

ÖZET

Ektima Hastalığının Profilaksisi için Bir İnaktif ORF Virüs Aşı Üretim Yöntemi

Mevcut buluş, ektima hastalığının profilaksisi için bir inaktif ORFV aşı üretim yöntemine ilişkindir. Söz konusu yöntem; Standart ORFV ve sahadan koyun, keçi, kuzu ve oğlakların ağız ve dudak derileri, dişeti mukozaları lezyonlu dokularından in vitro izole edilen izolat ORFV içeren ORFV karışımının L-929 fare (*Mus musculus*) hücre hattında kültürlenmesi, antijen ORFV'nin L-929 fare (*Mus musculus*) hücre hattından elde edilmesi, antijen ORFV'nin inaktivasyonu, mineral olmayan bir yağ solüsyonunda anhidroz mannitol oleik esterleri ve/veya immün stimüle komplekslerin inaktif ORFV antijenine ilave edilmesi adımlarını içermektedir.

İSTEMLER

1. Ektima hastalığının profilaksisi için bir inaktif ORFV aşısı üretim yöntemi olup özelliği
- 5 A. Standart ORFV ve sahadan koyun, keçi, kuzu ve oğlakların ağız ve dudak derileri, dişeti mukozaları lezyonlu dokularından in vitro izole edilen izolat ORFV içeren ORFV karışımının L-929 fare (*Mus musculus*) hücre hattında kültürlenmesi
- B. Antijen ORFV'nin L-929 fare (*Mus musculus*) hücre hattından elde edilmesi
- 10 C. Antijen ORFV'nin inaktivasyonu
- D. Mineral olmayan bir yağ solüsyonunda anhidroz mannitol oleik esterleri ve/veya immün stimüle komplekslerin inaktif antijen ORFV'ye ilave edilmesi
- adımlarını içermesidir.
2. İstem 1'e göre sunulan bir inaktif ORFV aşısı üretim yöntemi olup **özelliliği** L-929 fare (*Mus musculus*) hücre hattının erkek fareye ait subkutanöz bağ dokusundan elde edilmiş olmasıdır.
- 15
3. İstem 1 veya 2'ye göre sunulan bir inaktif ORFV aşısı üretim yöntemi olup **özelliliği** L-929 fare (*Mus musculus*) hücre hattı için kullanılan besiyerinin DMEM/Ham's F12 (L-Glutamine), FCS; tercihen %1-10 aralığında, %0,01-0,05 Tripsin-EDTA; tercihen %0,01-0,05 aralığında içermesidir.
- 20
4. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre sunulan bir inaktif ORFV aşısı üretim yöntemi olup **özelliliği** ORFV antijenin inaktivasyonu (C) adımıyla BEI (binary etilenimin), tercihen %0.01-3 aralığında hidrojen peroksit (H₂O₂) veya bunların bir kombinasyonunun kullanılmasıdır.
- 25
5. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre sunulan bir inaktif ORFV aşısı üretim yöntemi olup **özelliliği** mineral olmayan bir yağ solüsyonunda anhidroz mannitol oleik esterlerinin ve/veya immün stimüle komplekslerinin antijen ORFV süspansiyonuna karışım oranları 1:1 ila 1:5 aralığında olmasıdır.
- 30
6. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre sunulan bir inaktif ORFV aşısı üretim yöntemi olup **özelliliği** inaktif ORFV aşısının liyofilize formülasyonunda %1 ila %5

aralığında LAH (Laktalbumin hydrolisate) ve %2 ila %10 aralığında sükroz içermesidir.

TARİFNAME

Ektima Hastalığının Profilaksisi için Bir İnaktif ORF Virüs Aşı Üretim Yöntemi

Teknik Alan

Buluş bir inaktif aşı üretme yöntemi ile ilgilidir. Söz konusu inaktif aşı ektima hastalığının profilaksisine yöneliktir. Burada, ektima hastalığı; çoğunlukla koyun, keçi, kuzu ve oğlaklarda özellikle Orf virüs (ORFV) kaynaklı gelişen zoonotik bir hastalıktır.

Tekniğin Bilinen Durumu

Ektima hastalığı (ektima), dünya çapında koyun ve keçilerde önemli morbiditeye sahip, verim kayıplarına yol açan zoonotik bir hastalıktır. Ektimanın etkeni Orf virüs (ORFV); *Parapoxvirus* genusu, *Chordopoxvirinae* alt ailesi ve *Poxviridae* ailesi içerisinde yer almaktadır. ORFV canlı vücuduna hasar gören dokular aracılığıyla girer ve epidermal hücrelerde çoğalır. Ektima, hayvanlara genellikle enfekte hayvanlardan temas yoluyla bulaşmaktadır. Hastalık; deve, alpaka, sincap, fok, ren geyiği, misk sığırı, katır geyiği, beyaz kuyruklu geyik, antilop, karaca, kara antilobu gibi vahşi ve evcil hayvan türlerinde deneysel veya doğal olarak görülebilmektedir.

Ektima, kuzu ve oğlaklarda %10-90 arasında mortaliteye sahipken, yetişkin koyun ve keçilerde düşük mortalite seyrlidir. Keçiler koyunlara göre daha duyarlı olup hastalık daha ağır seyreder. Ektima çoğunlukla proliferatif lezyonlarla ortaya çıkar, 1-2 ay içerisinde lezyonlar ortadan kaybolur. Ağız içi ve ağız çevresindeki lezyonlar kuzularda ve oğlaklarda emmeyi, memelerdeki lezyonlar ise yavruların emzirilmesini engellemektedir. Ayakta oluşabilecek lezyonlar ise geçici topallamaya sebep olabilmektedir. Enfeksiyon tekrarlayıcı olup lezyonlar aynı klinik evrelerde ilerler fakat lezyonların boyutları daha küçüktür. Ektima normal şartlar altında ölümcül bir hastalık değildir ancak kuzuların ve oğlakların emmesinin engellenmesi ya da sekonder bakteriyel veya fungal enfeksiyonlar şekillenmesiyle ölüme sebep olabilecek zayıflatıcı bir hastalıktır. Ektima 'da morbidite yüksek olup yüzde yüze çıkabilirken, sekonder enfeksiyonlara bağlı olarak mortalite %15'e kadar çıkabilmektedir. Hastalığın tedavisinde en çok tercih edilen yol aşılama değildir. Ancak, aşılamanın sınırlı sayıda üretilmesi ve sağladıkları bağışıklığın kısa süreli olması nedeniyle alternatif tedavi yöntemleri de kullanılabilmektedir. Ektima, koyun-keçi vebası ve piyeten gibi keçi çiftliklerinde yaygın görülen hastalıklarda tedavi zorlukları, alternatif tedavi arayışları, tıbbi bitkilerin kolay

elde edilmesi, maliyetler vb. nedenlerden ötürü etnik veteriner uygulamalarının geliştirilmesi ve desteklenmesinin de gerekliliğinden bahsedilmektedir.

Türkiye’de üretilen ticari ORFV aşılı; Dermavac™ aşısı (Vetal A.Ş.), Penorf ektima aşısı (Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü) ve ORFDOLL aşısı (Dollvet A.Ş.) dır. Dünya’da üretilen ticari ORFV aşılı; Ovine ecthyma vaccine (Amerikan Colorado State, ABD), Ovine ecthyma vaccine (Texas A&M AgriLife Extension ve Bimeda Biologicals), Scabivax® Forte (MSD Animal Health) ve ORFV D1701 (Almanya) aşılıdır. Bu ürünler genellikle canlı liyofilize aşılıdır.

ORFV’ nin neden olduğu ektima hastalığı için çok eski yıllardan beri birçok deneysel aşı çalışması yapılmıştır. Bu çalışmalar günümüzde halen devam etmektedir. Bunlar; ORFV FL1 geninin klonlama ve ekspresyonu ile subünit aşı, 47CE suşuna yönelik canlı aşı, BHK-21 hücresinde ORFV IA-82 suşunun 21 kez pasajlanarak hazırlanmış canlı aşı, vahşi bir ORFV suşunun primer tavuk embriyo fibroblast hücre kültüründe seri pasajlar sonucunda atenüe edilen aşı, ektima aşı suşunun MDBK hücre kültürüne adapte edilerek hazırlanmış liyofilize aşı, embriyonik sığır akciğer hücre kültürüne ORFV D1705 atenüe suşu adapte edilmiş aşı, koyunların primer deri hücre kültürüne adapte edilen L-1 virüs suşu canlı aşısı, kuzuların fetüs derisinden pasajlanarak atenüe edilerek canlı aşı, MDBK hücre kültürüne ORFV HB-TS09 suşu adapte edilmiş aşı, yeni doğan sığır primer testis hücre kültürü ve yeni doğan Testis Caprae seu Ovis primer hücre kültürlerine adapte edilmiş ORFV HB-TS09F65 ve goatpox virus HN-XY2010F43 suşlarına yönelik aşı, keçi pox-koyun pox-aft için üçlü hücre temelli attenüe aşı, sheeppox ve orf bivalent hücre temelli atenüe aşı ve ektima virüs (soremouth) rekombinant protein antijen aşılıdır.

Koyun, keçi, kuzu ve oğlakların ORFV enfeksiyonundan korunmasında canlı atenüe aşılılar daha yaygın olarak geliştirilmekte ve kullanılmaktadır. Ancak bu tür aşılılarının üretimleri oldukça karmaşık ve maliyetlidir.

ORFV enfeksiyonu için hazırlanmış olan inaktif aşılılar ise daha kısıtlı düzeyde geliştirilmiştir. Son yıllarda inaktif aşı prosedürü kullanılarak hazırlanan rekombinant aşılılar, gen delesyonu yapılarak hazırlanan modifiye aşılılar ve ORFV vektör aşılılarının geliştirilmesi için birçok araştırma yapılmaktadır. Gerek inaktif gerekse rekombinant aşı keşfine yönelik yapılacak olan yeni çalışmalarda hem farklı hücre kültürleri hem farklı inaktivan maddeler ve hem de farklı adjuvanlar üzerine yoğunlaşarak geliştirilecek olan yeni prototip aşılıların ektima hastalığıyla mücadelede daha etkin ve farklı sonuçlar elde edilebilecektir.

Buluşun Kısa Açıklaması

Teknikte, ektima hastalığının profilaksisi için yan etkisi olmayan, güvenilir, etkili, maliyeti düşük ve uygulaması kolay bir inaktif ORF virüs aşısı üretim yöntemine ihtiyaç vardır.

Mevcut buluş bu ihtiyacı sunduğu yöntemle gidermektedir. Söz konusu yöntem; standart ORFV (ORFV NZ2 suşu ATCC VR-1548™) ve sahadan koyun, keçi, kuzu ve oğlakların 5 ağız ve dudak derileri, dişeti mukozaları lezyonlu dokularından izole edilen izolat ORFV içeren ORFV karışımının L-929 fare (*Mus musculus*) hücre hattında kültürlenmesi, antijen ORFV'nin L-929 fare (*Mus musculus*) hücre hattından elde edilmesi, antijen ORFV'nin inaktivasyonu, mineral olmayan bir yağ solüsyonunda anhidroz mannitol oleik 10 esterleri ve/veya immün stimüle komplekslerin inaktif ORFV antijenine ilave edilmesi adımlarını içermektedir.

Buluşun Detaylı Açıklaması

Mevcut buluş; başta koyun, keçi, kuzu ve oğlak olmak üzere tüm hayvanların ağız, diş 15 eti, meme ve vücut derilerinde ORFV kaynaklı gelişebilecek lezyonların önlenmesi ve bağışıklık kazanımı amacıyla profilaktik etkiye yönelik geliştirilmiş inaktif aşısı ile ilgilidir. Buluş ile geliştirilen aşısı; herhangi bir yan etkisi olmayan, güvenilir, etkili, maliyeti düşük ve uygulaması kolay bir teknolojiye sahiptir.

Mevcut buluş, ektima hastalığının profilaksisi için bir inaktif ORFV aşısı üretim yöntemine ilişkindir. Söz konusu yöntem aşağıdaki adımları içermektedir.

- 20 A. Standart ORFV ve sahadan koyun, keçi, kuzu ve oğlakların ağız ve dudak derileri, dişeti mukozaları lezyonlu dokularından in vitro izole edilen izolat ORFV içeren ORFV karışımının L-929 fare (*Mus musculus*) hücre hattında kültürlenmesi
- B. Antijen ORFV'nin L-929 fare (*Mus musculus*) hücre hattından elde edilmesi
- 25 C. Antijen ORFV'nin inaktivasyonu
- D. Mineral olmayan bir yağ solüsyonunda anhidroz mannitol oleik esterleri ve/veya immün stimüle komplekslerin inaktif ORFV antijenine ilave edilmesi

ORFV inaktif aşısı üretim yönteminde kullanılan ORFV; Sahadaki koyun, keçi, kuzu ve oğlakların ağız ve dudak derileri, dişeti mukozaları lezyonlu dokularından in vitro izole 30 edilen izolat ORFV'leri (izolat ORFV) içermektedir. Tarifname boyunca tek başına kullanılan "standart ORFV" terimi; ORFV NZ2 suşu ATCC VR-1548™ standart ORFV'yi

ifade etmektedir. Tarifname boyunca tek başına kullanılan “izolat ORFV” terimi; sahadaki koyun, keçi, kuzu ve oğlakların ağız ve dudak derileri, dişeti mukozaları lezyonlu dokularından in vitro izole edilmiş izolat ORFV'yi ifade etmektedir. Tarifname boyunca tek başına kullanılan “ORFV” terimi; standart ORFV ve izolat ORFV karışımını ifade etmektedir.

ORFV'nin L-929 fare (*Mus musculus*) hücre kültüründen izole edilerek elde edilen ORFV; antijen ORFV olarak ifade edilmiştir. Benzer olarak standart ORFV ve izolat ORFV, sırasıyla antijen standart ORFV ve antijen izolat ORFV olarak ifade edilmiştir.

Teknikte, ORFV'nin izolasyonu ve üretiminde kullanılan primer hücre kültürleri; primer kuzu testis, kuzu böbrek, sığır testis, fetal sığır kas, fetal sığır akciğer, koyun fetal türbinat, fetal kuzu kas, sığır böbrek, sığır akciğer, koyun böbrek (Shk), saiga böbrek (SK) hücreleridir. En erken 1-3, en geç 5-7 gün içinde ORFV sitopatojenik etki (CPE) göstermektedir. Meydana getirmiş olduğu CPE'ler; hücre yuvarlaklaşması, hücrelerin multinükleasyonu ve yüzeyden hücrelerin ayrılması şeklinde görülmektedir. ORFV'nin üretiminde; Madin Darby bovine kidney (MDBK), Madin Darby ovine kidney (MDOK), Madin Darby canine kidney (MDCK), rabbit kidney (RK-13), human embriyonic kidney (HEK), He-La, human monocytic hücresi (THP-1), baby hamster kidney (BHK-21), fetal lamb kidney (CSL), ovine testis (OT) ve African green monkey kidney (Vero), Macr-145, yeni doğan sığır testis hücrelerinin immortalize hücre hattına çevrilmesi sonucu elde edilen hTERT-NBSC devamlı hücre kültür hatları, fare leydig hücre tümörü (MA), FLK-BLV-044 kuzu embriyo böbrek, fetal kuzu akciğer (CSL-503), insan sünnet derisi fibroblast hücresi (HFF-1), CSL503 hücresi, sığır böbrek (BK-KI-3A) ve MA-104 kullanılmaktadır. Ayrıca ORFV, embriyo tavuk yumurtalarının koriyo allantoik membranları ve ördek embriyonik fibroblast (DEF) hücrelerinde de izole edilmiştir.

Mevcut buluşta, ORFV inaktif aşı üretim yönteminde ORFV izolasyonu ve ORFV üretimi aşamaları için kullanılan hücre hattı; L-929 fare (*Mus musculus*) (NCTC clone 929, ATCC, CCL-1™) devamlı fibroblast hücre hattıdır. Mevcut buluşun tercih edilen bir yapılanmasında, söz konusu hücre hattı, *Mus musculus* cinsi erkek fareye ait subkutanöz bağ dokusundan elde edilen fibroblast hücre kültüründen elde edilmektedir. Bu hücrelerin monolayer kültür ortamlarında flasklarda tipik fibroblast hücre üremeleri yassı uzun ve oval olarak gözlenmektedir. ORFV üretimi (çoğaltılması) ve ardından izolasyonu için L-929 hücre hattı -teknikte kullanılan diğer hücre hatları ile kıyaslandığında- beklenmedik bir şekilde iyi sonuçlar vermiştir.

ORFV üretiminde teknikte kullanılan besiyerleri; DMEM + %15 fetal dana serumu (FCS), Eagle's minimum esansiyel besiyeri (EMEM), EMEM + %2-10 FCS, Glasgow Minimum esansiyel besiyeri (GMEM), MEM + %8-10 yeni doğmuş siğir serumu (NBCS) + 2mmol/l glutamin, Medium199 (M199) + %10 siğir serumu + Hank's balanced salt solution (HBSS) (pH 7,2-7,4) + laktalbumin hidrolizat (%0,5) + %10 FCS, DMEM/Ham's F12 + %2-10 FCS, %0,37 laktalbumin hidrolizat içeren Earl's, MEM + siğir, at serumlarının %1-30 oranında tercihen %2-10 kullanılmaktadır.

Mevcut buluşun bir yapılanmasında ORFV; hücre, titrasyon, MOI, pürifikasyon, virus çoğalma eğrisi, inaktivasyon kinetiği ve adjuvant sonrası aşı formülasyonları aşamalarında besiyeri olarak; DMEM/Ham's F12 (L-Glutamine), FCS; tercihen %1-10 aralığında, %0,01-0,05 Trypsin-EDTA; tercihen %0,01-0,05 aralığında içeren besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyerinin L-929 hücre hattı ile birlikte kullanılmasının dikkat çekici şekilde verimlilik sağlayan bir sinerji olduğu görülmüştür.

Mevcut buluşun bir yapılanmasında standart ORFV ve izolat ORFV 'nin, L-929 fare (Mus musculus) devamlı fibroblast hücre hatlarına ekimleri gerçekleştirilir. Bu ekim sonucunda hücre yuvarlaklaşması, hücrelerin multinükleasyonu ve yüzeyden hücrelerin ayrılma şekillenmesi olarak sitopatolojik efekt (CPE)'ler meydana gelebilir. Bu morfolojik değişimin derecesi; ORFV dozu ve ORFV karışımı (standart ve izolat) durumuna göre değişkenlik gösterir.

Mevcut buluşun bir yapılanmasında L-929 hücre hattından antijen standart ORFV, antijen izolat ORFV ve bunların karışımı antijen ORFV izolasyonu elde edilmiştir.

ORFV inaktif aşı üretim yönteminde kullanılan titrasyon testi, tercihen mikrotitrasyon testidir. Buluşun bir yapılanmasında, antijen izolat ORFV tiplerine ait dokulardan hazırlanan inokulumlar ve antijen standart ORFV için mikrotitrasyon testleri yapılır. Bu testler sayesinde antijen ORFV'lerin kantitatif olarak enfeksiyözite gücü belirlenmiştir. Antijen izolat ORFV tiplerine ait titreler $10^{8,5}$ ve üzeri $DKID_{50}/ml$ ve antijen standart ORFV titresi $10^{5,5}$ ve üzeri $DKID_{50}/ml$ olarak belirlenmiştir.

En verimli şekilde virüs üretimi yapabilmek amacıyla çalışılan virüs suşunun optimal MOI değerleri belirlenmelidir. Mevcut buluşun bir diğer yapılanmasında ORFV üreme karakterleri de dikkate alınarak MOI 1,0; 0,1; 0,01; ve 0,001 değerlerinde hazırlanan virüs sulandırılmaları kullanılmıştır. En ideal MOI değerinin 0,1 veya 0,01 olduğu belirlenmiştir.

Mevcut buluşun bir diğer yapılanmasında antijen standart ORFV ve antijen izolat ORFV için çoğalma eğrisi belirleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bir gün önceden 24 gözlü kültür plakasına hazırlanan hücrelere 0,1 veya 0,01 MOI düzeyinde virüs ekimi yapılmıştır. Standart ORFV ve izolat ORFV *in vitro* replikasyonlarında en yüksek titre değerlerinin 96. ve 108. saatte elde edilirken, sonraki zaman dilimlerinde düzenli bir azalış olduğu görülmüştür.

Mevcut buluşun tercih edilen bir yapılanmasında antijen standart ORFV ve antijen izolat ORFV 'nin pürifikasyonu için ultrafiltrasyon (membran materyali PES, 50000 MWCO) yöntemi kullanılmıştır. Bu sayede protein ve benzeri istenmeyen maddeler uzaklaştırılmış ve antijen ORFV saflaştırılmıştır.

Teknikte, ORFV inaktivasyon kinetiği belirleme çalışmalarında genellikle kullanılmış inaktivanlar; Furokumarin (1-1000 mikrogram/ml), UV ışını (300-400 nm dalga boyu aralığında 2-20 saat süreyle 0°-10°C ortamda), 30°C'lik ısı uygulaması, ≤%0,02 oranında formaldehit, %0,1-0,25 betapropiolakton (BPL)'dir.

Mevcut buluşun bir diğer yapılanmasında buluş konusu ORFV inaktif aşı üretim yönteminde virüs inaktivasyon kinetiği belirleme çalışmaları yapılmıştır. Bu sayede aşı oluşturulması öncesi antijen standart ORFV ve antijen izolat ORFV 'nin enfeksiyözite gücünün hangi saatte zayıflatıldığı belirlenmiştir. Tercih edilen bir yapılanmada inaktivasyon aşamasında BEI (binary etilenimin) veya %0.01-3 hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanılmıştır. Tercih edilen bir diğer yapılanmada BEI (binary etilenimin), tercihen %0.01-3 aralığında hidrojen peroksit (H₂O₂) veya bunların bir kombinasyonunun kullanılmıştır.

Teknikte adjuvan olarak genellikle Montanide ISA206, mineral yağlar, bitkisel yağlar, mineral tuzlar, immünstümulantlar, kullanılmaktadır.

Mevcut buluşun bir yapılanmasında ise aşılardan etkinliğini arttırmak ve uzun süre bağışıklık sağlamasını gerçekleştirilmek amacıyla kullanılan adjuvantlar, mineral olmayan bir yağ solüsyonunda anhidroz mannitol oleik esterleri ve/veya immün stimüle kompleksleridir. Anhidroz mannitol oleik esteri olarak teknikte iyi bilenen Montanide ISA207 kullanılabilir. İmmün stimüle kompleksleri yani ISCOM da teknikte iyi bilinen adjuvanlardandır. Buluşun tercih edilen bir yapılanmasında bu adjuvanların antijen ORFV süspansiyonuna karışım oranları 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 aralığında olduğunda en iyi sonuçların alınacağı gözlemlenmiştir.

Mevcut buluşun tercih edilen bir yapılanmasında biri sıvı ve diğeri liyofilize olmak üzere 2 adet aday aşı formülasyonu oluşturulmuştur. Liyofilize aşı formülasyonu; %1 ila %5 aralığında LAH (Laktalbumin hydrolisate) ve %2 ila %10 aralığında sükröz içermektedir. Aday ORFV inaktif aşı (sıvı) titrelerinin $10^{8.5}$ ve üzeri DKID₅₀/ml ve ORFV inaktif aşı (liyofilize) titrelerinin $10^{5.5}$ ve üzeri DKID₅₀/ml olması gereklidir.

2 aday aşının ön kontrol testlerinde (fizikokimyasal ve sterilitte) uygun sonuçlar alınmasını takiben laboratuvar hayvanlarında zararsızlık ve immunojenite testlerine başlanılmıştır. Bu aşamadaki zararsızlık testlerinde fare ve diğer kobay hayvanları kullanılabilir. Bu amaçla her aday aşından 10 adet fareye intraperitoneal yolla 0,2 ml ve 2 adet kobaya kas içi yolla 1 ml enjekte edilir. Tüm deney hayvanları 7 gün süreyle gözlemlenerek bulgular takip edilir. Hayvanlarda patolojik bulgu ve ölüm görülmemesi üzerine aşı formülasyonlarının güvenli olduğu değerlendirilir. Takip eden aşamada kobaylarda uygulanan immunojenite deneylerine geçilir. Her aday aşından en az 5'er adet kobaya arka bacak bölgesinden kas içi yolla veya sırt bölgesinden derialtı yolla uygulanır. Deneme kapsamında her gruba 10 kobay konulurken, kontrol grubu olarak 5 kobaya PBS verilir. İlk enjeksiyondan 2 hafta sonra hayvanlara 2. doz aşı uygulaması yapılır. İmmunojenite çalışmasında kullanılan kobaylardan alınan kan örneklerinden hazırlanan serumlarda serolojik testler ile IgM ve IgG antikor düzeyleri belirlenir. ORFV için ELISA titreleri belirlenerek aday aşılardan immunojenik etkinlik düzeyleri gösterilir.

Mevcut buluşa konu olan sıvı aşı adayını profilaktik amaçlı ORFV; buluşun bir yapılanmasında seronegatif, PCR negatif ve klinik semptom göstermeyen hedef hayvanlara (koyun, keçi, kuzu, oğlak) uygulanır. Sıvı ORFV inaktif aşı adayını, tek doz 4 ml (koyun, keçi) / 2 ml (kuzu, oğlak) arka bacak iç bölgesinden (inguinal bölge) deri altı yapılır. Aşılı hayvanlardan 21. günde ve 42. günlerde kan alınarak ORFV IgM ELISA ve IgG ELISA ile oluşan IgM ve IgG miktarına bakılır. Bu hayvanlarda olası klinik enfeksiyon tablosu ve hastalık iyileşme süreci takip edilir.