

283936

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CANLI ATTENÜE KIZAMIK VİRUS AŞISININ
BAĞIŞIKLIK CEVABININ İN VİTRO ARAŞTIRILMASI**

**MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ**

HÜLYA ÜNALAN

ANKARA — 1984

42

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CANLI ATTENÜE KIZAMIK VİRUS AŞISININ
BAĞIŞIKLIK CEVABININ İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

HÜLYA ÜNALAN

REHBER ÖĞRETİM ÜYESİ : Doç. Dr. ŞEMSETTİN USTAÇELEBİ

ANKARA - 1984

T E Ő E K K Ū R

Tez çalışmalarıma başladığım günden beri bana her konuda yardımıcı olan, yönlendiren ve karşılaştığım zorluklar sürecinde benden desteğini esirgemeyen çok değerli rehber hocam Sayın Doç. Dr. Şemsettin USTAÇELEBİ'ye en içten saygı ve teşekkürlerimi borç bilirim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa No.</u>
Giriş -----	1
Genel Bilgiler -----	3
Gereç ve Yöntem -----	17
Bulgular -----	28
Tartışma -----	34
Özet -----	38
Kaynaklar -----	39

G İ R İ Ş

Kızamık, akut ve çok bulaşıcı bir çocukluk çağı hastalığıdır. Ateş, koriza, konjunktivit, öksürük ve bukkal mukozada hastalığa özgü lekelerle (koplik lekeleri) başlayan ve jeneralize döküntülerle karakterize olan enfeksiyondur. Genellikle enfeksiyona ait belirtiler bir hafta içinde kaybolarak tam iyileşme meydana gelir. Ancak, özellikle gelişmiş ülkelerdeki hastaların çok azında solunum sistemi ve merkezi sinir sisteminin çok ciddi komplikasyonları görülebilir. Ancak etkin canlı virus aşısının varlığı, immünize olmuş toplumlarda hastalık prevalansını azaltmaktadır. Çok iyi bir aşılama programının bütün dünyada uygulanmasına kadar kızamık hastalığına rastlanacaktır (1,2,3).

Kızamık aşılama programına rağmen, ülkemizin bazı kesimlerinde sık sık kızamık epidemileri oluşmakta ve ikincil bakteriyel pnömoni nedeni ile çocukluk yaşlarındaki ölüm oranı artmaktadır. Aşılama programının zamanında ve geniş kitleleri içine alacak şekilde uygulanması mortalite oranının azalmasına neden olacaktır (4).

Yurdumuzda, Dünya Sağlık Örgütü yetkililerinin önerilerine ve SSCB Devlet Kontrol Yetkililerince kabul edilmiş metodlara uygun olarak URSS V/O "Medexport" firmasınınca hazırlanan kızamık aşısının attenüe L-16 suşu kullanılmaktadır. Liyofilize olan aşı, 0.5 ml sulandırım sıvısı ile muamele edildikten sonra deri altına uygulanmaktadır. 12 aydan sonra uygulanan tek doz aşı, 1000 pfu (plak oluşturan ünite) canlı virus içermektedir. Aşının, kızamığa karşı çocuklarda % 90 ın altında olmamak üzere hayat boyu bağışıklık sağladığı bildirilmektedir (5).

Yukarıda özellikleri bildirilen ve ülkemizde kullanılan bu aşının antijenik etkinliğini ve oluşturduğu immüniteyi saptamak için mevcut çalışmayı planladık.

Çalışmamızın ana hatlarını aşağıdaki şekilde özetlemek mümkündür :

1) 12 aylıktan itibaren aşılansın için gelen bireylerden, aşı öncesi ve aşı sonrası (ortalama 14-21 gün aralıyla) serum örneği alarak, aşının immunolojik etkinliğini kompleman birleşmesi ve nötralizasyon testleri ile saptamak,

2) 0-10 yaş arasındaki çocuklardan alınan aşılama yapılmış, kızamık öyküsü olan ve olmayan bireylerdeki kızamık virusuna karşı antikorları kompleman birleşmesi yöntemi ile saptamak,

3) Klinik olarak kızamık tanısı konulan çocuklarda virus izolasyonu ve serokonversiyonu göstermek.

Çalışmamızda Ankara iline bağlı Ana ve Çocuk Sağlığı Merkezlerinden ve Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesinden toplanan serum örnekleri incelenmiştir. Ümidimiz, yurdumuzun çeşitli yörelerinden toplanabilecek serum örnekleriyle de çalışmanın daha geniş çapta yürütülmesidir.

G E N E L B İ L G İ L E R

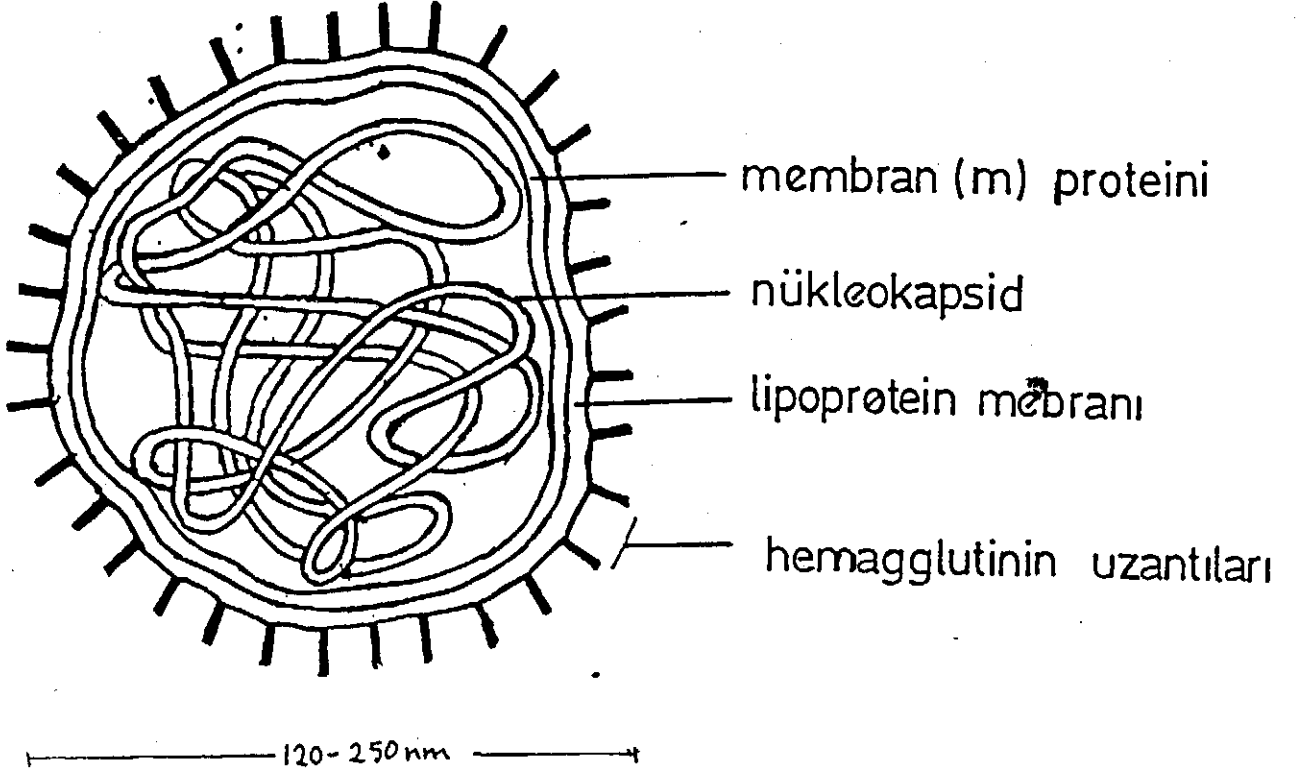
Bugün, bazı viral enfeksiyonlara karşı aktif bağışıklamada, canlı attenüe ve inaktif aşilar kullanılmaktadır. Özellikle çocukluk yaşlarında sık görülen ve az sıklıkta da olsa komplikasyonları olan viral enfeksiyonlara karşı aşılama yapılmaktadır. Yurdumuzda kızamık virusu enfeksiyonuna karşı korunmada canlı attenüe kızamık aşısı kullanılmaktadır (1,3,4,5,7).

Kızamık, akut seyreden, son derece bulaşıcı bir virus hastalığı olup ateş, koriza, konjunktivit, öksürük ve bukkal mukozada koplik lekerleri ile başlayan ve makülopapüler döküntü ile karakterize bir hastalıktır. Gelişmiş ülkelerde çok az oranda merkezi sinir sistemi komplikasyonları görülmekle beraber dünyada canlı attenüe kızamık virus aşısının kullanılmasından sonra kızamığa bağlı ölüm oranı oldukça azalmıştır (1,4,8,9).

İlk defa 1954 yılında Enders ve Peeblers insanlardan kızamık virusunu izole etmişler ve Rhesus maymun hücre kültürlerinde üretmişlerdir. Kızamık virusunun hücre kültürlerinde yaptığı CPE (sitopatik etki), çok hücreli dev hücre, sinsitya, çekirdek ve sitoplazma içi eozinofilik inklüzyon cisimcikleri oluşumu ile karakterizedir. Kızamık virusu, insan amnion, insan embriyonik akciğer ve insan orijinli karsinoma hücrelerinde (HeLa, Hep-2, KB) üreme yeteneğine sahiptir (8).

Kızamık virusu sferik görünümlü, 120-250 nm büyüklüğünde, zarflı bir virus olup, RNA, glikoprotein ve lipid içerir. Nükleokapsid heliksel simetriye sahiptir (Şekil-1). Kızamık virusu, paramyxovirus grubunda

sınıflandırılmaktadır. Isıya oldukça duyarlı olan virus, 37°C ve 20°C de çok çabuk inaktive olur, (-15°C) - (-70°C) arasında 5 yıl, $+4^{\circ}\text{C}$ de ise 5 ay aktif kalabilir (8,10,11).



ŞEKİL I : KIZAMIK VİRUSUNUN ŞEMATİK YAPISI.

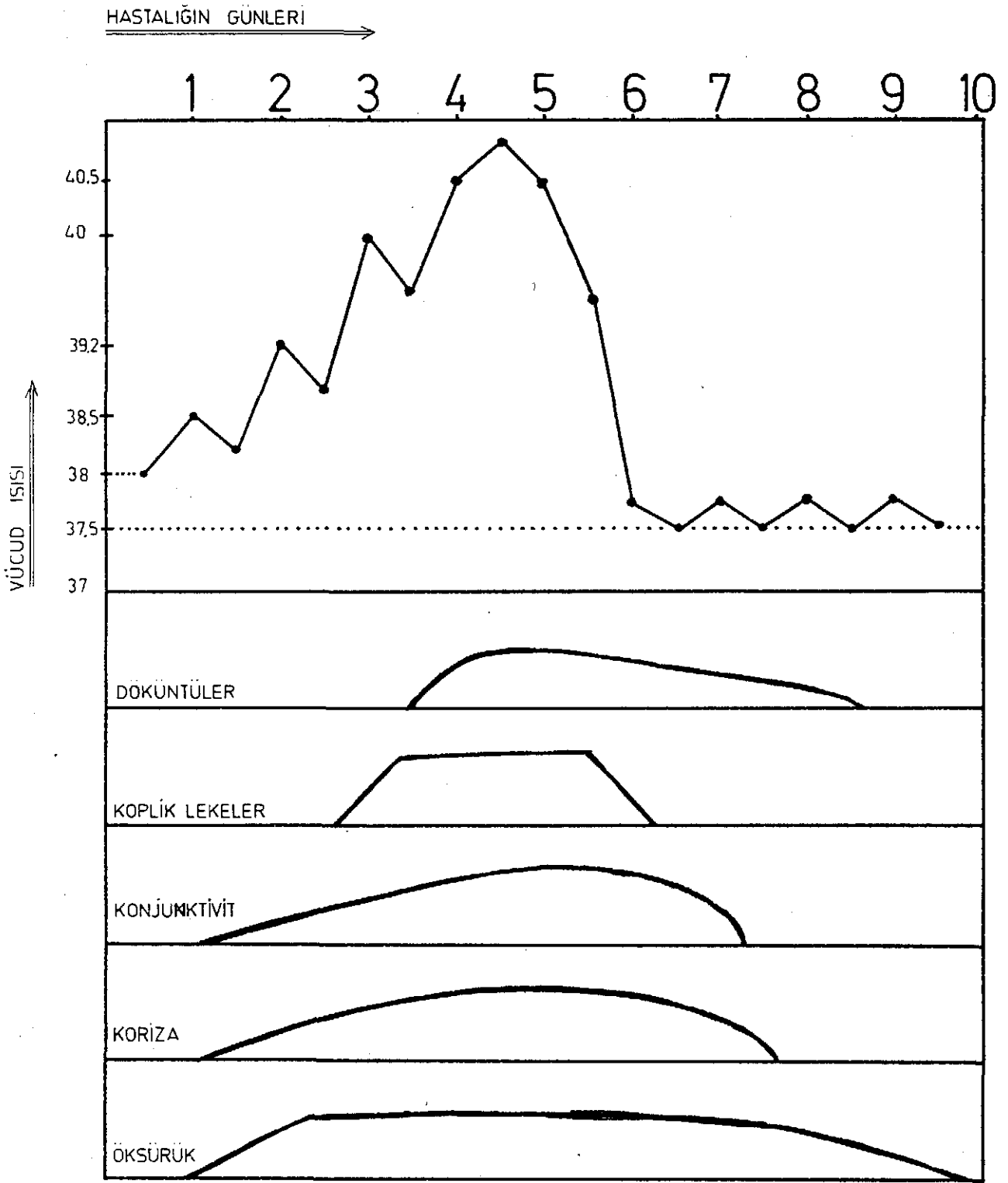
Kızamık virusunun, diğer paramyxoviruslar gibi nöraminidaz aktivitesi yoktur. Ancak, zarfta yer alan hemagglütininer, yalnız maymun eritrositlerini 37°C de hemagglütine etme yeteneğine sahiptirler. Ayrıca, kızamık virusunun alyuvarları hemoliz etme özelliği de mevcuttur (2,8,10).

Kızamık enfeksiyonunun inkubasyon dönemi 10-12 gündür ve enfeksiyon ateş ve yorgunluk hissi ile başlar. Bunu takip eden 24 saat içinde koriza, konjunktivit ve öksürük gibi semptomlar artarak döküntü çıkıncaya kadar 4 gün devam edebilir. Döküntü çıkmadan 2 gün önce, bukkal mukoz membranlarda eritematöz görünümlü koplik lekeleri belirir. 3 gün içerisinde bu lezyonlar,

sayı ve büyüklük yönünden artış göstererek mukoz membranı kaplayabilir. Döküntünün 2 nci gününde ateş düşer ve koplük lekeleri kaybolur. Döküntülerin kalış süresi 5 veya 6 günü geçmez (Şekil-2). Döküntüler eritematöz makülopapüler nitelikte olup önce saç önü ve alında belirir. Daha sonra yüz ve kulak arkası ve boynun üst kısmında belirirler. Aşağıya doğru yayılarak yüz, boyun, kollar ve karın bölgesini kaplarlar. Aşağı doğru ilerleyerek 3 ncü günde ayaklarda belirirler. Bunu takiben, yüz ve boynundaki döküntüler birbirleri ile birleşerek konfluent hale gelirler. Ancak el ve ayaklardaki döküntüler birleşmeden tek tek kalırlar. Döküntüler, görülme sıralarına göre 3 ncü günden itibaren sönmeye başlarlar. Döküntünün 3 ve 4 ncü günlerinde kahverengimsi bir renk alırlar. Bu, muhtemelen kapiller hemorajiye bağlı bir renklenmedir. Daha sonra deskuamasyon görülür. Ancak kızıl'ın tersine el ve ayaklarda deskuamasyon saptanmaz (1,2,4,9,10).

HASTALIĞIN KOMPLİKASYONLARI :

Kızamık enfeksiyonuna bağlı olarak, primer virus enfeksiyonu ve sekonder bakteri enfeksiyonu sonucunda komplikasyonlar görülmektedir. Bunlara ilaveten az oranda da olsa, merkezi sinir sistemini etkileyen komplikasyonlar da ortaya çıkmaktadır. Primer virus enfeksiyonlarına bağlı komplikasyonlar arasında en sık bronşiyolit görülmekle beraber, hücresel immün yetmezliği olan çocuklarda sıklıkla dev hücre pnömonisine rastlanmaktadır. Yurdumuzda da kızamık salgınlarından sonra diğer gelişmekte olan ülkelerde olduğu gibi otitis media ve bronkopnömoni gibi sekonder bakteri enfeksiyonlarına rastlanmaktadır. Özellikle hijyen şartları düşük olan bölgelerde, bronkopnömoni mortalite oranını artırmaktadır. Kızamık enfeksiyonuna bağlı komplikasyonlar ve diğer hastalıklar Tablo-1 de verilmiştir (1,2,4,8,9,12,13,14).



ŞEKİL 2 : DOĞAL KIZAMIK ENFEKSİYONU SIRASINDA GÖRÜLEN KLİNİK BELİRTİLERİN ŞEMATİK GÖRÜNÜMÜ.

TABLO I : KIZAMIK ENFEKSİYONLARINA BAĞLI KOMPLİKASYONLAR VE
DİĞER HASTALIKLAR.

1- PRİMER VİRUS ENFEKSİYONLARINA BAĞLI KOMPLİKASYONLAR :

- Bronşiyolit
- Keratokonjunktivit
- Dev hücre pnömonisi

2- SEKONDER BAKTERİ ENFEKSİYONLARI :

- Otitis media
- Bronkopnömoni

3- SİNİR SİSTEMİ HASTALIKLARI :

- Ensefalomyelit
- Daha az sıklıkla :
 - Toksik ensefalopati
 - Optik nöritis
 - Gullian-Barre

4- YAVAŞ (= LATENT) KIZAMIK ENFEKSİYONUNA BAĞLI HASTALIKLAR :

- SSPE (Subakut sklerozan panensefalit)
- MS (Multiple skleroz) ?
- SLE (Sistemik lupus eritematozus) ?

5- İMMÜN SİSTEM BOZUKLUKLARI :

- Geç tip deri aşırı duyarlılığının geçici olarak bozulması,
- Diğer hastalıklara aşırı duyarlı olma hali, örn: TBC
- Otoimmün hastalıklar, örneğin : SLE

Subakut Sklerozan Panensefalit (SSPE) : Kızamık virusuna bağlı yavaş virus enfeksiyonları arasında, üzerinde çalışılan komplikasyon SSPE dir. Primer kızamık enfeksiyonundan 2-10 yıl sonra görülebilen bir hastalıktır. Hastaların çoğunda, 2 yaşından önce geçirilen bir kızamık enfeksiyonu öyküsü vardır. Ancak görülme oranı milyonda bir'dir. Hastalık yavaş ilerler, davranış bozukluğu ile başlayan ilk belirtileri aylar sonra nörolojik bazı bozukluklar izler. Bunlar arasında, motor fonksiyonlarında

bozukluk, myoklonik kasılmalar ve epileptik nöbetler yer alır (2,15).

Hastalığın ileri safhasında serebral dejenerasyon söz konusudur ve ölümlerle sonuçlanır.

SSPE'de patogenezi halen tam açıklık kazanmamakla beraber, hastaların serum ve BOS'larında yüksek düzeylerde kızamık virusuna karşı antikor saptanmış, beyin nöron ve glial hücrelerinde kızamık virus antijenleri floresan antikor tekniği ile gösterilmiştir. Beyin hücreleri ile normal hücrelerin kokültivasyonu, yeni bir SSPE virusunun izole edilmesini sağlamıştır. Ancak bu virus, genom ve antijenik özellikleri yönünden kızamık virusundan bazı farklılıklar göstermektedir. Özellikle viral M proteini bu virusta mevcut olmamakla beraber, hastalarda anti-M protein antikorlarına da rastlanmaktadır (2,9,14,15).

Multiple Skleroz (MS) : Etiyolojisinde kızamık virusunun rol oynayabileceğinden şüphelenilen, uzun süren serebral dejenerasyonla karakterize, multifokal lezyonlar oluşturan bir hastalıktır. Genellikle 15 yaşın üzerinde rastlanır. Özellikle beyaz cevherde meydana gelen demyelinizasyona bağlı serebral ataksi görülür. Asimetrik spastik felçler, optik nörit ve diplopi bu hastalarda görülen diğer belirtilerdir.

Hastaların serumlarında kontrol olgulara kıyasla, yükselen kızamık virusu antikor titreleri saptanmaktadır. Ayrıca MS'li hastalarda HLA-3 ve HLA-7 doku antijenleri farklı bir oranda saptanmaktadır. Hastalarda anti-myelin antikorları da gelişmekte olup etyopatogenezi kızamık virusunun rol oynayıp oynamadığı henüz kesinlik kazanmamıştır (1,2).

Bu komplikasyonlara ek olarak, özellikle bebeklik ve çocukluk çağında hücresel immün yetmezliği olan bireylerde dev hücre pnömonisi (Giant-

Cell-Pneumonia) gelişebilmektedir. Ayrıca, doğal enfeksiyonları geçirenlerde görülmesiyle birlikte, canlı attenüe kızamık aşısı ile bağışıklanan lösemi ve lenfomalı çocuklarda da dev hücre pnömonisi görülmekte ve mortaliteyi arttırmaktadır (1,2,8).

1965 yılında inaktive kızamık aşısının kullanılmasından sonra, yüksek ateş, pnömoni ve papüller şeklinde döküntüler oluşturan bir klinik sendrom tarif edilmiştir. Bu klinik sendrom atipik kızamık olarak adlandırılmış, bu nedenle inaktive kızamık aşısının kullanımından vazgeçilmiştir (1,8).

BAĞIŞIKLIK

Kızamık virusunun tek bir antijenik tipi vardır ve bu nedenle genellikle ömür boyu bağışıklık sağlar (10).

Kızamık virusu, primer olarak üst solunum yoluna yerleşip ürediği için damlacık enfeksiyonu yoluyla kolaylıkla çevreye yayılabilir. Kızamığa özgü belirtilerin çıkabilmesi için, virusun viremi yapması gerekir. Viremi sırasında virus özellikle lökositlerde üremektedir. Bu nedenle, akut kızamık olgularında lökopeni görülebilir (2,5,8).

Kızamık virusu enfeksiyonundan iyileşmede, hücreyel immunitenin önemli bir rolü vardır. Hücreyel immun yetmezliği olan çocuklarda enfeksiyon ağır seyrederek öldürücü olabilmektedir. Hücreyel bağışıklığın yanı sıra humoral bağışıklığın da virusun kandan temizlenmesinde ve hastalıktan iyileşmede rolü vardır (1,16).

Humoral bağışıklığın etkinliği şu yollarla gerçekleşebilmektedir :
Öncelikle; solunum yollarında salgısal antikorların varlığı, virusu nötralize ederek hücreleri enfekte etme olasılığını önler ve bireyi reenfeksi-

Yona karşı korur. Ancak bu koruma kısa sürelidir ve yetersiz kalabilir. Bundan başka, dolaşımda varolan antikörler, virusun solunum yollarından yayılımını engelleyerek, etkin ve uzun süren bir bağışıklık sağlarlar. Son olarak, enfekte hücrelerin yüzeyindeki antijenlerle birleşen immunoglobulinler, kompleman yardımıyla bu hücrelerin sistemden temizlenmesine yardımcı olurlar (1,2).

Kızamık enfeksiyonu ve bağışıklama, geçici olarak aşırıduyarlılık cevabının baskılanmasına neden olur. Bu nedenle, tüberküloza karşı duyarlılık artar (2).

Kızamık enfeksiyonu sırasında görülen deri döküntüleri büyük bir olasılıkla, enflamatuar bir reaksiyon ve immun harabiyet sonucu oluşmaktadır. Virus konaktan tam olarak temizlenememekte, ancak kontrol edilebilmektedir. Dolayısıyla, enfeksiyonu takiben yıllar sonra çok az sıklıkta da olsa SSPE ortaya çıkabilir. Ömür boyu bağışıklığın olduğu durumlarda ise, sınırlandırılmış bir virus replikasyonunun rolü olduğu sanılmaktadır. Bu düşünceye göre, sınırlı periodik replikasyon süresince oluşan antijenik uyarım, bağışıklığın sürekliliğini sağlamaktadır (2).

TEDAVİ

Kızamıkta etkili olan antiviral bir ilaç halen mevcut olmadığından, komplikasyonsuz seyreden olgularda sadece semptomatik tedavi yapılabilir. Ateş, antipiretik ilaçlarla kontrol edilebilir. Hasta, karanlık ve sessiz bir odada dinlendirilir (1).

Sekonder bir enfeksiyonun söz konusu olduğu durumlarda ise, sorumlu mikroorganizma tesbit edilerek uygun tedavi yapılır (1).

EPİDEMİYOLOJİ

Kızamık, 6. aydan itibaren görülebilen ve en çok 1-4 yaş grubunda rastlanan çocukluk çağı hastalığıdır. Yalıtılmış bölgelerde, hastalık en gençten en yaşlıya kadar duyarlı olan tüm toplum bireylerinde hızla yayılır. Dünyanın her yerinde yaygındır ve pratik olarak herkes kızamık enfeksiyonuna duyarlıdır. Kızamığa yakalanmada cins, sosyal sınıf, ırk, etnik grup arasında farklılık yoktur. Kalabalık toplumlarda endemi, seyrek toplumlarda 3-4 yılda bir epidemiler yapabilir (2).

Yenidoğan özellikle ilk 6 ay içinde maternal antikolar nedeniyle bağışıktır (10,11,17,18).

Hastalık, hasta ile direkt temas, damlacık enfeksiyonu ve yeni bulaşmış eşyalarla yayılır. Yayılımın kolaylığı nedeniyle, kalabalık toplumlarda (kreş, okul v.b. gibi) sıklıkla görülebilir. Bulaşma solunum yollarıyla olduğundan daha çok kışın görülür (1,2,3).

Beslenme, hastalığın epidemiyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Protein yetmezliği ile komplikasyonların ortaya çıktığı olgular birlikte artmaktadır (2,4,7).

BAĞIŞIKLAMA

Programlı ve tek doz aşı uygulaması ile % 98 korunma sağlanabilmektedir. Canlı attenüe virus aşısı ile sağlanan bağışıklamada, hastalığın kendisinin ve komplikasyonlarının insidansı önemli ölçüde azalmıştır (1,2,6,10,19,20).

T lenfositlerinin yapım ve olgunlaşmasının geç başlaması ve anneden geçen antikoların oluşturduğu pasif bağışıklık, yapılan aşı virusu-

nun replikasyonunu interfere edeceğinden rutin bağışıklamanın, 15 nci aydan önce yapılmaması önerilmektedir. Aksi halde bağışıklama, başarısızlığa uğrar (2,10,17).

Canlı attenüe kızamık aşısı, geçici olarak mikobakteri antijenlere karşı derinin aşırı duyarlılık yanıtını engelleyerek aşı sırasında ortaya çıkabilecek bir olgunun belirtilerini baskılayacağı ve varolan tuberküloz enfeksiyonunun şiddetlenmesine yol açacağı için, aşı öncesi TBC deri testinin yapılması önerilmektedir (1).

Aktif ve pasif bağışıklama olmak üzere iki tip bağışıklama yapılabilir (4,17).

Pasif bağışıklama, hiç bağışıklanmamış erişkinlere ve 6-15 aylık kızamıkla karşı karşıya kalmış bebeklere uygulanabilir (1,4).

Uygulamada, bir taraftan 0.04 ml/kg immünserum globulin, diğer taraftan canlı kızamık aşısı verilir (1).

Bağışıklılığın sürekliliği için, aşı sonrası en az iki ay içinde ve bebeklerde 15 nci ayda canlı aşı ile reimmünizasyon yapılır (1).

Pasif bağışıklama, hastada yerleşmiş ve sadece bağışıklama ile iyileşmeyen doğal kızamık olgularında da olumlu sonuç verir (1).

Aktif bağışıklama, canlı attenüe aşı ile sağlanır. Halen ülkemizde L-16 suşundan WHO'nun teknik raporuna göre, SSCB'nde hazırlanarak ithal edilen kızamık aşısı kullanılmaktadır (5,21,22,23).

Bağışıklamada karşılaşılan başarısızlıklardaki nedenler arasında ölü kızamık aşısının kullanılması gelebilir. Çünkü bu aşı, kısa süreli bağışıklık sağlamaktadır (24,25,26).

Serolojik yanıtta beklenen ve bilinen başarısızlık % 2.5 olup, aşının uygun olmayan koşullarda yapılmasından kaynaklanır.

Düşük doz veya virülansı düşük aşı kullanılması ile uygulamalar-
daki hatalar, immünizasyonun başarısızlık nedenlerindedir.

Aşıların parlak ışıpta kalması, yüksek ısıda depolanması, 1 yaştan altındaki çocuklarda canlı aşının maternal antikolarla nötralize edilmesi, aşının bebeklere insan gammaglobulini ile birlikte verilmesi de başarıklamanın başarısız olmasına yol açan etkenlerdir (19,27,28,29,30,31,32).

CANLI ATTENÜE AŞININ HAZIRLANIŞI VE ÖZELLİKLERİ :

Hazırlanışı : Kızamıkta genellikle iki tip aşı suşu kullanılmaktadır. Bunlar Edmonston-B aşı suşu ve Schwarz aşı suşudur.

Edmonston-B aşı suşu, Enders ve Peebles'in izole ettikleri ilk kızamık virusundan hazırlanmıştır.

Virus, primer insan böbreği ve amnion hücrelerinde olmak üzere 20 den fazla pasaj edilir. Son pasajlarda fibroblastik hücrelerde transformasyon görülmeye başlar. Bundan sonra virus CEF (civciv embriosu fibroblastı)'na adapte edilir. Adaptasyon için civciv embriosunda birçok kere pasaj yapılır.

Schwarz suşu ise, Edmonston-B suşunun 77 kez CEF'te pasaj edilerek daha attenüe hale getirilmesiyle elde edilir.

İlk aşamada attenüe hale getirilen aşı suşu, ampullere paylaştırılıp santrifüje yerleştirilir. Düşük devirde ve donma derecesinde santrifüj edilir. Materyal, ampul çeperine yayılarak ince ve kama şeklinde bir kitle meydana gelir. Bu yaygın ve ince tabaka, buharlaşmayı kolaylaştırır.

maktadır. Düşük devirli santrifügasyon sırasında, havası da boşaltılan ampullerdeki donmuş ince kitlenin suyu, kitle erimeden buharlaşacağından kuruma işlemi de kolaylaşır.

İkinci aşamada, buhar emici kimyasal bir madde olan Pentoxyde defosfor'lu ortamda ampullerin havası boşaltılır. Bu kimyasal madde nemi aldığı için daha vakuma ulaşmadan kurutma işlemi tamamlanmış olur. Bu aşamadan sonra, ampuller zararsız bir gaz olan Nitrojen ile doldurulur ve boğum yerinden karşılıklı alev veren lamba ile kapatılır.

Ampuller, kurutma sırasında ve kapatıldıktan sonra havasızlık ölçme aracıyla kontrol edilir, etiketlenir ve soğukta (+4°C) saklanarak aşılama için dağıtılır (33).

Özellikleri; 1 doz aşı 0.5 ml'dir. Enfeksiyöz attenüe canlı virus 1000 pfu'dan az olmamalıdır. Aşı, genellikle 1,5,10 dozluk ampul ya da şişelerde liyofilize halde hazırlanır, sarımtırak-pembe renktedir. Sulandırma sıvısı ayrı bir ampuldedir, uygulanacağı zaman sulandırılır.

Aşı ambalajı üzerinde, kullanılacak sıvı miktarı ve kullanma süresi belirtilmiştir. Genellikle başta kızamık aşısı olmak üzere, bütün canlı virus aşıları, örgüt tarafından alındıklarından itibaren iki ay içinde kullanılmalıdır.

Aşı, kızamık geçirmemiş 12-15 ayını doldurmuş çocuklara bir defa uygulanır. Epidemi olan bölgelerde 6. aydan itibaren aşı yapılabilirse de 15. ayda yinelenmelidir.

0.5 ml'lik aşı dozu, kürek kemiğinin altına, deltoid kasının üzerine gelmek üzere derialtına zerkedilir (5,21,34).

Aşı, hastalığı geçirenlerde olduğu gibi uzun süre bağıışıklık sağlar. Şimdilik rapeli düşünülmemektedir.

Kızamık salgınlarında, yüksek derecede riskli gruplara ve hiç bağışıklanmamışlara reimmünizasyon yapılması için fikir birliği söz konusu iken, görünüşte risksiz olan reimmünizasyonun rutin yapılmasının gerekliliği konusunda son günlerde tartışmalar artmaya başlamıştır.

Aşının uygulanması gereken durumları şu şekilde özetleyebiliriz : Sistemik uygulama olarak nitelendirdiğimiz 12-15 aylıktan büyük kızamık geçirmemiş çocuklara, kızamığa yakalandığında hayati tehlike olasılığı olan kardiyopati, ensefalopati, solunum yolları hastalığı olan çocuklara, endemik bölgedeki çocuklara, epidemik bölgelerdeki enfeksiyonu alan aşı-sız bebeklere ve çocuklardan zayıf bünyelilere hastalığı hafif geçirmeleri için gamaglobulinle birlikte aşı uygulanabilir. Yine epidemik bölgelerde, hastalığı geçirmemiş 6 ay ve daha büyük çocuklar aşılanır, 15 aylık devreden sonra aşı yinelenir (21).

Aşı çoğunlukla reaksiyon vermez. Enfeksiyonda görülen komplikasyonlar görülmez. Ancak aşılamaı izleyen 6-18 gün içinde hafif seyirli klinik tablo meydana gelebilir. 7-9 ncu günlerde 38-39°C ateş, atipik döküntü, hafif katarral semptomlar, gastrointestinal şikayetler, rino-faranjit görülebilir. Ateş için aspirin verilebilir (17,21).

Kızamık aşısı BDT ve Polio aşıları ile birlikte yapılabilir (5).

Aşının kontrendike olduğu durumlar : İmmüngammaglobulin, kan ve plazma transfüzyonu ile antikor verildiği zaman aşı en az 6 hafta ertelenmelidir. Yumurta allerjisi olanlara kızamık aşısı yapılmaz, zorunluluk varsa hekim kontrolünde yapılmalı ve 10 gün gözlenmelidir.

Ateşli hastalıklar ve iyileşme dönemleri, TBC ile diğer kronik ve kaşeksiye yol açan hastalıklar, malign neoplastik hastalıklar (üste-lenme dönemlerinde), kalp, böbrek, karaciğer hastalıkları, kortizon, si-

tostatik, X-ışını tedavisi altında olanlar (Kortikosteroid tedavisinden 2 hafta sonra aşı yapılabilir) ve konvülsiyon yapan hastalıklarda geçici süre, kulak iltihaplarında, kızamık veya diğer enfeksiyonlarla ilgili karantina süresince aşı uygulaması kontrendikedir (1,4,21,34).

Aşı karanlıkta, sıfırın altında öncelikle buzdolaplarının buzluklarında ya da $2-8^{\circ}\text{C}$ arasında saklanmalı, sulandırıldıktan sonra hemen kullanılmalıdır. Buz kutusunda ulaştırılması salık verilir. Zamanında alınması için gerekirse alıcıya acilen haber verilmelidir. Bütün virütik canlı attenüe aşular gibi gereksinimler iki aylık alınmalı ve stok yapılmamalıdır. Aşı $+4^{\circ}\text{C}$ de 1 yıl, -20°C de ise 2 yıl dayanır (5).

G E R E Ç v e Y Ö N T E M

HÜCRE KÜLTÜRLERİ

Kızamık virusunun ve aşı virusunun üretilmesinde Vero (devamlı, yeşil maymun böbrek hücresi) hücre kültürleri kullanıldı (Resim-1). Vero hücreleri orjinal olarak Flow Laboratuvarları Irvine, Scotland'dan sağlandı. Hücrelerin üretilmesi için MEM (Minimal Essential Medium) vasatı, % 10 dana serumu (DS) ve 100 Ü/ml Penisilin, 100 µg/ml Streptomisin ilavesiyle kullanıldı (8,35).

Hücreler 200 ml kapasiteli hücre kültürü şişelerinde (Jena glass) üretildi ve birden üçe pasaj edilerek devam ettirildi. Pasajlar her 4-5 günde bir tekrarlandı.

VİRUS

Kızamık virusu, Edmonston-B suşu NIH Maryland, USA'dan temin edildi. Aşı ise Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü Viroloji bölümünden sağlandı.

ANTİSERUMLAR

Kızamık virusuna karşı pozitif serum NIH Maryland, USA'dan temin edildi. Bunun yanısıra, kendi laboratuvarımızda, kızamık virusu ile immünize edilen iki tavşanın preimmün serumları ve postimmün serumları kontrol olarak deneylerde kullanıldı.

İmmünizasyon için tavşanlara, ilk doz intramuskuler, diğer 4 doz

beşer gün ara ile intravenöz olmak üzere 1 ml (100 TCID₅₀) kızamık virusu enjekte edildi. Son enjeksiyondan 10 gün sonra tavşanların kalb kanları toplanarak serumları ayrıldı ve -20°C de birer ml'lik hacimlerde kullanıncaya kadar saklandı (35).

SERUMLAR

Deneyde kullanılan serumlardan preimmün ve postimmün grubu kapsayan 11 serum değişik Ana ve Çocuk Sağlığı Merkezlerinden; kontrol olarak kullanılan serumlar ise Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesinde yatmakta olan 0-10 yaş grubundaki çocuklardan alındı. Serumlar deneyde kullanıncaya kadar -25°C de saklandı.

ERİTROSİT

Kompleman birleşmesi deneyi için kullanılan koyun eritrositleri, H.Ü. Deney Hayvanları bölümünden sağlandı. Alınan koyun kanı Alsever solüsyonu içinde +4°C de saklandı. Deney için, kanın 3 kez VB ile yıkanmasıyla elde edilen paket eritrositler kullanıldı (35).



RESİM 1 : Normal Vero hücre kültürü(Giemsa boyası) X 100.

DENEYDE KULLANILAN SOLÜSYONLAR

Kompleman birleşmesi deneyinde kullanılan VB (Veronal Buffer, pH = 7.2) aşağıdaki formüle göre laboratuvarımızda hazırlandı :

NaCl	8.5 gr
5,5 diethyl barbituric acid	0.575 gr
Na 5,5 diethyl barbiturate	0.2 gr
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	1.65 gr
CaCl ₂	0.28 gr

50 ml sıcak iyonsuz suda barbituric asid eritildi. Diğer maddeler eklendi ve iyonsuz su ile 200 ml'ye tamamlandı.

Otoklavda 20 dakika 120°C de steril edildikten sonra +4°C de saklandı. Kullanılırken, iyonsuz su ile 5 misli sulandırılıp pH = 7.2 ye ayarlandı (35).

HEMOLİTİK SERUM (Titre 1/3000)

Kompleman birleşmesi deneyi için Hemolitik Sistemde kullanılan hemolitik serum, Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsünden sağlandı.

MİKROTEKNİK GEREÇLERİ

Kompleman birleşmesi ve nötralizasyon deneylerinde kullanılan mikroteknik gereçleri şunlardır :

Mikrodiluter (Loop) : 0.025 ml sıvı tutma yeteneğinde olan bir araçtır.

Damlalık Pipeti : Mikroteknikte kullanılan ve 0.025 ml damla verme yeteneğinde olan özel pipetlerdir.

Test Kağıtları (GO-NO-GO) : Loopların hacmini kontrol etmede kullanılan ve üzerinde tam 0.025 ml sıvı emme yeteneğinde daireler bulunan, özel emici kağıtlardır.

U-tabanlı ve düz tabanlı peytlar : Kompleman birleşmesi deneyi için U-tabanlı ve nötralizasyon deneyi için ise düz tabanlı, 8x12 çukur içeren, polisitren yapısında olan peytlar kullanılmaktadır.

Test okuma aynası : Deneylerin değerlendirilmesinde kullanılan içbükey (konkav) aynadır.

VİRUSUN ÜRETİLMESİ VE ANTİJENİN HAZIRLANMASI :

Doku kültürü şişelerinde üretilen Vero hücreleri tek tabaka olduktan sonra virus ekimi yapıldı. Vasatları boşaltıldıktan sonra PBS solüsyonu ile yıkanarak ölü hücreler uzaklaştırıldı. Sulandırılan 5 dozluk aşıl, 1 cc olmak üzere 5 şişeye paylaştırıldı. Kontrol amacıyla bir şişe hücreye de 1 cc vasat konarak adsorbsiyon için 37°C lik etüve kaldırıldı. Şişeler sık sık sallanarak virusun tüm hücrelere adsorbe olması sağlandı. Birbuçuk saat inkübe edildikten sonra önce kontrolden başlamak üzere % 2 lik DS ve % 2 oranında SP (Streptomisin + Penisilin) içeren vasattan 20 cc ilave edildi. Tekrar 37°C lik etüve kaldırıldı. Tüm hücrelerde CPE (sito-patik etki) görülünceye kadar (3-6 gün) etüvede bekletildi. Gerekliğinde pH'ları NaHCO₃ ile nötral pH'ya ayarlandı.

3-6 gün içinde kızamık virusuna özgü CPE ortaya çıktı. Kızamık virusuna özgü sınıtyalar ve dev hücreler görüldükten ve hücrelerin % 90 indan fazlasında CPE oluştuktan sonra, kültürler -25°C de 3 kez dondurulup çözüldü. Daha sonra 3000 devir/dk da 15 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı alınarak 56°C de 30 dakika inaktive edilerek antikomplementer aktivite uzaklaştırıldı. Elde edilen bu antijen -25°C de kullanılabileceğine kadar saklandı.

Nötralizasyon testi için aynı şekilde hazırlanan virus stoku, inaktive edilmeden TCID₅₀ değeri saptanarak kullanıldı (8,35,36).

ANTIJENİN TİTRE TAYİNİ (Chessboard)

Kompleman birleşmesi deneyinde kullanılacak kızamık virusunun titresini saptamak için uygulandı.

Deneyde kullanılan maddeler :

Mikroteknik gereçleri (U-tabanlı pleyt)

Virus (Hücre kültürlerinde üretilerek hazırlanan ve -25°C de saklanan antijen)

Antiserum (Tavşandan elde edilen ve -25°C de saklanan antiserum)

Kompleman

Hemolitik sistem

Komplemanın hazırlanışı ve titre tayini :

Genç erkek kobaydan elde edilen serum kompleman olarak kullanıldı. Koyun kanınının 3 kez VB ile yıkanmasıyla elde edilen paket eritrositlerden VB kullanılarak % 4 lük eritrosit süspansiyonu hazırlandı. Hemolitik serumdan yine VB kullanılarak % 1 lik sulandırım hazırlandı. % 4 lük eritrosit ile % 1 lik hemolitik serumun eşit miktarlarda karıştırılmasıyla elde edilen hemolitik sistem 15 dakika 37°C lik su banyosunda bekletildi, hemoliz görülmeyince kullanıldı.

Deneyin yapılışı : U-tabanlı mikropleyitin bir sırasınının tümüne damlalık pipetiyle 0.025 ml VB damlatıldı.

0.025 ml'lik diluter (loop) ile kompleman alınarak seri sulandırımı yapıldı. Daha sonra, dilusyon yapılan sıraya, yine damlalık pipetiyle

2 şer damla (0.050 ml) VB damlatıldı. Üzerlerine 0.025 ml hemolitik sistem ilave edilerek 37°C lik etüve kaldırıldı. İlk 30 dakika, 10 dakikada bir karıştırmak koşuluyla bir saat bekletildi.

Bir saat sonra eritrositleri % 50 eriten doz 1 HD₅₀ (Hemolitik doz) olarak saptandı. Bunun 4 misli olan 4 HD₅₀ kompleman titresi olarak kullanıldı ve bu titre gözönüne alınarak sulandırım yapıldı (35,36).

Chessboard deneyinin esası :

Antijen sulandırımının hazırlanması : Bunun için yeterli sayıda (6 adet) tüp alındı, hepsine 0.5 ml VB damlatıldı. -25°C de saklanan antijen çözülerek 1 ml'lik pipetle 0.5 ml alındı ve birinci tüpe kondu. Sonra her tüpte pipet değiştirmek koşuluyla sırayla dilusyon yapıldı.

Antiserum sulandırımının hazırlanması: Antijen sulandırımında olduğu gibi, 6 adet tüp alınıp 0.5 ml VB konduktan sonra çözülen antiserumdan pipetle 0.5 ml alınıp dilusyon yapıldı. Yine her dilusyonda pipet değiştirildi.

Antijen sulandırım tüplerinin sonuncusundan başlamak üzere mikroyuvarıkta yukarıdan aşağıya doğru, her sulandırımdan 7 çukura birer damla damlatıldı (0.025 ml). Son çukur ise antijen kontrol olarak kullanıldı.

Antiserumlar (pozitif kontrol) ise soldan sağa yine son sulandırımdan başlamak üzere, her sulandırımdan, 7 çukura birer damla (0.025 ml) damlatıldı. Yine son çukur antiserum kontrol olarak kullanıldı.

Daha sonra, tüm çukurlara, titresi tayin edilerek sulandırılmış komplemandan 0.025 ml damlatıldı.

Bu karışım, bir gece buzdolabında bekletildi (+4°C). Ertesi gün 20

dakika oda ısısında bekletildikten sonra yeni hazırlanan hemolitik sistemden bir damla (0.025 ml) tüm çukurlara damlatıldı. 37°C lik etüve kaldırıldı. İlk 30 dakika, her 10 dakikada bir çalkalanarak bir saat bekletildi. Daha sonra, buzdolabına konarak eritrositlerin iyice çökmesi sağlandı ve sonuç değerlendirildi.

Deneyde kullanılan kontroller (herbirinden 0.025 ml olmak üzere)

Antijen kontrolü : Antijen + VB + C' + H-S

Antiserum kontrolü : Antiserum + VB + C' + H-S

Hemolitik sistem (H-S) kontrolü : VB + VB + VB + H-S

Kompleman (C') kontrolü : 1 HD₅₀ için : C' + VB + VB + H-S

2 HD₅₀ için : C' dilusyonu + VB + VB + H-S

4 HD₅₀ için : C' dilusyonu + VB + VB + H-S

KOMPLEMAN BİRLEŞMESİ DENEYİ (KBD)'NİN ESASI :

Esas deneyde kullanılan maddeler :

Kompleman (4 HD₅₀)

Antijen (2 ünite)

Hasta serumu dilusyonu

Hemolitik sistem

Veronal buffer

Mikropleyt gereçleri (U-tabanlı)

Deneyin Yapılışı :

Tüm çukurlara 0.025 ml VB damlatıldı. İnaktive edilen serumlar sırayla looplarla alınarak sulandırılmaları yapıldı.

Tüm çukurlara, ilk çukurlar hariç (1/2 lik sulandırılmalar) 0.025 ml

antijen damlatıldı. İlk çukurlar, serum (antikor) kontrolü olarak kullanıldı.

Daha sonra tüm çukurlara, 0.025 ml kompleman damlatıldı. Karışım bir gece buzdolabında bekletildi. Ertesi gün tüm çukurlara taze hazırlanan hemolitik sistemden 0.025 ml damlatıldı. 37°C lik etüvde ilk 30 dakika, her 10 dakikada bir karıştırmak koşuluyla bir saat bekletildi. Sonra buzdolabında bekletilerek sonuç okundu.

Deneydeki kontrollerin değerlendirilmesi Cheesboard deneyinin ay-
nıdır (35,36,37).

TCID₅₀ SAPTANMASI (MİKROPLEYT'TE) :

Tripsinize edilen Vero hücreleri, pipetajdan sonra % 2 FCS (Fetal dana serumu) içeren MEM vasatında, her çukura 0.2 ml (ortalama 2×10^4 hücre) konarak etüve kaldırıldı. Ertesi gün tek tabaka olan hücrelere, 10^{-1} ile 10^{-6} arasında sulandırımı yapılan virus inokule edildi.

Sulandırmalar, son sulandırmadan başlamak üzere 0.1 ml, kontrol hariç, tüm çukurlara kondu. Birbuçuk saat bekletildikten sonra, 0.1 ml vasat ilave edilerek etüve kaldırıldı ve 5 gün sonra sonuçlar, hücreler giemsa boyası ile boyanarak inverted mikroskop altında değerlendirildi.

% 50 CPE oluşan son virus sulandırımı kaydedildi. Buna göre, virus titresi 10^5 TCID₅₀ olarak saptandı ve nötralizasyon deneylerinde 100 TCID₅₀ kullanıldı (38).

NÖTRALİZASYON DENEYİ :

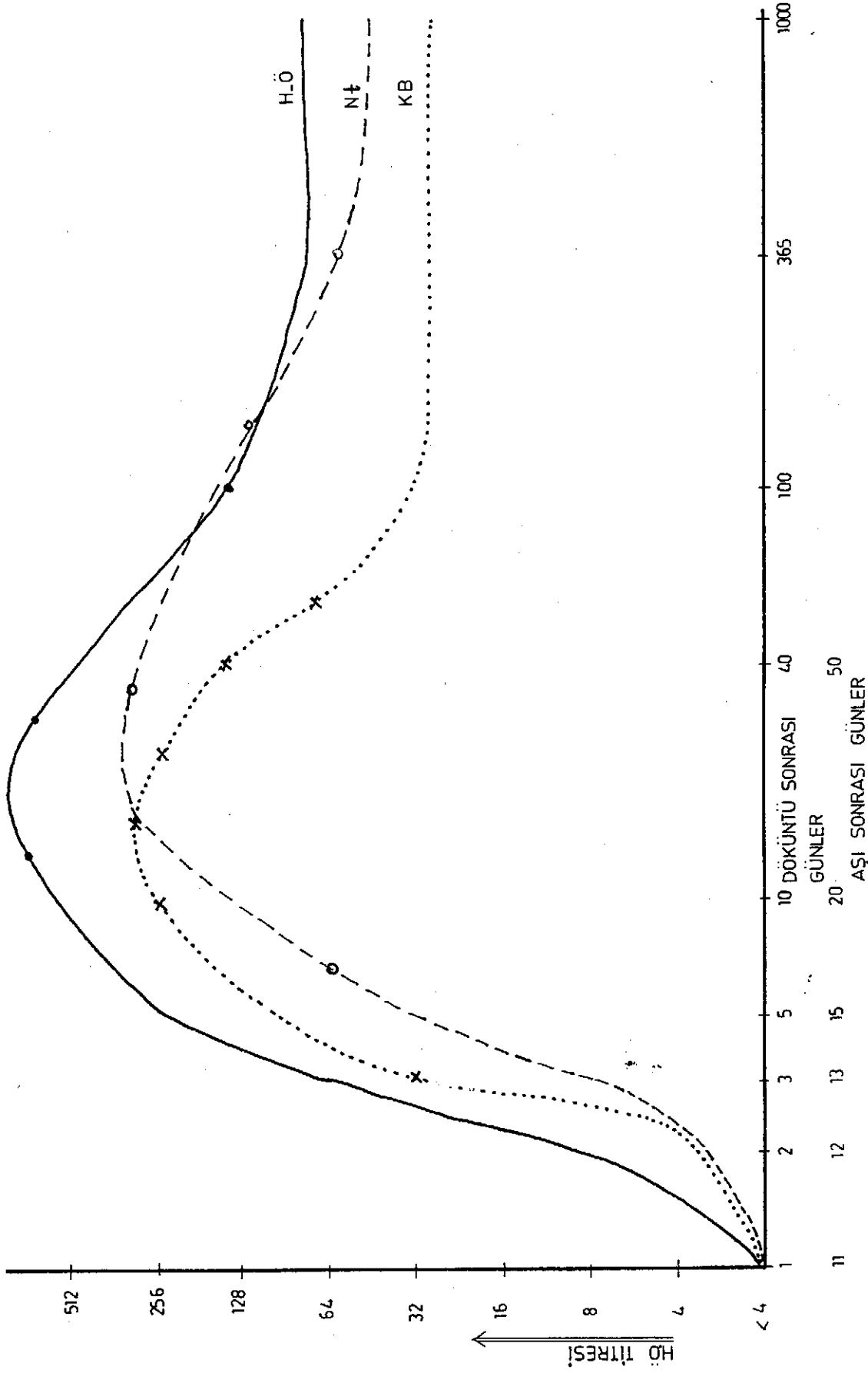
Nötralizasyon deneyi için, düz tabanlı pleytlere, tripsinize edilmiş Vero hücrelerinden her çukura 0.2 ml'de 2×10^4 hücre bulunacak şekilde kondu.

Nötralizasyona alınan serumların 1/10, 1/50, 1/100 ve 1/200 sulandırılmaları, % 2 FCS içeren MEM vasatında, seroloji tüplerinde hazırlandı. Bu sulandırılmalar üzerine, 100 TCID₅₀ içerecek şekilde yine % 2 FCS içeren MEM vasatında sulandırılan virustan eşit miktarda ilave edilerek 40 dakika buzdolabında sonra da 10 dakika oda ısısında bekletildi. Virus kontrolü olarak, eşit miktarda vasat, eşit miktarda virus sulandırımı ile karıştırıldı. Hücre kontrollerine ise sadece vasat ilave edildi. Sulandırımı yapılan ve virusla muamele edilen karışımlar, daha sonra 0.2 ml olarak ve her bir serum sulandırımı için iki çukur kullanılmak üzere pleytlere dağıtıldı ve 37°C de nemli ve havası alınmış CO₂ li ortamda ertesi güne kadar bekletildi. Ertesi gün, tüm çukurların vasatı değiştirilerek 5 gün tekrar inkübe edildi, nötralizasyon sonuçları mikroskop altında değerlendirildi (35,36,38).

KLİNİK ÖRNEKLERDEN KIZAMIK VİRUS İZOLASYONU :

Hacettepe Çocuk Hastanesi polikliniklerine kızamık nedeniyle başvuran ve klinik kızamık teşhisi konulan çocuklardan virus izolasyonu çalışması yapılmıştır.

Bunun için, içerisinde 2 ml taşıma vasatı (MEM + % 1 FCS + 200 Ü Penisilin + 200 µgr Streptomisin) bulunan eküvyonlu tüplere nazofarenks sürüntüsü alınmıştır. Klinik olarak, örnek alınan çocukların hepsinde koplik lekelerinin varlığının saptandığı bildirilmiştir. Alınan virus örneği sıvısı, 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, üst sıvı, hücre kültür tüplerine hazırlanan tek tabaka Vero hücrelerine inoküle edilmiştir. İki saat adsorbsiyonu takiben, enfekte edilen hücrelere % 2 FCS içeren MEM vasatı ilave edilmiş ve 37°C de CPE gözlenene kadar bekletilmiştir. 10 gün içerisinde CPE görülmeyen numunelerden kör pasaj yapılmıştır (35).



aşıdan ve doğal kızamık sonrası serumda kızamık antikor titreleri
aşı → HÖ = Hemagglütinasyon önlenim
doğal kızamık virüsü → Nt = nötralizasyon ve KB = kompleman birleşmesi

ŞEKİL 3 : DOĞAL KIZAMIK ENFEKSİYONU VE AŞI SONRASI ANTİKOR TİTRELERİNİN DAĞILIMI.

İZOLE EDİLEN VİRUSLARIN NÖTRALİZASYON TESTİ İLE TANIMLANMASI :

CPE si % 75 in üzerinde olan tek tabaka enfekte kültürler, kültür sıvıları ile beraber dondurulmuştur. 3 kere dondurulup çözülen örneklerden üst sıvı santrifügasyonla ayrılmış ve nötralizasyon testi ile kızamık virusu tanımlanması yapılmıştır. Bunun için, 0.2 ml 1/10 sulandırılmış izole edilen virus örneği sıvısı, 1/10 sulandırılmış immün serum ile serolojik tüpte steril koşullarda karıştırılmış ve 40 dakika buzdolabında, 10 dakika da oda ısısında bekletilmiştir. Bu karışım daha sonra 0.2 ml her bir tüpe olmak üzere, iki adet tek tabaka olmuş Vero hücre kültürüne inoküle edilmiştir. İki saat adsorbsiyondan sonra enfekte hücrelere % 2 FCS içeren MEM vasatı ilave edilmiştir. Her örnek için iki tüp kullanılmış ve kontrol için ise 0.2 ml 1/10 sulandırılmış izole edilen virus örneği, antiserum yerine 0.2 ml vasat ile muamele edilmiştir. Sonuçlar kontrol tüpleri ile karakteristik CPE oluşuktan sonra giemsa ile boyanarak değerlendirilmiştir (35).



RESİM 2 : Kızamık virusu ile enfekte Vero hücre kültürü.
Sinsitya ve çok çekirdekli hücre oluşumu.
(Giemsa boyası) X 100.

B U L G U L A R

Kızamık Aşısı ile Aşılama Önce ve Aşılama Sonra Alınan Serum

Örneklerinde Antikor Titrelelerinin Saptanması :

Kızamık virus aşısının, aşılanan bireylerdeki antikor cevabını ölçmek için Nt (nötralizasyon) ve KB (kompleman birleşmesi) deneyleri kullanılmıştır. Bunun için, çeşitli sağlık merkezlerinden toplanan örneklerin serumu ayrılmış ve deneyler uygulanana kadar -25°C de saklanmıştır. Aşılanmadan önce ve aşılamadan ortalama 21 gün sonra alınan serum örneklerindeki Nt ve KB antikorlarının titreleri Tablo-1 de gösterilmiştir.

TABLO 1 : KIZAMIK AŞISI İLE AŞILANMADAN ÖNCE VE AŞILAMADAN SONRA ALINAN SERUMLARDAKİ KIZAMIK VİRUSU Nt ve KB ANTİKOR TİTRELERİNİN DAĞILIMI.

Serum No.	AŞI ÖNCESİ ALINAN SERUMLAR		AŞI SONRASI ALINAN SERUMLAR	
	Nt Antikor titresini	KB Antikor titresini	Nt Antikor titresini	KB Antikor titresini
1	< 1/10	< 1/4	1/100	1/16
3	< 1/10	< 1/4	-	1/32
4	-	-	1/50	1/32
6	< 1/10	-	1/50	-
11	< 1/10	< 1/4	1/100	-
13	< 1/10	< 1/4	1/100	1/16
15	< 1/10	< 1/4	1/100	1/32
17	< 1/10	< 1/4	1/200	1/32
18	< 1/10	< 1/4	1/50	1/16
19	< 1/10	< 1/4	1/50	1/16
20	< 1/10	< 1/4	1/50	1/32

Tablo-1 de de görüldüğü gibi, genellikle yaşları 1-2 arasında değişen 10 çocuktan, aşılanmadan önce alınan serum örneklerinin Nt antikor titreleri 1/10 titrenin altında bulunmuş ve seronegatif olarak değerlendirilmiştir. Ancak, 6 nolu aşı öncesi alınan serumun az olması nedeniyle KB deneyi yapılamadığından sonuç tabloda gösterilememiştir. 4 nolu aşı öncesi serumun da bulunmaması nedeniyle tabloda değerleri gösterilememiştir.

Aşılanmadan sonra alınan serum örneklerindeki antikor titreleri de Tablo-1 de görülmektedir. Buna göre; 1,4,13,15,17,18,19 ve 20 nolu serum örneklerinde, hem Nt hem de KB antikor düzeylerinde artış kaydedilmiştir. 3 nolu serum örneğinde sadece KB, 6 ve 11 nolu serum örneklerinde ise sadece Nt deneyleri çalışılabilmesine rağmen bunlarda da serokonversiyon gösterilmiştir.

Nt ve KB deneyleri antikor titreleri arasında bir uyumluluk olmaması dikkati çekmekle beraber KB deneyinde 1/16 ile 1/32, Nt deneyinde ise 1/50 ile 1/200 arasında değişen kızamık virusu antikor titreleri saptanmıştır. Bu sonuçlar, serum örnekleri deneye sokulan bu bireylerde, aşının, serokonversiyona neden olduğunu gösterecek niteliktedir.

Doğal Kızamık Enfeksiyonu Geçiren, Aşılanmış, Kızamık Geçirmemiş ve Aşılanma Öyküsü Olmayan 0-10 Yaş Arası Çocuklardaki Kızamık Virusu KB Antikor Titreleri :

Doğal kızamık enfeksiyonu geçirdiği öykülerinden saptanan, yaşları 1-10 arasında değişen toplam 29 çocuktan alınan serum örneklerindeki KB antikor titreleri Tablo-2 de verilmiştir. Görüldüğü gibi, tüm test edilen serumlarda seropozitiflik saptanmıştır. Çalışılan serumların % 89 u 1/8 ve daha yüksek titreler vermişlerdir.

TABLO 2 : KIZAMIK ENFEKSİYONU GEÇİREN ÇOCUKLARDAKİ KIZAMIK VİRUSU KB ANTİKOR TİTRELERİNİN DAĞILIMI.

YAŞ (YIL) \ TİTRE	< 1/4	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Toplam Serum Adedi
1	-	-	1	1	-	1	3
2	-	-	2	-	1	-	3
4	-	1	1	1	1	1	5
5	-	-	-	1	-	-	1
6	-	-	1	1	2	1	5
7	-	1	-	1	1	1	4
8	-	-	1	1	1	-	3
9	-	-	-	-	2	1	3
10	-	1	-	-	-	1	2
TOTAL SERUM							29

Kızamık aşısı ile aşılanma öyküsü olan, aynı yaş grubundaki çocuklardan alınan 42 serum örneğinin KB antikor titreleri Tablo-3 de verilmiştir. Çalışılan serumların yaklaşık % 79 unda seropozitiflik saptanmış ve % 57 sinde ise titreler 1/8 ve üstünde bulunmuştur.

TABLO 3 : AŞILANMIŞ ÇOCUKLARDAKİ KIZAMIK VİRUSU KB ANTİKOR TİTRELERİNİN DAĞILIMI.

YAŞ (YIL) \ TİTRE	< 1/4	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Toplam Serum Adedi
1	1	-	-	-	-	-	1
2	-	2	1	-	1	-	4
3	1	1	1	2	-	1	6
4	1	-	2	3	-	-	6
5	1	1	-	1	1	1	5
6	2	1	2	-	-	-	5
7	-	1	1	-	-	-	2
8	-	-	2	-	-	2	4
9	1	1	-	-	-	-	2
10	2	2	2	-	1	-	7
TOTAL SERUM							42

Kızamık enfeksiyonunu geçirmemiş, aşılanma öyküsü olmayan veya ailelerinin kesin cevap veremediği aynı yaş grubu çocuklardan toplanan 76 serum örneğindeki kızamık virusu KB antikor titreleri Tablo-4 de görüldüğü gibi, bu gruptaki 76 çocuğun serum örneklerinin 31 inde antikor saptanmamış, 45 inde ise 1/4 ve üzerinde antikor titresi saptanmıştır. Bu gruptaki çocuk ailelerinin % 60 ı aşılanma ve geçirilmiş doğal kızamık enfeksiyonu öyküsü hatırlamadıkları halde, çocukların kızamık virusu ile karşılaşmış oldukları anlaşılmaktadır.

TABLO 4 : KIZAMIK GEÇİRMEMİŞ VE AŞILAMA ÖYKÜSÜ OLMAYAN 0-10 YAŞ ARASI ÇOCUKLARDAKİ KIZAMIK VİRUSU KB ANTİKOR TİTRELERİNİN DAĞILIMI.

YAŞ (YIL) \ TİTRE	< 1/4	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Toplam Serum adedi
0	11	4	-	1	1	-	17
1	4	-	3	5	1	-	13
2	2	-	2	-	1	-	5
3	1	-	2	1	-	-	4
4	2	2	-	1	1	-	6
5	2	1	1	2	-	-	6
6	1	-	-	-	1	-	2
7	2	1	1	1	-	-	5
8	4	-	1	-	1	-	6
9	-	1	1	3	1	-	6
10	2	-	1	3	-	-	6

TOTAL SERUM 76

Doğal kızamık enfeksiyonu geçiren, aşılanmış ve kızamık öyküsü olmayan, toplam 146 çocuğun serum örneklerindeki kızamık virusu KB antikor

titreleri Tablo-5 de gösterilmiştir. 146 serum örneğinin 40 ı (% 27) sero-
negatifken 106 sı (% 73) seropozitif bulunmuştur.

TABLO 5 : KIZAMIK ENFEKSİYONU GEÇİREN, AŞILANMIŞ, KIZAMIK
GEÇİRMEMİŞ VE AŞILANMA ÖYKÜSÜ OLMAYAN 0-10 YAŞ
ARASI ÇOCUKLARDAKİ KIZAMIK VİRUSU KB ANTİKOR
TİTRELERİNİN DAĞILIMI.

Y A Ş (Y I L)	T İ T R E < 1 / 4	1 / 4	1 / 8	1 / 1 6	1 / 3 2	1 / 6 4	Toplam Serum adedi
0	11	4	-	1	1	-	17
1	5	-	4	6	1	1	17
2	2	2	5	-	3	-	12
3	2	1	3	3	-	1	10
4	3	3	3	5	2	1	17
5	3	2	1	4	1	1	12
6	3	1	3	1	3	1	12
7	2	3	2	2	1	1	11
8	4	-	4	1	2	2	12
9	1	2	1	3	3	1	11
10	4	3	3	2	1	1	15
GENEL TOPLAM							146

Klinik Kızamık Enfeksiyonu Geçirmekte Olan Çocuklardan Virus

izolasyonu ve Virusun Nt Deneyi ile Tanımlanması :

Hacettepe Çocuk Hastanesi polikliniklerine 1984-ilkbahar ayların-
da başvuran çocukların boğaz sürüntüsü örnekleri Vero hücrelerine ekile-
rek virus izolasyonu için CPE gözlemlendi. Alınan 10 boğaz sürüntüsü örneği-
nin 9 unda yapılan kör pasaj sonucunda, kızamık virusuna özgü sınıtya ve
polikaryosit oluşum ile karakterize CPE saptandı (Tablo 6). Hücrelerin
% 90 ında CPE görüldükten sonra, hücreler vasatları ile birlikte donduru-
larak -25^o C de saklandı.

TABLO 6 : KLİNİK KIZAMIK GEÇİRMekte OLAN ÇOCUKLARDAN İZOLE EDİLEN KIZAMIK VİRUSUNUN NÖTRALİZASYON TESTİ İLE TANIMLANMASI.

HASTANIN ADI	YAŞI	VERO HÜCRESİNE YAPILAN BOĞAZ SÜRÜNTÜSÜ EKİM SONUÇLARI	İZOLATIN KIZAMIK ANTİSERUMU İLE NÖTRALİZASYON SONUÇLARI
N.E.	9 ay	CPE +	+
Z.K.	14 ay	CPE +	+
S.A.	12 ay	CPE +	+
İ.A.	7 yaş	CPE +	+
M.Ç.	12 ay	CPE +	+
R.Ö.	2.5 yaş	CPE +	+
N.K.	6 yaş	CPE +	+
H.A.	12 ay	CPE +	+
A.A.	3 yaş	CPE +	+
S.Ö.	7 yaş	CPE -	-

Örneklerin ilk ekiminden 10 gün sonra, odaklar halinde CPE görülmeğe başlandıysa da tam CPE kör pasaj yapıldıktan 7 gün sonra elde edildi. İzolatlar Nt deneyi ile kızamık virusu olarak tanımlandı (Tablo 6). Ancak bir ömektan virus izolasyonu mümkün olmadı.

İzolasyon yapılan hastalardan, İ.A. (7 yaşında)'dan klinik kızamık tanısından 2 hafta sonra alınan serum örneğinde KB antikor titresi 1/64 ve Nt antikor titresi 1/100 bulundu. Diğer hasta M.Ç.'den (1 yaşında) ise kızamık tanısından 21 gün sonra alınan serum örneğinde KB antikor titresi 1/64 bulundu.

Diğer hastalar poliklinik kontrolüne gelmedikleri için doğal kızamık enfeksiyonundan hemen sonraki antikor düzeylerini saptamak mümkün olmadı.

T A R T I Ş M A

Kızamık akut seyreden, bulaşıcı, döküntülü bir çocukluk enfeksiyonudur. Hastalıktan sonra oluşabilecek komplikasyonlar, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, çocukluk çağı ölümlerine neden olmaktadır. Bu nedenle, kızamık enfeksiyonuna karşı aşılamanın büyük önemi vardır. Kızamık virus aşısının pratiğe yansımından sonra, kızamık enfeksiyonlarına bağlı ölüm oranında ve nörolojik komplikasyonlarda büyük bir azalma kaydedilmiştir (2).

Yurdumuzda, canlı attenüe kızamık virus aşısı uygulanmaktadır. Aşılamadan başarılı sonuçlar elde edilebilmesi için birçok faktörün gözönünde bulundurulması gerekir. Bu faktörlerin arasında en önemli olanları aşılama yaşı, aşının saklanması ve soğuk zincir kırılmadan kırsal yöreye ulaşımı sayılabilir. Yurdumuzda geniş çapta kızamık aşılması uygulanmasına rağmen, genellikle kırsal yörelerde olmak üzere, halen kızamık epidemilerine ve buna bağlı çocuk ölümlerine rastlanmaktadır. Bu nedenle, aşının etkin bir bağışıklık oluşturup oluşturmadığını saptama gereği ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda esas alınan noktalardan ilki, aşının verdiği bağışıklığı saptamak olmuştur. Bunun için, yalnız Ankara ve çevresinde bulunan sağlık merkezlerinden aşılama öncesi ve aşılama sonrası serum örneklerinin toplanması ve serokonversiyonun gösterilmesi hedef alınmıştır. Ancak aşılanmaya gelen çocukların ailelerinin ikna olmaması ve tekrar merkezlere gelmemeleri nedeniyle çalışmamızda toplanılan çift serum örneği ancak 11 adet olmuştur.

Aşılamadan önce ve aşılamadan sonra alınan serum örneklerindeki kızamık virusu KB ve Nt antikör titreleri Tablo-1 de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, çalışılan tüm serumlarda serokonversiyon saptanmış ve çalışılan bireylerde, yurdumuzda kullanılan aşının bağışıklık sağlayabilecek yeterlilikte olduğu gösterilmiştir.

Daha önce yurdumuzda yapılan canlı attenüe kızamık virusu aşısı ile ilgili çalışmada % 91.3 oranında serokonversiyona rastlanmıştır. Yapılan HÖ (Hemagglütinasyon Önlenim) deneyinde ise % 81 oranında 1/120 nin üzerinde HÖ antikör titresi saptanmıştır (39).

Ancak bizim çalışmamız, aşılanmadan önce ve aşılamadan sonraki antikör titrelerinin KB ve Nt deneyi ile saptandığı, yurdumuzdaki ilk çalışmadır.

Daha sağlıklı bir sonuç alabilmek için, yurdumuzun farklı yörelerinden toplanan daha fazla serum örnekleri ile çalışılması gerekmektedir.

Çalışmamızın diğer bölümünde, yaşları 0-10 arasında değişen doğal kızamık geçirmiş, aşılanmış veya hiçbir doğal kızamık enfeksiyonu ve aşılanma öyküsü olmayan 146 serum örneğinde kızamık virusu KB antikörlerinin taranması planlanmıştır.

Doğal kızamık enfeksiyonu geçiren çocukların hepsinde 1/4 ile 1/64 arasında değişen kızamık virusu KB antikörleri saptanmıştır. Toplam 29 serum örneğinin 14 ünde (% 50), 1/32 ve 1/64 gibi yüksek titrelerin saptanması, doğal enfeksiyona rağmen bu bireylerin tekrar kızamık virusu ile karşılaşabildiğini ve döküntüsüz bir anamnestic cevabın oluşabileceğini yansıtmaktadır.

Kızamık aşılanma öyküsü olan 42 çocuğun 33 ünde seropozitiflik

kaydedilmiştir. Aşılama hikayesine rağmen 9 çocukta antikor titresi saptanamamıştır. Bunun nedeni ise ailelerin verdiği bilginin yanlış olabileceği veya yapılan aşının etkin olmadığını yansıtabilir.

Kullanılmakta olan canlı attenüe kızamık virusu aşısının serokonversiyon oranının % 98 olduğu bildirilmektedir (9). Ancak, sağlık merkezlerinden topladığımız serum örneklerindeki sonuçlar % 100 serokonversiyonu yansıtmakla beraber, Tablo-3 de aşılama çocuklardaki antikor titresinin 9 çocukta bulunmayışı, yanlış verilmiş öyküye bağlı olabilir.

Özellikle kırsal yörelerden gelen çocuk ailelerinin verdiği aşılama veya doğal kızamık enfeksiyonu öyküsü olmayan 0-10 yaş arasındaki çocuklarda bakılan KB antikor titreleri Tablo-4 de gösterilmiştir. Tablo-4 deki sonuçlar bu 76 çocuğun 31 inde antikor olmadığını, ancak geri kalan 45 inde çeşitli titrelerde (1/4 - 1/32 arası) antikor varlığını ortaya çıkarmıştır. Bu çocuklar arasında asemptomatik olarak kızamık enfeksiyonu geçirenler var olabilir. Diğerleri ise, aşılama veya doğal kızamık enfeksiyonu geçirmiş olabilirler.

Genelde kızamık enfeksiyonu geçiren, aşılama, kızamık enfeksiyonu ve aşı öyküsünü hatırlamayan aile çocuklarının toplam kızamık virusu KB antikor titreleri Tablo-5 de verilmiştir. 0-10 yaş arasındaki 146 serum örneğindeki sonuçlar % 73 seropozitiflik vermektedir. Bazı çocuklarda titrenin 1/4 gibi düşük düzeylerde olması geçmiş aşılama bağlı titreler nedeniyle olabilir. Ancak bazı titrelerin yüksek bulunması, aşılama ve doğal kızamık enfeksiyonundan sonra, çocukların tekrar kızamık virusu ile karşılaşmaları ve antikor yanıtının yükselmesi nedeniyle olabilir.

Kızamık virusu, primer ve devamlı birçok hücre kültürlerinde üreti-

lebilmektedir. En duyarlı hücreler primer fetal insan böbreği, primer maymun böbreği olmakla beraber, çeşitli devamlı hücre kültürleri (Vero, Hep-2, HeLa) virusun çoğaltılması için kullanılabilir (8). Bu çalışmada kullanılan Vero hücresi (Resim-1), kızamığa duyarlı bir hücre kültürüdür ve virusun üremesi sonucunda sinsitya ve çok çekirdekli dev hücre ile karakterize özgül bir CPE oluşur (Resim-2).

Kızamık virusu, hastalığın akut devresinde boğaz çalkantı suyu veya boğaz sürüntüsü örneklerinden üretilebilir. Çalışmamızda, klinik olarak kızamık enfeksiyonu tanısı konmuş çocuklardan alınan boğaz sürüntüsü örneğinden Vero hücrelerine ekim yapılmış ve 10 olgudan 9 unda karakteristik CPE ile virusların izolasyonları başarılmıştır. Bu izolatların, kızamık virusu olarak tanımlanması, kızamık antiserumu kullanılarak Nt deneyi ile başarılmıştır. Doğal kızamık enfeksiyonundan sonra Nt ve KB antikorları, döküntüden ortalama 15-20 gün sonra en yüksek titrede saptanmıştır (2) (Şekil-3). Kızamık virusu izole edilen çocuklardan, döküntüden ortalama 3 hafta sonra kızamık virusu KB ve Nt antikorlarının bakılması planlanmışken, ancak iki çocuktan serum elde edilebilmiştir ve her ikisinde de kızamık virusuna karşı oluşan antikorların varlığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda, az serumla da olsa kızamık aşısının antijenik etkinliği gösterilmiş ve çalışılan 11 çocuktan aşılama sonrası tam bir serokonversiyon saptanmıştır. Çalışmanın daha genişletilerek, yurdumuzun değişik aşı dağıtılan yörelerinden toplanan çift serum örneklerinde çalışmanın uygulanması daha gerçekçi bir yorumun yapılmasına olanak verecektir. Ayrıca çalışma, doğal kızamık enfeksiyonu ve aşılama öyküsü bulunan çeşitli yaş grubu bireylerinde de uygulanıp seropozitiflik oranı da saptanabilir. Çalışmamız, Ankara ve çevresindeki çocuklarda uygulanmış ve aşılamasının bağışıklık oluşturduğu saptanmıştır.

Ö Z E T

Ankara iline bağlı üç ayrı sağlık merkezine kızamık aşısı için başvuran çocukların 11 inden aşılardan önce ve aşılardan ortalama 21 gün sonra çift serum örnekleri toplanmıştır. Bu serum örneklerinde, canlı attenüe kızamık virusu aşısının etkinliğini araştırmak amacıyla KB ve Nt deneyi ile antikor düzeyleri saptanmıştır. Bu sonuçlar, serum örneği toplanan çocuklarda, aşının antijenik etkinlik ve serokonversiyon sağladığını göstermiştir. Çalışmada ayrıca, daha önce aşılama öyküsü olan doğal kızamık enfeksiyonu geçirmiş, hiç kızamık enfeksiyonu ve aşı öyküsü olmayan toplam 146 çocukta da kızamık virusu KB antikorları aranmıştır. Bu serum örnekleri, Hacettepe Çocuk Hastanesi polikliniklerine başvuran ve servislerde yatan çocuklardan elde edilmiştir.

Aşılama öyküsü olan 42 çocuğun 33 ünde 1/4 ile 1/64 titreleri arasında değişen düzeylerde KB antikorları bulunmuştur.

Doğal kızamık enfeksiyonu geçiren 29 çocuğun tümünde 1/4 ile 1/64 arasında değişen titrelerde KB antikorları bulunmuştur.

Doğal kızamık enfeksiyonu ile aşılama öyküsü olmayan 0-10 yaş arasındaki 76 çocuğun kızamık virusu KB antikorlarına bakılmıştır. Bu çocukların, 45 inde (% 60) 1/4-1/32 arasında değişen KB antikor titreleri bulunmuştur.

Genel olarak doğal kızamık enfeksiyonu geçirmiş, aşılammış veya hiç doğal kızamık enfeksiyonu ve aşılama öyküsü olmayan, yaşları 0-10 arasında değişen 146 çocuğun serum örneklerindeki seropozitiflik oranı % 73 olarak bulunmuştur.

K A Y N A K L A R

1. Cheng T and Burton A : Acute Exanthematous Diseases, In *Pediatric Infectious Diseases*. pp: 77-87, 1978.
2. Black FL: Measles. In *Viral Infections of Humans, Epidemiology and Control* (Ed by Veans AS), pp: 297-313, 1976.
3. Çetin ET : İnfeksiyon Hastalıkları, İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Ders Kitapları. C: 10, s: 15-16, 1976.
4. Gülesen Ö : Kızamık, *Epidemiyoloji*. s: 251-263, 1981.
5. WHO. *Technique Report Series*, 18th Report. 329: 53-73, 1966.
6. Özsoylu Ş : Kızamık Aşısı. *Pediatric'de Yenilikler*. s: 52-53, 1983.
7. Bilgehan H : Genel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. s: 360-361, 1981.
8. Gershan AA and Krugman S : Measles Virus. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. (5th Ed by Lennett EH and Smith NJ), American Public Health Association, Washington. pp: 665-693, 1979.
9. Krugman S, Ward R and Katz SL : Measles (Rubeola), *Infectious Diseases of Children* (6th Ed), The CV Mosby Company, pp: 132-138, 1977.
10. Jawetz E, Melnick JL and Adelberg EA : Paramyxovirus Family and Rubella Virus. In *Review of Medical Microbiology* (15th Ed). pp: 427-429, 1982.

11. Akman M ve Gülmezoğlu E : Paramiksovirus Grubu ve Kızamıkçık Virusü.
Tıbbi Mikrobiyoloji. s: 700-710, 1980.
12. Morgan M : Measles Virus and Its Associated Diseases. In Bacteriol.
Rev. 41(3): 636-666, 1977.
13. Wild TF : Measles Virus and Chronic Infections. Pathol. Biol. 29(7):
429-433, 1981.
14. Haase AT : Measles Virus Genom in Infections of the Central Nervous
System. J. Inf. Dis., 144(2): 154-160, 1981.
15. Meulen V Ter and Hall WW : Slow Virus Infections of the Nervous System
Subakut Sklerozan Panensefalit. J. Gen. Virology, 41(125): 5-9, 1978.
16. Cernescu C : Immunological Mechanisms Controlling Measles Virus
Infection. Virologie, 32(1): 41-55, 1981.
17. Gülmezoğlu E : Bağışıklığın Temelleri. s: 106-122, 1983.
18. Marks L and Friends : Measles Vaccine Efficacy at 12 months of age.
Pediatr. 62: 955, 1978.
19. Dudgean, JA : Measles and Rubella Vaccines. Arch. Dis. Childhood.
52: 9070, 1977.
20. Nagler EP, Foley AR, Furesz T and Martineau C : Studies on Attenuated
Measles Virus Vaccines in Canada. Bull. WHO. 32(6): 791-801, 1965.
21. Vaccination Against Virus Diseases. Annales Nestle. 26: 49-50, 1971.
22. Lepow ML, Nankervis GA : Eight-year Serologic Evaluation of Edmonston
Live Measles Vaccine. J. Pediatr. 75(3): 407-411, 1969.

23. Gray A : Stability of Measles Vaccines. *Develop. Biol. Stand.* 41: 265-266, 1978.
24. Smith JWG : Interrupted Immunisation. Why have we failed. *Arch. Dis. Child.* 58(3): 167-168, 1983.
25. Weibell RE, Buynak EB, McLean AA and Hilleman MR : Persistence of Antibody after Administration of Monovalent and Combined Attenuated Measles, Mumps and Rubella Virus Vaccines. *Pediatr.* 61: 5-11, 1978.
26. Lerman SJ and Gold E : Measles in Children Previously Vaccinated Against Measles. *J. Am. Med. Assoc.* 216: 1311-1314, 1971.
27. Arbeter AM, Arthus JH, Blakeman GJ and McIntosh K : Measles Immunity. *J. Pediatr.* 81(4): 737-741, 1972.
28. Russkanen M and Friends : Measles Vaccination After Exposure to Natural Measles. *J. Pediatr.* 93: 43, 1976.
29. Arı A : Canlı Attenüe Kızamık Virus Aşılı ve Memleketimizdeki Küçük Ölçüdeki Uygulama Sonuçları. *Türk Hij. Tecz. Biol. Dergisi* XXVI(2): 130, 1966.
30. Chatterji M : Failure of Attenuated Viral Vaccine in Prevention of Atypical Measles. *JAMA.* 238(24): 2635-2636, 1977.
31. New Development in Vaccines. *Proceeding of an International Symposium*, 11-13: 239-240, 1979.
32. Plotkin SA : Failure of Protection by Measles Vaccine. *J. Pediatr.* 82: 908, 1973.
33. Berke MZ : Aşıların Hazırlanması. *Tıbbi Viroloji*. C: 2, s: 1753-1759, 1974.

34. Aşı-Serum ve İmmün Globulinler Uygulama Kılavuzu. S ve SYB Sağlık İşleri Genel Müdürlüğü Yayınları. 428: 74, 1980.
35. Grist NR, Bell EJ, Follet EA and Urquhart GED : Preparation of CF Antigens and Antisera. *Diagnostic Methods in Clinical Virology*, Blackwell Scientific Pub. pp: 51-109, 1979.
36. Frankel S, Reitman S and Sonnenwirth AC : Serologic Diagnosis of Viral Infections. In *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*. Vol: 2, pp: 1624-1628, 1980.
37. Baker FJ and Breach MR : *Medical Microbiological Techniques*. pp: 270-274, 1980.
38. Lennette EN and Schmidt J : Microneutralisation test for Paramyxoviruses. In *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections* (15th Ed by Schmidt NJ), pp: 109-110, 1979.
39. Arı A : Canlı Attenüe Kızamık Virus Aşısı ile İlgili Yeni Çalışmamız. *Türk Hij. Tecr. Biol. Dergisi*. xxvii(2-3: 137-147, 1967.