

TAVUK HASTALIKLARININ TEŞHİSİNDE KULLANILAN İMMUNOFLORESANS TEKNİĞİ İÇİN KONJUGEYT HAZIRLANMASI

**The preparation of conjugate for the immunofluoresans
techniques of the diagnosis of poultry diseases.**

Ragıp BAYRAKTAR Lale BAYRAKTAR** Mehmet DAĞISTAN***
Osman D. ALAY****

ÖZET

İmmunfloresan veya floresan antikor metodu (IF) antijenleri tanımlama için antijenlerin yerini tayin etmek antikor tayin etmek ve mikroskop altına görünür hale getirmek için işaretlenmiş antikor veya antijenlere uygulanan bir tekniktir. İşaretli antikorların kendi antijenine bağlanması, spesifik bir antijen-antikor reaksiyonudur. IF tekniği, bir immunolojik reaksiyonun hassasiyet özelliğini mikroskop doğruluğu ile birleştirir (15). Antijen-antikor bağlanmaları immunfloresan tekniğinde değişik metodlarla yapılabilir. Direkt ve indirekt teknikleri özellikle ve hassasiyet ve yönünden karşılaştırıldıklarında, floresan madde ile işaretli antiserumla yapılan direkt teknikleri, anti immunoglobulin kullanarak yapılan tekniklerden 2 kat daha az hassas olduğu ortaya konulmuştur (4). IF metodu ilk defa Coons ve arkadaşları tarafından 1942 yılında bulunmuş (13) ve daha sonra geliştirilerek geçtiğimiz yıllarda ve günümüzde yaygın olarak mikrobiyoloji, viroloji, immunoloji ve biyoloji alanlarında kullanılmaktadır.

Şimdiye kadar ülkemizde özellikle tavuk hastalıklarının teşhisinde kullanımı, tekniğin ikinci safhasında kullanılan konjugeyitin bulunmaması ve üretilmemesi yüzünden sınırlı kalmıştır. Keza bu tür reagentleri üreten şirketlerde az sayıdadır. Bu çalışmada tavuk hastalıklarının indirekt floresan antikor tekniği ile teşhis edilmesi amacıyla konjugeyit üretimi yapılmıştır. Ülkemizde tavuk hastalıklarının teşhisi ve araştırma çalışmalarında dışarıdan oldukça zor temin edilerek kullanılan konjugeyitin üretilmesiyle bu test daha yaygın bir şekilde kullanılacaktır.

Bu çalışmada tavşan antitavuk immunoglobulinin floresan izotiyosyanat ile işaretlenme metodu çalışılmıştır. Çalışma ayrıca; tavuk Ig G elde edilmesini, anti-antikor üretecek tavşanların immunizasyonunu tavşan anti-tavuk IgG elde edilmesini, FITC ile işaretlenmesi tekniklerini kapsamaktadır.

* Vet. Kont. ve Arş. Enst.-Etlik

** Kor ve Kont. Gn. Md.lüğü-ANKARA

*** Tav. Hast. Arş. ve Aşı Üret. Enst. Md.lüğü-MANİSA

Anahtar kelimeler: Immunofloresan, IF, FAT, Tavuk IgG, Tavşan anti-tavuk IgG, FITC, antikor tayini, antijen tayini

SUMMARY

The method of immunofluorescence or fluorescent antibody is an immunological technique which applies antibodies labelled with a fluorescent dye in order to visualize, identify or locate antigens. The binding of labelled antibody its antigen is a specific antigen-antibody reaction. The IF technique combines the sensitivity and specificity of an immunological reaction with the precision of microscopy (15). The IF method which was elaborated by Coons et al (13) in 1942 and was improved later, has come to be used very widely in recent years especially in some of the western countries. It is used in microbiology, immunology and general biology. The binding of antibodies to antigens may be visualized in immunofluorescence.

In this study, we have produced conjugate for indirect FAT methods for poultry diseases. With the aim of making the conjugate for diagnosis of poultry diseases and research activities in Turkey will be available more easily.

A method of FITC labelled anti IgG is described in here. The technique consists in the preparation of chicken IgG, immunization of producer animals, the preparation of rabbit anti-chicken IgG and the conjugation of rabbit anti-chicken IgG with FITC and final treatment of the preparation. The quality of the final product is regularly tested in standart methods.

Key words: Immunofloresans , IF, FAT, chicken IgG, rabbit anti-chicken IgG, FITC, antibody detection, antigen detection.

GİRİŞ

İnsan ve hayvanlarda enfeksiyöz hastalıkların tanısında uzun yıllar etkenlerin duyarlı kültür sistemlerinde izolasyonu ve indentifikasyonu yoluna gidilmiştir. Bu yöntemin enfeksiyöz hastalıkların hızlı teşhisi bakımından bazı dezavantajları vardır. Çünkü çoğu mikroorganizmalar özellikle viruslar ve yavaş yavaş çoğalan bakterilerin kültürlerde üretilmeleri uzun zaman istemekte, kültür sonucu hekime geç ulaşacağından tedaviyi de etkilemektedir. Bazı virusların indentifikasyonu yapıldığı halde kültür sistemlerinde üretilmeleri mümkün olmamıştır. Örneğin; insanlarda hepatitis A ve B virusları klinik hepatitis olaylarının büyük çoğunluğundan sorumlu oldukları halde doku sistemlerinde üretilmezler. (19)

1941 ve 1942 yıllarında COONS ve arkadaşları Antracen isocyanate ile muamele edilmiş antikorlar vasıtasıyla dokular içindeki antijeni ortaya çıkarmış

ve bunu bir teşhis yöntemi olarak kullanmayı başarmışlardır. Ancak normal doku kesitlerinde de UV ışık altında mavi renk vermesi nedeniyle daha sonraları antracen bileşikleri yerine fluorescein boyaların kullanımı düşünülmüştür ve 1950 yılında COONS ve KAPLAN fluoresans boyaların kullanımı ile immunofloresans tekniğini bir teşhis yöntemi olarak kullanmayı başarmışlardır.

FAT veya IF tekniği, bir immunolojik reaksiyonun hassasiyet ve özelliğini, mikroskop doğruluğu ile birleştirir. Bu metodun 3 önemli uygulama alanı vardır.

- I. Antijenlerin indentifikasyonu,
 - a. Mikrobik etkenler:
virus-bakteri, rickettsia, fungi, protozoa
 - b. Organlardaki protein, enzim ve hormonlar.
- II. Dokulardaki normal veya patojen antijenlerin demonstrasyonu:
 - a. Autoimmun hastalıklar,
 - b. Immun-kompleks hastalıklar,
- III. Serumdaki antikor demonstrasyonu.

Tüm bu uygulamalar için, floresan boya (florokrom) ile işaretlenmiş spesifik bir antiserum gereklidir (5).

Antiserumun floresan boya ile işaretlenmesine "konjugasyon", işaretlenmiş antiserumada "konjugey" denir. İşaretleme sırasında, floresan boya antikor protein molekülüne sıkı kovalent bir şekilde bağlanır. Bu bağlanma dikkate alınmadan, antikorum immunolojik özelliği ve reaktivesi değiştirilemez (15).

Antijen-antikor reaksiyonunda, FITC ile işaretli antikor "direkt test" veya anti-antikor "indirekt test" homolog antijene bağlanır, bağlanmamış konjugey yıkama ile uzaklaştırılır, daha sonra preparatlar floresan mikroskopta incelenirken, antijenin spesifik floresanı koyu zeminde göze çarpar (3). **Basit direkt floresan boyama metodunda** (5), yaygın olarak kullanılan Fluorescein isothiocyanate (FITC) floresan mikroskobun ışık kaynağından yayılan 299-495 nm. dalga boyu arasındaki gözle görülmez, kısa dalga boyundaki Ultraviyole-UV ışınları absorblar. Absorbsiyondan sonra FITC yeşil renkli olarak görülür.

Işıқта 520 nm. uzunlukta dalga boyunda yeniden UV ışınları yayar. İyi bir floresan boyama, immunolojik yönden uygun ve kuvvetli bir antikor ile çok iyi konjuge edilmiş etkili bir konjugeye bağlıdır. IF tekniklerinin başarıyla uygulanmasında seçilen antikorum ilgili antijenle çapraz reaksiyon vermesi, absorpsiyon zamanı, antikor titresi ve antiserumun saklanması da -20°C'de veya liyofilize edilerek gereklidir. **İndirekt antikor boyama**'da ise primer antijene test edilerek antikor bağlanır, daha sonra üzerine FITC ile işaretli antiantikor ikinci bir antijen gibi bağlanır.

İndirect immunofloresan boyama tekniğinde antikor molekülünün Fab parçası homolog antijenin, antijenik belirleyici determinantlarına bağlanarak antijen-antikor kompleksi oluşturur. İkinci aşamada tavşanda hazırlanan ve FITC ile işaretlenmiş antiantikor antijene henüz bağlanmış olan tavuk antikorunun Fc parçasına bağlanır. Böylece mikroskopta UV yardımıyla görülebilen, floresan antijen-antikor-antiantikor kompleksi oluşur. (3)

İndirekt metodun avantajları:

a. Bir antijeni ortaya çıkarmak için işaretlenmemiş bütün serumlar kullanılabilir. Herhangi bir antiserumun reaksiyona girip girmediğini göstermek için, sadece bir tek konjugeyt örneğin; FITC ile işaretlenmiş rabbit anti chicken-tavşan anti tavuk globulini yeterlidir.

b. En önemli özellik olarak spesifik floresan daha berraktır. Her antijen determinantına tek bir tavuk antikoru bağlanırken, bir tavuk Ig molekülüne bir çok FITC işaretli antiglobulin molekülleri bağlanacaktır ki bunada çoğalma etkisi denmektedir (3). FAT tekniği, diğer serolojik testlerden olan presipitasyon ve komplement fikzasyon tekniklerinden daha hassastır (20).

MATERYAL VE METOT

Araştırmamızda kullandığımız materyaller; Floresan mikroskop, Sephadex gel column, peristaltik pompa, otomatik fraksiyon toplama cihazı, spektrofotometre, refraktometre, ultrasantrifüj, vortex mixer, manyetik karıştırıcı, soğutmalı santrifüj, semipermeable dializ tüpleri ve Sodyum sülfat, Bovine serum albumin-fraksiyon V, HEPES, TPB, Tris, PEG-6000, G-25 gel, Fluorescein isothiocyanate, Protein teşhis kiti, Amonyum sülfat ve diğer kimyasal maddeler.

Bu araştırma iki safhada gerçekleştirildi.

1. Konjugasyon solüsyonlarının üretimi hazırlanması,
2. Konjugeyt üretimi.

1. Konjugasyon Solüsyonlarının Hazırlanması:

Fosfat Buffer Salin : (BPS)

0.116 M NaCl (MW=58.44) 6.775 g.

0.01 M Na₂HPO₄ (Anhydrous, MW=141.96) 1.414 g.

0.003 M KH₂PO₄ (MW 136.09) 0.408 g.

Üzeri 1000 ml.'ye tamamlanır ve pH 1N NaOH ile 7,2'ye ayarlanır.

Karbonat-Bikarbonat Buffer, (pH=9.0)

Solüsyon A 2.65 g. Na₂CO₃ alınıp üzerine 50 ml. distile su ilave edilir.
Solüsyon B 2.10 g. NaHCO₃ alınıp üzerine 50 ml. distile su ilave edilir.
Solüsyon A'dan 1 kısım, solüsyon B'den 4 kısım alınıp karşılaştırılır, pH9,0-9,4'e ayarlanır

Satüre Amonyum sülfat solüsyonu (AS) 4M:

(NH₄)₂SO₄ MW= 132.14 528.56 g.
üzeri 1000 ml.'ye tamamlanır ve pH=7.0'a ayarlanır

Dializ tüpü hazırlama solüsyonu:

1. Na₂CO₃ 20.0 g.
EDTA 0.372 g.

Üzeri 1000 ml. suyla tamamlanır, süzülür.

2. Dializ tüpleri değişik uzunluklarda kesilip 1 nci basamakta hazırlanan solüsyonun içinde 10 dk kaynatılır.

3. Deionize su ile çalkalanır.

4. Deionize su ile 10 dk tekrar çalkalanır.

5. Deionize su ile tekrar çalkalanır.

6 1000 ml'ye 0.372 g EDTA ilave edilerek hazırlanacak 1 mM EDTA solüsyonunda +4 °C'de saklanır.

3M Sodyum Hidroksit solüsyonu:

NaOH 120.0 g

Üzeri 1000 ml distile su ile tamamlanır, filtre kağıdından süzülür, renkli şişede saklanır.

2,5 M Sülfürik asit solüsyonu:

H₂SO₄ 134 ml

Üzeri 1000 ml'ye distile su ile tamamlanır.

%16 ve %8 NaCl solüsyonu:

%16 NaCl-16 g NaCl alınıp üzeri 100 ml deionize su ile tamamlanır.

%8 NaCl-8 g NaCl alınıp üzeri 100 ml deionize su ile tamamlanır

0,2 M NaCl + 0.01 M fosfat buffer solüsyonu:

NaCl 11.68 g

HaH₂PO₄·2H₂O 0.25 g

Na₂HPO₄ 1.20 g

Üzeri 1000 ml'ye deionize su ile tamamlanır.

2. Konjugeyt Üretimi : Kimyasal metod ile kandan serum ayrılması, sodyum sülfat presipitasyon metodu ile tavuk IgG eldesi, tavşan anti-tavuk IgG eldesi ve FITC ile IgG'nin işaretlenmesi olmak üzere 4 aşamada gerçekleştirildi.

a. Kimyasal metod ile kandan serum ayrılması (Kochis metodu):

250 ml 'lik santrifüj tüpünün içine 2 ml %20'lik di-kalium oxalate-mono hydrate solüsyonundan (Merck, cat. no 5073) konup üzerine 200 ml tavuk kanı alındı. Kan santrifüj tüpüne alınırken devamlı karıştırıldı. Santrifüj tüpünün üzerine örtecek kadar Sep-Ar-Aid (Serva, cat. no: 34878) yaklaşık 6-8 g konup 2080 rpm.'de (1000 g force) 10 dk santrifüj edilerek plazma ayrıldı. Tüpteki plazma bir beher içinde pipet yardımı ile alındıktan sonra üzerine 1,22 ml 2M $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ solüsyonundan ilave edilip, oda sıcaklığında pıhtılaşmaya terk edildi. Pıhtılaşp sertleşen serum $+4^\circ\text{C}$ 'ye kaldırıldı, ertesi gün bir baget yardımı ile parçalanıp süzgeç kağıdından süzülerek, IgG eldesi için presipitasyonda kullanacağımız saf berrak serum elde edildi.

b. Sodyum Sülfat presipitasyon metodu ile Chicken IgG eldesi :

Yukarıda anlatıldığı şekilde kimyasal metodla elde edilen 100 ml tavuk serumu bir beher içinde manyetik karıştırıcının üzerine kondu. Üzerine 18 g sodyum sülfat-anhydrous extra pure (merck cat. no.:6643) ilave edilip (final konsantrasyon %18) eriyinceye kadar beklendi, tamamı eridildikten sonra 1 saat süre ile karıştırıldı, daha sonra santrifüj tüpüne alınıp 4500 rpm. de 20 dk. santrifüj edildi, süpernatantatılıp elde edilen pelet 50 ml. deionize suda eritilip üzerine 7 g sodyum sülfat konarak (final konsantrasyon %14) yukarıda anlatılan presipitasyon ve santifüj işlemi aynen tekrarlandı (6). Süpernatant atılıp pelet 10 ml deionize su ile homogenize edilip, S-300 Sephacryl gel column'dan geçirilip otomatik traksiyon kollektörde, IgG fraksiyonları toplandı. Otomatik fraksiyon kollektörün kaydedicisi ve UV-spektromonitöre göre pik görülen fraksiyonlardan IgG Solüsyonları tekrar final konsantrasyon %18 olacak şekilde sodyum sülfat ilavesiyle presipite edilip santrifüj edildi ve elde edilen pelet 2 ml Tris buffer+Na azide ile sulandırıldı. Bu sulandırılan IgG solüsyonu dializ tüpüne konup $+4^\circ\text{C}$ 'de 2 gün PBS'e karşı dializ edildi ve dializ sonunda saf Chicken IgG elde edildi. Purity test Hannover Veteriner Fakültesi Kanatlı Hayvan kliniğinde yaptırılmıştır.

c. Rabbit anti chicken IgG eldesi:

Yukarıda (b) paragrafında anlatıldığı şekilde elde edilen chicken IgG solüsyonu 1/2 oranında Freund's adjuvant ile çift enjektör metodu ile karıştırılarak homogenize edildi. 1/2 oranında kullanılan Freund' adjuvantın 1/5 kısmı complete, 4/5 kısmı incomplete olarak karıştırılıp kullanıldı. Bu homojenden

tavşanlara 3 kere intradermal 1 ml enjeksiyon yapıldı. Hayvanlara immunizasyon için her defasında 100 mg protein (100 mg IgG/1ml) enjekte edildi. 14 gün sonra ikinci ve takip eden 14 gün sonrada üçüncü enjeksiyon yapıldı (5, 12, 18) ve en son enjeksiyondan 10 gün sonrada tavşanlardan (a) paragrafında anlatıldığı üzere kan alınıp K-oxalate /CaCl₂ kimyasal metodu ile serum elde edildi. Daha sonra bu elde edilen serumdan Rabbit anti chicken IgG yukarıda (b) paragrafında anlatıldığı gibi Presipitasyon metodu ile elde edildi. Yalnız bu basamakta yapılan presipitasyonda. Presipitan madde olarak sodyum sülfat yerine Amonyum sülfat (Merck, cat. no:1216) kullanıldı ve 50 mg protein/ml elde edildi.

d. FITC ile IgG'nin işaretlenmesi:

a. Tavşan anti tavuk-rabbit antichicken IgG'nin protein konsantrasyonu tayin edildi ve 50 mg bulundu, sonra ml'de 20 mg olacak şekilde 0,2 M NaCl+0,01 M PBS ile sulandırıldı

b. Anti IgG solüsyonu buz banyosuna alınarak soğutuldu, üzerine hacminin %10'u oranında 0,5 M Karbonat buffer ilave edildi.

c. Bufferlanmış protein solüsyonuna her protein mg'ı için 30 ug FITC konup, +4°C'de buzdolabında manyetik karıştırıcı üzerinde karanlıkta bir gece düşük hızla köpürtülmeden karıştırılmaya terkedildi.

d. Ertesi gün solüsyona hacminin 1/6'sı oranında kuru Sephadex G-25 superfine (Pharmacia, cat. No:17*0033*02) ilave edildikten sonra +4°C'de buzdolabında karanlıkta manyetik karıştırıcı üzerinde aynı şekilde köpürtülmeden 3 saat karıştırıldı. Daha sonra bu karışım ucu cam yönü ile tıkanmış pastör pipetine kondu ve alt taraftan konjugeyt süzülerek toplandı.

e. Elde edilen konjugeyt dializ tüpüne kondu ve bir gece +4°C'de manyetik karıştırıcı üzerinde 5 litre PBS'e karşı dializ edildi (3, 13, 15, 19).

f. Ertesi gün konjugeyt 3000 g. kuvvetinde 30 dk soğutmalı santrifüjde santrifüj edilip süpernatant alındı ve 0.5 ml. hacimlerde buji tüplere konup, -20 °C de saklandı.

BULGULAR

Macaristan PHYLAXIA-HUMAN Enstitüsü Biyokimya bölüm başkanı Dr.G. KOCHIS tarafından geliştirilen kimyasal yolla kandan serum ayırma metodu ile elde edilen serum çok berrak, saf olduğu gibi diğer metotlara oranla %100 daha fazla miktarda serum elde edilmektedir. Biz çalışmamıza 100 cc kandan 76 cc serum elde ettik.

Serumdan presipitasyon metodu ile IgG eldesinde kanatlı serumlarında sodyum sülfat, tavşan serumundan IgG eldesinde ise amonyum sülfat daha başarılı bulundu.

Elde edilen konjugeyt standart metodlara göre (3,4,8,12,14,15,18) test edildi. Optimum konjugeyt dilusyonu 1:100 olarak bulundu. Background oluşmaması için sulandırılan konjugeyte %3 oranında Bovine serum albümin (BSA, fraction-V, Merck, cat. no: A-4503) veya aynı miktarda Fetal buzağı serumu (Serva, cat.no :47910) ilavesi faydalı bulundu.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Enstitümüz Türkiye'nin tüm tavuk aşılarının, serum ve biyolojik maddelerin üretilmesi ihtiyacına cevap vermek üzere kurulmuştur. Enfeksiyöz hastalıkların tanısında direkt etken izolasyon ve identifikasyonu hızlı teşhise cevap vermemektedir. Bu yüzden değişik serolojik ve immunokimyasal testler günümüzde önem kazanmıştır. İmmunfloresan veya floresan antikor metodu, antijenleri identifiye etmek, antikor tayin etmek ve mikroskop altında görünür hale getirmek için işaretlenmiş antikorlarla uygulanan bir tekniktir. İşaretli antikorların ise spesifik olan antijenine bağlanması normal bir antikor antijen reaksiyonudur.

Bu teknik, bir immunolojik reaksiyonun hassasiyet ve özelliğini, mikroskop doğruluğu ile birleştirmektedir. Aynı zamanda aglütinasyon ve komplement fikzasyon tekniğinden daha hassastır (20).

Sonuç olarak bu çalışma sonunda üretilen indirekt floresan antikor test konjugeyti, tüm tavuk hastalıklarında kullanılacak bütün indirekt floresan antikor testlerinde kullanılabilir.

TEŞEKKÜR

Araştırmacılar, yardımlarından dolayı Macaristan HUMAN Enstitüsü Biyokimya bölüm başkanı Dr.G.KOCHIS'e, Macaristan PHYLAXIA Enstitüsü Biyokimya bölüm başkanı Dr. T.PERENYI'ye Macar Araştırma Merkez Enstitüsünde Dr.C.S.DREN'e Almanya HANNOVER Veteriner Fakültesi Kanatlı Hastalıkları Klinik Başkanı Prof. Dr. U. NEUMANN'a bu araştırmadaki yardımlarından dolayı teşekkürü bir borç bilirlir.

KAYNAKLAR

1. ARDA, M. (1971) : Hastalık etkenlerinin titrasyon ve nötralizasyon testlerinde uygulanan laboratuvar metodları.A.Ü.Vet.Fak.Yayın no:273.

2. **BRADFORD, M. M.** (1976) : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein Utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

3. **GOLDMAN, M.** (1968) : Fluorescent Antibody methods. *Bionetics Research, USA. Academic Press.* 87-148.

4. **HAAIJMAN, J. J., SLINGERLAD, T.** (1978) : Equipment and Preparative procedures in Immuno-fluorescence microscopy: Quantitative studies. *Immunofluorescence and related staining techniques. Elsevier/ North-Holland Biomedical Press.* 11-28.

5. **HARLOW, E., LANE, D.** (1988) : Labelled antibodies with fluorochromes antibodies. *A laboratory Manual. 2nd Edition Cold Spring Harbor laboratory.* 353-358.

6. **HEBERT, G. A., PATRICIA, L. P., PITTMAN, B.**(1973) : Determination of the optimal Ammonium Sulphate Concentration for the Fractionation of Rabbit, Sheep, Horse and Goat Antisera. *Applied Microbiology.* 25: 26-36.

7. **HOLBOROW, E.J., JOHNSON, G.D.** (1976) : Application of Immunofluorescence. *Immunofluorescence II. Ed. Elsevier Press. Chov : 18.*

8. **JEFFREY, I.S.** (1982) : Fluorescence microscopy. *International Laboratory Vol: 12, No. 8:46-52.*

9. **JOHNSON, G.D., DOLLHOPF, F.L.** (1968) : Filter systems for fluorescent Antibody techniques. *Immunology* 15: 619-621.

10. **NAIRN, R.C.** (1969) : Fluorochromes and their conjugation with proteins. *Fluorescent protein Tracing. E.S.Livingstone LTD.3rd Edition.*

11. **NOWOTNY, A.** 1969 : Basic Exercises in Immunochemistry. *Temple University, school of Medicine, Philadelphia. 2nd Edition.*

12. **PHYLAXIA Veterinary Research Institute, Hungary.** (1987) : Viral products methods booklet 92-118.

13. **SKVARIL, F., FRAGNER, J.** (1965) : Experiences with the preparation of Animal Antiglobulins labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC). *Journay of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology* 9:515-523.

14. **TOMLINSON, A.H.** (1967) : Quartz-iodine illumination. *Immunology* 13: 323-324.

15. TRAUTWEIN, G. (1986) : Quatine of Immunofluorescence. Handbook of laboratory techniques. Institute of Pathology Veterinary school Hannover FR.G.28-57.

16. VILLEGAS, P. (1987) : Application of Immunofluorescence. Avin Virus Disease, Laboratory Manual. College of veterinary Medicine, University of Georgia. 55-70.

17. VUNAKIS, H.V., LANGONE, J.J. (1980) : Immunochemical Techniques. Methods in Enzymology. Academic Press. 49-104.

18. WEYBRIDGE Central Veterinary Laboratory, U. K. (1988) : Diagnostic products control section method sheets. 18-35.

19. WILAMELIN, J.P., LENOIR, G. (1978) : Preparation and conjugation to fluorescein isothio-cyanate of immunoglobulins. Manual of techniques in immunology and virology for cancer research workers post graduate course booklet. Inter. Agency for Res. on cancer, Lyon-France, 239-254.

20. WOLLAGE, J.C., DUGUID, J.P., FRASER, A.G., MARMION, B.P. (1989) : Labelled Antibodies, Practical Medical Microbiology. 13. th edition. Churchill livingstone Press, London, Vol:2 197-200.