma merkezini inşa ediyor, 1909 da Almanya'da RIEMS Enstitüsü doğuyor. 1924 te İngiltere'de WEYBRIDGE, 1926 da Danimarka'da LINDHOLM Enstitüsü, Rusya'da SKOMOROKHOV ile Hollanda'da ROTTERDAM Enstitüleri kuruluyor.

Bunları muhtelif memleketlerde değişik metodlarla şap virusu elde eden ve aşı yapan enstitülerin inşası takip ediyor. Fransa'da Lyonda Fransız Şap Enstitüsü, Rojet Belon, Belin Enstitüleri, Arjantin'de Fransızların iştirâkiyle Şap Enstitüsü ve İran'da Tahran Razi Enstitüsüne bağlı, Araştırma ve Frenkel metodu ile şap virusu üreten bir enstitü kuruluyor.

Şapla mücadele ve şapa karşı koruyucu aşı hazırlamak, 1909 da Hollanda'da Sheveningen de 9 ncu Enternasyonal Veteriner Kongresinde VALLEE'nin şapla rasyonel mücadelenin ancak virusun kütüvasyonunun keşfiyle mümkün olacağını ifade etmesi ve araştırmacıların dikkatini bu yöne çekmesiyle mümkün olmuştur.

Bundan önceki zamanlarda yapılan uzun bakteriyolojik araştırmalar olumlu sonuçlar vermemiştir. Yirminci yüzyılın ilk dörtte birinde MAITLAND ve HECKER tarafından ilk olarak şap virusunun kobay embriyon derisi explantasyonunda üretilmesi başarılmıştır. 1936 da FRENKEL ve VANWAREN bir çok kerre şap virusunun, büyük parçalar halinde explantasyonu yapılan sığır, koyun ve domuz embriyonik derisinde üretmeye muvaffak olmuşlardır. Yalnız araştırmanın yapıldığı sıralarda virus titrasyonu ve tip tayini metodları (virusun değişik antijenik yapıları) komplement fiksasyon tekniği kâfi derecede inkişaf etmemiş olduğundan neticeleri mukayese etmek imkânı bulunamamıştır. Elde edilen muhtelif tipteki virusların virulensleri ve antijeniteleri hususunda yeterli bilgi elde edilememiştir.

Vallée çalışmalarının neticesi olarak elde ettiği virusların titresini HENDERSON metodu ile araştırmış ve aşağıdaki sonuçları elde etmiştir.

Parçalanmamış Epitelde		Parçalanmış Epitelde	
Tip	Titre	Tip	Titre
A 247	1 : 170000	A 246	1 : 510000
O 105	1 : 440000	O 106	1 : 260000
C 81	1 : 200000	C 82	1 : 158000
O 109	1 : 740000	O 110	1 : 460000

Frenkel başladığı ve virus üretmeğe muvaffak olduğu doku çalışmalarını (dil epiteli kültürü ile) inkişaf ettirmiştir. 1947 - 1953 yılları arasında yaptığı çalışmalarla sığır dili epitel dokusu ile kendi ismini taşıyan vasatta şap virusunu üreterek bundan şap aşısı elde etmiştir. Yine aynı Enstitüde virus prodüksiyonu, titrasyon ve üretim metodları üzerinde sayısız çalışmalar yapılmış olumlu sonuçlar alınmıştır.

Frenkel metodu ile şap virusu elde etme tekniği diğer metodlara nisbeten daha ekonomik ve daha pratik olduğundan tutunmuştur. Bu gün bu metodla şap virusu elde eden ve bununla şap aşısı hazırlayan bir çok müessese vardır.

Fransa'da (IFFA) (*) Şap Enstitüsü bu metodla elde ettiği virustan mono, bi ve tri valan konsantre şap aşıları hazırlamaktadır. İtalya'da BRESCIA keza bu metodla çalıştığı gibi İran'da Tahran Razi Enstitüsünde aynı usulle O ve SAT₁ virusları üreterek şap aşıları imâl etmektedir.

Yurdumuzda ötedenberi bulunan O tipi şap hastalığı periyodik olarak üç dört yılda bir epizootiler yapmakta ve fakat yerli hayvanlarımızın tabii rezistansından dolayı büyük zararları olmamaktaydı. Son yıllarda doğu komşularımızdan yurt hayvanlarına bu aşım her tarafı şapla münten bir hale sokan SAT₁ tipi şap hayvanlarımızın iş ve ürünleri üzerine etki yaparak millî ekonomimizde büyük zararlara sebep olmuştur. Bu nokta dikkate alınarak Tarım Bakanlığı FAO nun yardımı ile yeni bir şap enstitüsü inşa ettirmektedir. Amaç ihtiyaca cevap verecek kadar şap aşısı istihsali olup bunun elde edilebilmesi için geniş miktarda şap virusu üretilmesi zarureti olduğundan, diğer metodlara paralel olarak Frenkel metodu ile şap virusu üretimine, muvakkat şap lâboratuvarında başlanmıştır. Bu çalışmalar geniş virus prodüksiyonu şeklinden ziyade araştırma şeklinde olmuştur.

FRENKEL METODU İLE ŞAP VIRUSUNUN EXPLANTE SİĞİR DİLİ EPİTELİNE ADAPTASYONU

MATERYAL ve METOD

Frenkel usulü şap virusu elde etmede, ön plânda taze sığır dili epiteline ihtiyaç bulunduğu Enstitü Müdürlüğünün Et ve Balık Kurumu ile yaptığı temaslar neticesinde, kültür yapılacağı günlerin sabahı yeteri kadar dil kurumun kesim salonundan ve kesimin he-

(*) Fransız Şap Enstitüsü.

men akabinde aldirttirilmıştır. Tabii sığır virusunun explante dil epiteline adaptasyonunda her pasaj için 5 veya 6 dil epiteli üzerinde çalışılmıştır.

Epitelin Toplanması : Epitelin dilden alınması için, dilin bir takım manuplasyondan geçmesi gerekmekte idi ve öncelikle dillerin steril bir hale getirilmesi işi vardı. Bu maksatla diller önce üst yüzleri gergin bir durumda bulunacak tarzda özel madeni araçlar üzerine tesbit edildiler. Çeşme suyu ile fırçalanarak her dil 4 - 5 dakika yıkandı. Sonra 40° C lık su ile aynı tarzda yıkamayı müteakip 70 derecelik alkolle bir okadar zaman ve her dil için takriben 50 cc. alkol kullanılarak tekrar fırçalandılar.

Dillerin bu ilk temizliği yapıldıktan sonra özel olarak yaptırılan ultraviole tüneline konuldular. Bu tünel iki kapaklı olup raylar üzerinde hareket eden ve dillerin konulmasına mahsus arabası mevcuttu. Tünelin bir kapağı kontamine kabul edilen ve dillerin yıkama işleminin yapıldığı boksa, diğer ikinci kapak sterilitesi ultraviole ışınları ile temin edilmiş olan ve disk şeklinde bıçağı bulunan (pastırma kıyma makinası) makinanın bulunduğu boksa açılmakta idi. Tünele konulan diller 3 - 4 dakika ultraviole ışınları tesiri altında tutulduktan sonra, buradan birer birer alınarak dil soyma makinasında steril şartlar altında karni tabakası atıldıktan sonra dil kaslarını kesmemeğe dikkat ederek, epitel dokusu ince tabakalar halinde kesilerek steril petri kutularında PBS (phosphate buffer solution) içerisinde toplandı. Epitelin bu tarzda istihsalı sırasında bıçak üzerine damla damla steril PBS sevk edildi. Zira alınan ince epitel tabakaları havanın tesiri ile kurumakta, bu hal epitel hücrelerinin hayatiyetinin kaybolmasına sebep olduğu gibi epitel istihsalinide güçleştirmekte idi. Bu çalışmalar süresince kullanılan dillerden elde edilen epiteller daima tartılmış ve beher dil için ortalama epitel miktarı 22,750 gram bulunmuştur.

FRENKEL Kültürü İçin Kullanılan Vasat ve Hazırlama Tekniği : FRENKEL metodu ile şap virusu çoğaltılmasında biz Frenkel'in orijinal vasatını kullandık. Hazırlanmasında dikkat edilecek noktalar amino asitlerinin dikkatle tartılarak güç eriyenlerin sıcak suda eritilmesi ve kalsiyum klorürün ayrı bir kaptaki eritilerek ağır ağır vasata ilâve edilmesidir. Aksi hallerde vasat bulanmakta ve çökelek vermektedir. İkinci bir hususta peptonun yine ayrı bir kaptaki eritilerek ilâvesidirki buda vasatı meydana getiren şimik madde kristallerinin tam eridiğini anlamaya yarar. Çalışmalar için her

defasında 4 der litrelik vasat hazırlandı. Bu vasatlar 4 - 6 atmosfer basınç altında EK kâğıdı kullanılarak SEİZ filtresinden süzüldü.

Vasat süzülmeden önce her santimetre küpü için 100 UI Penicillin ve 100 gama streptomisin hesap edilerek ilâve edildi. Vasatlar daima deminarelize su kullanılarak hazırlandı. Filtrasyondan sonra PH 7,4 - 7,6 arasında değişmekte idi. Buda Frenkel kültürü için arzu edilen bir PH seviyesi idi. Bu tarzda hazırlanan steril vasat birer litrelik cam balonlara tevzi edilerek + 4° c da muhafaza edildi.

VİRUSUN HAZIRLANMASI : Kültür ekimlerinde kullanmak için tabii sığır SAT₁ virusu seçildi. Bu virusun titresi 5 - 6 günlük fare yavrularında hesaplandı ve DL₅₀ - 10⁻⁷ bulundu. Bu virustan 10 gram 90 cc Buffer solusyonu ile ezildi ve seitz filtresinden presionla süzüldü. Bu işlem kültür'e konmadan az bir zaman önce yapıldı.

KÜLTÜRÜN HAZIRLANMASI : İki metodla çalışıldı.

- 1 — Erlenmayerlerde (Ajitasyonla, IFFA metodu),
- 2 — Roux şişelerinde (Ajitasyonsuz, Brescia metodu).

1 — **ERLENMAYERLERDE :** 500 cc. lik iki erlenmayer alınarak, 6 nolu mantarlara 2 tane cam boru takıldı. Boruların her iki dış ucuna lâstik borularla pamuklu cam bullar ilâve edildi. Bu cam bulların bir tanesi oksijen sevkemeye, diğeri de kültür esasında teşekkül eden gazları ve artan oksijeni dışarı atmağa yaramakta ve bu suretle muhtemel bir kontaminasyonu önlemek içindi. Erlenmayerler'den beherine 350 cc frenkel vasatı, ikişer dil epiteli ile hazırlanan virustan 4 cc ilâve olunarak steril olarak kapatıldı. Bu şekilde iki erlenmayer hazırlandı. Bunlar 37°c etüvde tertiplenen manyetik ajitatörler üzerine yerleştirildiler. Oksijen tüpü lâstik borularla erlenmayerlerin pamuk filtreli bullarına bağlandı. Müteakiben tüpün manometresi vasıtasıyla kültüre oksijen sevkedildi. Kültür içerisinden aralıklı kabarcıklar tarzında çıkacak şekilde ayar edildi. Daha sonra ajitatör çalıştırılarak oksijenin epitellerle teması sağlandı.

2 — **ROUX ŞİŞELERİNDE :** Roux şişelerinde ajitasyona lüzum olmadığından steril hazırlanan şişeye 125 cc. vasat bir dil epiteli (25 gram) ve 2 cc. tabii virus konuldu. Hazırlanan cam boru ve pamuk filtre bullu mantarla kapatılarak 37°c de oksijen sirkülasyonuna bağlanarak kültüvasyona konuldu. Yukarıda miktarları açıklandığı tarzda ismi geçen antibiyotiklerden vasata ilâve olundu.

Epitelin vasat içerisinde dağınık bir durumda bulunması temin edildi. Gerek erlenmayerler ve gerekse roux Őişeleri zaman zaman kontrol edilerek oksijen sevkinin ve ajitasyonun durmaması sağlandı. Bu suretle 24 saat Frenkel kültüründe kalan SAT₁ Şap virusu (birinci pasaj) nceden hazırlanan buzlu su bulunan kaplara alınarak çabuk soğutulması temin edildi.

1 nci Pasaj SAT₁ Frenkel virusunun elde ediliŐi : Buzlu suya konulan kültürlerden sıra ile önce erlenmayerlerdeki süpernatantlar ayrı ayrı steril Őişelere toplandı. Mtebaki viruŐlu epiteller atomikte steril Őartlarda parçalanarak Őişelere ilâve edildi. Roux buvatlarında aynı tarzda iŐleme tbi tutularak ayrı Őişelerde toplandı. Tip tayini (komplement fiksasyonla) fare yavrularında titrasyon ve kobay denemeleri için bu ilk pasaj viruslarından 50 Őer cc. alınarak 3000 devirde santrifüj edilerek EKS kğıtlarından filtre edildiler. Kobay inokulasyonlarında (iki kobayın arka ayak tabanlarına) virus enjekte edilen tabanlarda Şap aftı teşekkül etti fakat jeneralize olmadı. Fare yavrularında yapılan titrasyondada yüksek bir titre bulunmadı. Colmer ve Fransız tekniği ile yapılan komplement fiksasyonda aşağıdaki neticeler bulundu.

Kullanılan hiperümmün serumlar

Kültür	O	A	C	SAT ₁
Erlenmayer No : 1	—	—	—	+++—
Erlenmayer No : 2	—	—	—	+++—
Roux Şişesi	—	—	—	++++

Tip tayini ve hayvan deneyleri virusun devam ettiğini ortaya koyduğundan 2 nci pasaj yapılmasına karar verildi.

2 nci Pasaj : 1 nci pasaj frenkel virusunda açıklandığı tarzda 2 Őer dil ihtiva eden iki erlenmayerle bir dil epiteli taşıyan roux Şişesi aynı tarzda hazırlandı. Epitelleri ve vasatları konulduktan sonra 1 nci pasaj Frenkel virusundan 1 % hesabı ile virus ilâve olunup yeteri kadar oksijen sirkulasyonu altında kültüre konu'du. 24 saat sonra aynı iŐlemler tekrarlanarak 2 nci pasaj virusu elde olundu ve bundan kobay inokulasyonu yapıldı.

Ayrıyeten komplement fiksasyonla tip tayini yapıldı ve aşağıdaki sonuçlar alındı.

Kullanılan hiperümmün serumlar

Kültür	O	A	C	SAT ₁
Erlenmayer 1	—	—	—	+++—
Erlenmayer 2	—	—	—	+++—
Roux şişesi	—	—	—	+++—

3 ncü Pasaj : İkinci pasaj SAT₁ Frenkel virusunun, yeniden hazırlanan erlenmayer ve roux şişesine ekimi sonucu 3 ncü pasaj virus elde edildi. Yine bunların ayrı ayrı C.F. la tip tayinleri yapıldı. Alınan neticeler arzuya uygun nitelikte olduğundan sistematik olarak pasajlara devam edildi. Bu suretle 4 ncü ve 5 nci pasajlar yapıldı.

5 nci pasaj virüsünden yine C.F. metodu ile tip tayini yapılarak aşağıdaki sonuçlar alındı.

Kullanılan hiperümmün serumlar

Kültür	O	A	C	SAT ₁
Erlenmayer 1	—	—	—	+++
Erlenmayer 2	—	—	—	++++
Roux şişesi	—	—	—	++++

Bu sonuç alındıktan sonra bu viruslar aşağıda gösterildiği tarzda kobayların tabanlarına inoküle edildi.

Kültür	Kobay kulak №s	24 Saat	48 Saat	72 Saat	sonuç
Erlenmayer I	409	†---	††---	†††-	jenerali-
	982	†---	††---	†††-	"
Erlenmayer II	878	†---	††---	†††-	"
	371	†---	††---	†††-	"
Roux şişesi	125	†---	††---	†††-	"

Erlenmayer 2 frenkel virusunun 5 - 6 günlük fare yavrularında, intraperitoneal 0,05 ml inoküle edilerek titresi yapıldı, neticeler hesap edilerek LD₅₀ 10⁻⁶ bulundu.

Bu deneme neticeleri uygun olduğundan pasajlara devam edildi.

6 ncı pasaj virusundan aynı denemeler yapıldı.

1 No. lu erlenmayerde devam edilen ve altıncı pasajdan elde olunan SAT₁ tipi Frenkel virusunun fare yavrularında (5 veya 6 günlük) intraperitoneal verilerek titrağı yapıldı ve neticeler Reed ve Munch metoduna göre hesap edilerek değeriendirildi ve LD₅₀ 10^{-6,6} bulundu. Bu titrasyon yapılırken virusun yalnız 10⁻⁴ 10⁻⁵ 10⁻⁶ 10⁻⁷ dilusyonları kullanıldı.

Kobaylara yapılan intraplanter inokulasyonlar sonucuda aşığı çıkarılmıştır.

Kültür	Kobay kulak №	24 saat	48 saat	72 saat	sonuç
Erlenmayer I	106	† ---	†† ---	††† -	Generali- ze
	476	† ---	†† ---	††† -	"
Erlenmayer II	116	† ---	†† ---	††† -	"
	171	† ---	†† ---	††† -	"
Roux şişesi	566	† ---	†† ---	††† -	"
	678	† ---	†† ---	††† -	"

Kobaylar virus inokulasyonundan sonra bir hafta müşahedede tutulmuş sonuçlar puvante edilerek öldürülmüşlerdir.

Gerek titrasyon gerek komplement fiksasyon ve kobay denemeleri uygun sonuçlar verdiğiinden SAT₁ frenkel virusu pasajlarına devam olundu. İlk pasajlardan elde olunan viruslar epitelleri ile birlikte -18°C de kavanozlarda muhafaza edildiler.

NETİCE ve KARAR

Lâboratuvarımızda, küçük çapta yapılan ve yukarıda detaylı olarak izah edilen Frenkel metodu ile şap virusunun explante sığır dili epitheli doku kültürüne adaptasyon çalışmaları olumlu sonuç vermiştir.

Denemede agitasyonlu Erlenmayer ve agitasyonsuz Roux flask tekniğı izlenmiştir. Muhtelif tekrarlamalarda her iki teknikte hemen hemen aynı sonucu vermiştir.

Çalışmalardan elde edilen kanaat şu olmuştur : Şap virusu explante sığır dili epiteli doku kültürüne kolayca adapte edilebilmektedir. Dokuzuncu pasajını yaptığımız bu adapte virusun gerek infektivite, gerekse antijenite titrasyonları, aşı istihsaline elverişli olacağı kanaatini uyandırmıştır. Ancak aşı prodüksiyonu için daha genişçe çapta virus üretilmesi ve bu bakımdan da gerek yeteri kadar dil epiteli, gerekse küçük virus üretme tankları gerektiğinden, çalışmalar, FAO'dan ısmarlanmış olan âlet ve malzemenin geleceği bir zamana kadar tehir edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Frenkel araştırmalarımızda dil temininin güçlüklerini Et ve Balık Kurumu ile görüşerek halletmiş olan, çalışmaların kolaylıkla yürütmesi için gerekli ortamı hazırlayıp, işlerin bir sistem düzeninde gelişmesini sağlamış bulunan Enstitü Müdürü Sayın Dr. Ahmet Özsoy'a teşekkürlerimizi bir görev addederiz.

ÖZET

Türkiye'deki şap salgınlarını diğer tedbirlere paralel olarak aşılama ile önlemek için, ekonomik ve pratik kolaylıkları bulunan Frenkel Metodu ile şap virusu üretilmesi için, küçük çapta çalışma yapılmıştır. SAT₁ virusu ile Ajitasyonlu ve Roux şişelerinde olmak üzere explante sığır diline adaptasyon yapılmıştır. Bu çalışmalardan arzuya uygun sonuçlar alınmıştır. Denemelerimiz bize göstermiştir ki, ilerideki geniş çalışmalarda şap virusunun bu metodla çoğaltılması, malzeme ve şimik maddelerle taze sığır dilinin teminine bağlıdır. Denemelerde Modifie Frenkel, Brescia vasatları kullanılmış, her pasajdan sonra virusun hayvan deneyleri ile Komp'ement Fiksasyon testleri yapıp, faredeki titrajları hesaplanmıştır. Faredeki DL₅₀ 10^{-6,5} bulunmuştur. C.F. testlerinde daima SAT₁ teyid edilmiştir.

Dillerden elde edilen epitellerin muhafazasından çok, taze dil epiteli ile çalışmak prensip edilip, istihsal edilen dil epitelleri aynı gün kullanılmıştır. Adaptasyonda kullanılan SAT₁ virusu sığır orijinli tabii virustur. Bu çalışmalarda iki usul izlenmiştir.

- 1 — Ajitasyonlu,
- 2 — Ajitasyonsuz.

1 — Ajitasyonlu usulde manyetik sistemle kültür ağır ağır ajite edilmiş, bu arada oksijen sirkulasyonu da devam etmiştir.

2 — Ajitasyonsuz usulde Roux şişelerinde yatık olarak kültüre konulmuş ve yine oksijen sevk edilmiş, bunlar 37°C lik etüvde 18 - 24 saat fasılalarla tutulmuş, neticeler mukayese edilmiş, arada büyük bir fark bulunamamıştır.

Denemeler 9 ncu pasaja kadar yürütülmüş, ancak gerek enfektivite, gerekse antijenite yönünden 6 ve 7 nci pasaj viruslarının en iyi durumda bulunduğu tesbit edilmiştir.

S U M M A R Y

Growth of the Virus of Foot - and - Mouth

Disease Using the Method of Frenkel

Work on a small scale has been done regarding virus production by Frenkel method which is more practical and cheaper, parallel with other measures against foot and mouth epidemics in Turkey. Adaptation into exp'ante cattle tongue using SAT - 1 virus in Roux bottles. Satisfactory results were obtained. Experiments indicate future on large scale by this method depends on getting fresh cattle tongue as well as chemicals and other materials. Modified Frenkel and Brescia media were used in experiments and following each passage complement fixation tests by virus on animals were carried out, calculating titrages in mice which were $DL_{50} 10^{-6.5}$

Complement fixation tests have confirmed SAT - 1 all the time.

Working, in principle, with fresh tongue epithelium rather than conserving epithelium obtained from tongues, tongue epithelia produced were used the same day.

SAT - 1 virus used in adaptation is a natural virus of bovine origin.

Two methods were used in these tests :

1 — With agitation

2 — Without agitation

1 — In the agitation method, culture was slowly agitated into the magnetic system while continuing with oxygen circulation.

2 — In the second method the culture was placed in a slanting position in Roux bottles and oxygen was circulated. This has conti-

nued in 18 - 24 hours intervals in 37°C. Results compared did not indicate large differences.

Tests were carried out up to ninth passage but viruses were at their best at sixth and seventh passages from both infectivity and antigeniti points of view.

B I B L I O G R A F I

- Frenkel, H.S. (1949) J.A.V.M.A. Vol. CXV, No. 870, September, 1949. PP. 178.
- Frenkel, H.S. (1949) The cultivation of Foot-And-Mouth Disease virus vaccine prepartet with this virus by section 3. (a) (1949)
- Frenkel, H.S. (1951) A.J.V.R. Vol. XII, No. 44, July, 1951.
- Frenkel, H.S. and Dunne, W. (1952) A.J.V.R. Vol. XIII, No. 46, January, 1952. PP. 21 - 23.
- Frenkel, H.S. (1954) A.J.V.R. Vol. XV, No. 56, July, 1954
- Frenkel, H.S. Gillespie, H.J. (1955) A.J.V.R. Vol. 16, No. 6, Oct., 1955. PP. 505 - 510.
- Lepin (1954) Les ultra virus.
- Mackowiak, C. Girard, H. (1953) La Revue d'immunologie C.V.A.S.I. 1953
- Mackowiak, C. Girard, H. Camand, R. Hirtz, J. (1961) IFFA Recherchers sur la multiplication de virus aphteux en culture de tissu. 1961.
- Williams, R. Leumen, J. (1957) Bul. OEEC. PP, 73 - 83. 1957