

TAVUKLARIN BAZI VİRAL HASTALIKLARININ EPİZOOTİYOLOJİK TARAMASINDA KULLANILMAK ÜZERE ANTİGEN VE ANTİSERUM HAZIRLANMASI

Aysel ERGÜN (*)

GİRİŞ

Bilindiği gibi tavukçuluk çok yönlü yetiştirme esasına dayanır. Araştırmaya konu olan viral hastalıkların (CELO, I.B., I.L.T., I.B.D., A.E. ve EDS'76) çoğu damızlık yumurtacı ve broyler işletmelerinde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ölüm olaylarının dışında bu enfeksiyonlara bağlı verim düşüklüğü, gelişmenin gerilemesi ve enfeksiyöz hastalıklara karşı yapılan aşılamaalarda istenilen bağışıklığın temin edilemediği görülmektedir.

Bu hastalıkların ülkemizde yaygınlığının araştırılması ve bazı teşhis metodlarının laboratuvarımıza yerleşmesi amacıyla yurt çapında bir araştırma düşünülmüştür. Proje Etlik, Pendik, Bornova, Konya ve Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüleri ile Bursa ve Afyon Bölge Sağlık Kontrol Laboratuvarı tarafından yürütülmüştür.

Araştırmada; CELO, Inf. Bronşit, Inf. Laringo traheit, Inf. Bursal hastalığı ve A. Ensefalomyelit'ten serolojik taramalarında A.G.P. testi, EDS'76 ise H.I. testi uygulanmıştır. Bu uygulamada gerekli antijen ve antiserumların üretimi Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Marek Aşı Üretim Laboratuvarı tarafından karşılanmıştır.

Agar-gel presipitin testi (AGP bazı viral hastalıkların teşhisinde ve antijenlerin identifikasyonunda kullanılan basit bir yöntemdir. Woernle (1956) ilk defa A.G.P. testini Inf. Bronşitte kullanmıştır. Woernle (1959 - 1966) ve diğer araştırmacılar 9 - 11 günlük enfek-

(*) Hayvan Aşları Kontrol Merkez Müdürlüğü, Uzm. Vet. Hek., Bornova - İZMİR.

te embriyoların C.A.M'dan antijen hazırlamışlardır. Daha sonraları enfekte embriyoların allantoik mayiden hazırlanan antijen kullanılmaya başlandı. Guillen (1962) de EID 50/7-8 olan allantoik mayinin konsantre etmeden başarılı sonuç aldığını iddia etmiştir. Pek çok araştırmacı ise değişik yollardan konsantre etmek suretiyle daha net ve düzgün presipitin teşekkül edeceğini ifade etmişlerdir (21, 27, 41, 44, 43). Enfeksiyöz bronşitle A.G.P. test antijeni hazırlanmasında genellikle Beaudette suşu kullanılmaktadır. Ancak antiserum üretiminde J. Lohr (1976) yaptığı araştırmada M 41 suşunun daha iyi sonuç verdiğinden söz etmektedir.

Araştırmalar, Inf. Bronşitte, presipitin antikoru, aşılamanın yöntemine veya enfeksiyonu meydana getiren virusun virulensine bağlı olarak 1-3 hafta arasında görüldüğünü ortaya koymaktadır (5, 22, 23, 24, 26, 29).

Caporale ve arkadaşları (1972) deneysel olarak enfekte ettikleri bir grupta enfeksiyondan üç gün sonra diğer grupta ise 20 gün sonra presipitin antikoru rastlamışlardır (5).

Cough ve arkadaşları (1977) yaptıkları araştırmada ise enfeksiyondan bir hafta sonra hayvanların büyük çoğunluğunun pozitif olduğunu görmüşlerdir (12). Gaydzinski'nin (1977) yaptığı araştırma presipitin antikoru oluşması üzerinde virusun virulensinin etkinliğini ortaya koymaktadır. Buna göre H 120 ile yapılan aşılama hayvanların % 70'inde, H 52 ile yapılan aşılama ise % 100'ünün de presipitin antikoru oluştuğu ifade edilmiştir (11).

Kanatlıların adeno virus enfeksiyonlarında CELO phelp's suşu grup antijeni olarak kullanılmaktadır (3, 27, 32, 33, 34, 35, 43). Bu enfeksiyonların A.G.P. testi ile teşhisinde Wan Eck (1976) ve diğer araştırmacılar 9-11 günlük enfekte embriyoların amnio-allantoik mayilerini hiç bir konsantrasyona tabi tutmadan antijen olarak kullanmışlardır (39). Diğer bazı araştırmacılar ise 9-11 günlük enfekte embriyoların % 10'u öldükten sonra (yaklaşık 48-72 saat) geri kalanlarını öldürmek suretiyle C.A.M. antijen kaynağı olarak kullanmışlardır (26, 32, 33, 43, 44).

Yalnız Woernle'nin yaptığı bir araştırmaya göre (1966) kullandığınız suş yumurtaya adapte edilirse enfekte C.A.M.'ları 8, 9 ve 10. günde toplamanız gerekmektedir (43).

Aynı araştırmacı adenovirusun deneysel enfeksiyondan sonra 8-10 günde presipitin antikoru oluşturulduğunu kaydetmektedir. aVn Eck (1976) sahada yaptığı yumurtacı ve broyler üzerindeki taramalarında kabuksuz ve şekilsiz yumurtlamanın görülmesinden 1 hafta sonra presipitin antikorlarını gördüğünü üç hafta sonra ise kümesin tamamının pozitif olduğunu ifade etmektedir. Yates ve arkadaşlarına göre ise (1979) enfeksiyondan 8 hafta sonra presipitin antikoru oluşmaktadır (39, 42).

Gumboro hastalığında özellikle kantitatif, A.G.P. testi enfeksiyon veya bağışıklık antikoru niteliğini dahi ayırt etmede serolojik, teşhis vasıtası olarak kullanılmaktadır (7).

Cullen ve arkadaşları (1975) yılında patogen bir suşla enfekte edilmiş piliçlerin enfeksiyondan üç gün sonra B. Fabricuslarını alıp homogenize etmişler ve santrifüj yoluyla purifiye ederek antijen olarak kullanmışlardır. Daha sonra 1977 yılında Ulbrich, Mc Ferran (1977) ve 1979 yılında Ley aynı amaç için ve aynı yöntemle enfekte B. Fabricustan A.G.P. test antigeni hazırlamışlardır (7, 18, 27, 38).

Gumboro enfeksiyonundan sonra teşekkül eden presipitin antikorlarının süresi ve diğer antikorlarla paralelliği üzerinde yapılan araştırmaların sonuçları birbirini tamamlar mahiyettedir.

Bu hastalıkta hem deneysel enfeksiyonlarda hem tabii enfeksiyonlarda presipitin antikoru enfeksiyonun birinci gününde başlayıp üç hafta devam etmektedir (7, 16, 18, 45, 46, 49, 31).

Windewogel (1975) presipitin antikoru ile nötralizan antikoru arasında, Yachide (1978) ise A.G.P. testi ile redüksiyon testi arasında bağlantı bulmuşlardır. Bazı araştırmacılar ise kantitatif A.G.P. testini I. Bursal hastalığında serumda mevcut presipitin antikoru enfeksiyon veya bağışıklık antikoru niteliğini ayırt etmede kullanmaktadırlar (40, 46, 49).

Avian Ensefalomiyelit'is antijeninde genellikle embriyoya adapte Van Roekel suşu kullanılmaktadır. Lukent (1971) yılında A. E. karşı gel presitin test antigeni hazırlanması üzerinde yaptığı araştırmada enfekte embriyoların beyni ve gastro intestinal sisteminden yararlanmıştı. Bunun dışında diğer araştırmacılar enfekte embriyonun beyninden elde edilen antijenin iyi sonuç verdiğini ifade etmektedirler (2, 14, 17, 20, 25, 30).

Bu araştışıcılarından Ikeda 1977 yılında yaptığı bir araştırmada enfekte beyin süspansiyonunun purifiye edildikten sonra % 12 - 15 tuz ihtiva eden agar-gel de presipitin çizgisinin çok net olduğu sonucuna varmıştır (17). Girshick (1982) konsantre olarak hazırlanmış antijenle yapılan A.G.P. testinde presipitin antikorlarının S.N. antikorları ile paralel olduğu, Nichools (1986) yaptığı araştırmada aynı şekilde A.E. deA.G.P. testinin Elisa yerine kullanılabileceği sonucuna varmıştır (14, 30).

Laryngo traheit antijeninin hazırlanmasında embriyoya adapte bir suş kullanılmaktadır. 9 - 11 günlük embriyolar enfekte edildikten sonra 4. ve 5. günlerde C.A.M. alınarak A.G.P. testinde antijen kaynağı olarak yararlanılmaktadır (4, 9, 10, 32, 33).

Ancak bu enfeksiyonda presipitin antikorlardan serolojik teşsuş yerine patogen suş kullanırlarsa embriyoya inokulasyondan sonra 5 ve 10. günlerde C.A.M.'ın alınması gerektiğine işaret etmektedir (43).

Ancak bu enfeksiyonda presipitin antikorlardan serolojik teşhiste diğer enfeksiyon hastalıklarında ki kadar yararlanılamadığı gözlenmektedir. Nitekim Adair (1986) A.G.P. Elise, F.A. ve SN testleri üzerinde mukayeseli olarak yaptığı araştırmada presipitin antikorları ile diğer antikorlar arasında paralellik bulamamıştır (1).

MATERYAL ve METOD

Materyal :

1 — Referans Suşları :

- I.B. Beaudette suşu (İngiltere'den)
- I.B.D. Chevıelle Suşu (İngiltere ve Almanya'dan)
- CELO-Phelps Suşu (Almanya ve İngiltere'den)
- I.L.T. (Almanya'dan)
- A.E. Van Rockel ve 1143 suşu (İngiltere ve Hollanda'dan)
- EDS'76 127 suşu İngiltere'den temin edildi.

2 — Standart antijen ve antiserumlar.

3 — SPF nitelikli embriyolu yumurta (İngiltere)

4 — Yukarıdaki enfeksiyonları geçirmemiş aşısız civciz ve piliçler.

5 — Agar-gel için (Agarose ve Nöble agar)

- 6 — Embriyo fibroblast hücre kültürü (CEF)
- 7 — Araştırmaya dahil Enstitü ve Bölge Laboratuvarından gelen Bursal Fabricius ve serumlar.

Metod :

- 1 — Agarın hazırlanması :

Bütün araştırma süresi içinde Woernle'nin (1972) yaptığı formülden yararlanıldı. Yalnız fenol kullanılmadı (10, 13).

- 2 — Antigen hazırlanması :

CELO (Chicken embriyo-lethal orphan) Adenovirus enfeksiyonlarında grup antigeni olarak kabul edilen bu suşun 10^{-3} dilisyonundan SPF nitelikli 9 - 11 günlük embriyolu yumurtanın chorio allantoik boşluğuna 0,1 ml inokule edildi. İkinci, üçüncü ve dördüncü günde ölenlerin amino-allantoik sıvıları alınarak stok virus olarak -20°C muhafaza edildi (3).

A.G.P. testinde kullanılmak üzere antigen hazırlamak amacıyla bu suşun 10^{-3} dilisyonundan SPF nitelikli 9 - 11 günlük embriyolu yumurtanın Chorio-allantoik boşluğuna 0,1 ml inokule edildi. İnokulasyondan sonra;

Üçüncü günde ölenlerin amnio-allantoik mayi alındı (43).

İkinci ve üçüncü günde ölenlerle, canlı kalan embriyolar $+4^{\circ}\text{C}$ iki saat tutulduktan sonra amnio-allantoik mayi alındı ve 4500 devirde 10 dakika santrifüj edildi (39, 34, 26).

Ayrıca yine stok virusun 10^{-3} dilisyonundan 9 - 11 günlük embriyolu yumurtanın chorio - allantoik boşluğuna 0,1 ml verildi. İnokulasyondan sonra 3. ve 4. günde ölenler ve canlı kalanlar $+4^{\circ}\text{C}$ en az iki saat tutulduktan sonra C.A.M. alındı ve eşit hacimde BPS ile homogenize edilerek -20°C saklandı (32, 33, 43).

Her üç metodla elde edilen antigenler spesifik antiserumla A.G.P. testinde test edildikten sonra pozitif olanlar -20°C muhafaza edildi.

İmmun serum hazırlanmasında, yukarıda temini açıklanmış olan stok virusun 10^{-3} dilisyonundan 5 haftalık piliçler ayrı ayrı I.N. ve I.V. olarak enfekte edildiler. Enfeksiyondan 8 - 10 gün sonra kanları alındı. Spesifik antigeni ile A.G.P. testine tabi tutuldu.

tan sonra pozitif olanlar inaktive edilerek -20°C 'de muhafaza edildi (43).

Yine 10^{-3} dilisyonunda hazırlanan CELO virusundan iki grup 5 haftalık piliçler I.V. ve Kloaka yoluyla enfekte edildiler. Bu işlem bir hafta ara ile üç defa tekrarlandı. İlk enfeksiyondan sonra gün aşırı kanları alınarak pozitif olanlar inaktive edilerek -20°C 'de muhafaza edildi (4, 5, 26, 36).

Inf. Bronşit : Önce embriyoya adapte Beaudette suşunun 10^{-2} dilisyonundan SPF nitelikli 9-11 günlük embriyolu yumurtanın Chorio-allantoik boşluğuna 0,1 ml inokule edildi. İlk 24 saatte ölen embriyolar ekarte edilerek 48-72 saatte ölenlerin amino-allantoik mayileri alındı ve -20°C 'de stok virus olarak saklandı.

Antigen hazırlanmasında;

1 — a) Stok suşun 10^{-2} dilisyonundan 9-11 günlük SPF nitelikli embriyolu yumurtanın Chorio-allantoik boşluğuna 0,1 ml inokule edildi. İnokulasyondan 15-18 saat sonra C.A.M. alınarak 1/5 kloroform ile bir süre dinlendirildi. Daha sonra homogenize edilerek 10.000 devirde 20 dakika santrifüj edilip supernatant antigen olarak -20°C muhafaza edildi (43).

b) Aynı şekilde elde edilen C.A.M. membranlar eşit hacimde doymuş amonyum sulfatla karıştırılıp 10.000 devirde 20 dakika santrifüj edildikten sonra sediment antigen olarak -20°C saklandı (43).

2 — a) Yüksek titreli I. Bronşitis virusunun 10^{-3} dilisyonundan SPF nitelikli embriyolu yumurtanın Chorio-allantoik boşluğuna 0.1 ml inokule edildi. İnokulasyondan 22-28 saat sonra canlı embriyolar öldürülerek C.A.M. toplandı ve tuzlu suda yıkandıktan sonra grift tüpünde ezilerek homogenize edildi. Takiben -20°C antigen olarak muhafaza edildi (34).

b) Bölüm «a» daki gibi enfekte edilen embriyolardan 3 ve 4 günde ölenlerin C.A.M. alınarak homogenize edilerek PBS ilave edildi. Daha sonra homogenize edilerek -20°C de muhafaza edildi (32, 39).

3 — Virusun 10^{-4} dilisyonundan SPF nitelikli 9-11 günlük embriyolu yumurtanın chorio-allantoik boşluğuna 0.1 ml inokule edildi. İnokulasyondan sonra ilk 24 saatte ölenler ekarte edildi

ten sonra, 40 - 68 saat sonra ölen embriyoların amnio-allantoik sıvısı alındı ve -20°C 'de antijen olarak muhafaza edildi (21, 27).

Serum elde edilmesinde;

1 — Massachusetts tip bronşit virusundan yararlanıldı. Virusun 10^{-2} dilisyonundan 5 haftalık piliçlere 0.1 ml, I. [Nasal ve I. Tracheal inokule edildi. İnokulasyondan 8 - 10 gün sonra kanları alınarak serumları inkivasyonu takiben -20°C muhafaza edildi (43).

2 — Üç - beş haftalık piliçler ithal kaynaklı Inf. Bronşit aşısı (H 120) ile burun, göz yoluyla aşılandılar. Aşılamadan bir hafta sonra piliçler iki gruba ayrıldı. Gruplardan biri H 52 aşısı ile birer hafta aralıkla iki defa burun göz yolu ile aşılandılar. Gün aşırı kanları alınarak presipitin oluşturanlar inaktive edildikten sonra -20°C muhafaza edildi (5, 11, 23, 24, 34, 36).

İnfeksiyöz Laryngo-trahcitis Antigeni; Embriyoya adapte virusun 10^{-1} — 10^{-2} dilisyonundan SPF nitelikli embriyonun C.A.M. 0.2 ml inokule edildi. Dördüncü ve 5. günlerde ölenlerle, 5. günde canlı kalanların $+4^{\circ}\text{C}$ de en az iki saat tutulmak suretiyle öldürülerek C.A.M. alındı. Eşit hacimde PBS ile homogenize edildikten sonra 3.000 rpm 10 dakika santrüfuj edildi. Daha sonra supernatant alınarak stok virus olarak -20°C muhafaza edildi.

Stok virusunun 10^{-2} dilisyonundan 9 - 11 günlük SPF nitelikli embriyolu yumurtanın C.A.M.'ına 0,2 ml inokule edildi. İnokulasyondan sonra 4 ve 5 inci günlerde ölenlerle canlı kalanlar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de en az iki saat tutulduktan sonra C.A.M. alındı. Eşit hacimde PBS katılarak homogenize edilerek pozitif I.L.T. serumu ile A.G.P. testinde kontrol edildikten sonra -20°C 'de muhafaza edildi (1, 19, 32, 33, 37, 43).

Antiserum; elde edilmesi iki yöntemle denenmiştir :

1 — Antigen hazırlanmasında kullanılan C.A.M.'ın homogenize süspansiyonunun 1/10 dilisyonundan 0,1 ml I.V. ve I.T. olarak verildi. İnokulasyondan 8 - 10, 21 ve 28 gün sonra kan alınarak serumlar spesifik antijenle test edildi ve pozitif olanlar -20°C 'de muhafaza edildi (1, 6, 43).

2 — Yine aynı antijen kaynağından 5 haftalık piliçlere 0,1 ml I. nasal ve I. Venoz olarak inokule edildi. Bu işlem iki hafta ara ile 3 defa tekrarlandı. Enfeksiyondan sonra gün aşırı kan alınarak

serumlar spesifik antijenle A.G.P. testine tabi tutulup pozitif olanlar -20°C 'de muhafaza edildi (5).

İnfeksiyöz Bursal hastalığı (I.B.D.) Antigeni İngiltere'den temin edilen Chevill'in patogen I.B.D. suşunun 10^{-1} dilisyonundan 3-5 hafta piliçlere kloaka yoluyla 0,05 verildi. Enfeksiyonun üçüncü gününde bursa fabriciuslar alınarak eşit hacimde PBS ile homogenize edildi. Ve -20°C 'de stok virus olarak muhafaza edildi (6, 7, 38, 42, 46).

Bu suştan aynı yöntemle elde edilen homogenize enfekte B. Fabricius süspansiyonunun bir kısmı alınarak eşit hacimde distille su ve arcton 113 ilave edilmek suretiyle 2000 g. 30 dakika santrüfuj edildi ve supernatant alınarak pozitif serum karşısında test edildikten sonra A.G.P. testinde kullanılmak üzere -20°C 'de muhafaza edildi (7, 27).

Aynı enfekte B. Fabricius süspansiyonunun diğer kısmı ise eşit hacimde PBS ile homogenize edildikten sonra arcton 113 ilave edilmeden doğrudan pozitif serum karşısında test edildikten sonra A.G.P. test antigeni olarak -20°C 'de muhafaza edildi. Araştırma süresince bu yöntemle sahadan izole edilen patogen suşlarla da antijen hazırlandı ve pozitif serum karşısında kontrol edildikten sonra -20°C 'de muhafaza edildi.

Bu enfeksiyona karşı antiserum hazırlanmasında : Antigen yapımında kullanılan stok virustan 3-5 haftalık piliçlere 0,05 ml kloaka yoluyla verilmek suretiyle enfekte edildiler. Enfekte hayvanların gün aşısı kanları alınarak serumları A.G.P. testine tabi tutuldu ve pozitif reaksiyon veren piliçler kesilerek serumları alındı (6, 7, 15, 16, 19, 46, 31, 38).

Avian Encephalomyelitis; antijeninde embriyoya adapte Van Rochel suşunun 10^{-2} dilisyonundan 6 günlük SPF nitelikli embriyolu yumurtanın sarısına 0,2 ml inokule edildi. İlk 20 saatte atılarak canlı kalanların inokulasyondan 12 gün sonra beyinleri alınarak homogenizasyondan sonra -20°C 'de stok virus olarak muhafaza edildi.

Bu stok virusun 10^{-3} — 10^{-4} dilisyonundan 6 günlük embriyolu yumurtanın sarısına 0,2 ml inokule edildi. İlk 24 saatte ölenler atıldı. Diğerleri her gün muayene edilerek ölenlerin beyin ve gövdeleri alındı. Canlı kalanlar ise 12. günde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de en az iki saat

tutulduktan sonra embriyoların beyinleri ve gövdeleri alındı ve eşit miktarda PBS ile homogenize edildi. Birkaç defa dondurulup çözülerek -20°C 'de antijen olarak muhafaza edildi (2, 6, 8).

Yine aynı suşun 10^{-2} dilisyonunda SPF nitelikli embriyonun yumurta sarısına 0,1 ml inokule edildi. Enfeksiyondan 9 gün sonra embriyonun beyni ve gastro-intestinal sistemi (bezli mide, mide ve barsak) ayrı ayrı alınarak eşit hacimde PBS ile homogenize edilerek 3 defa dondurulup çözüldü. Böylece elde edilen antijenlerin yarısı doğrudan, diğer yarısı 2500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek supernatant A.G.P. test antijeni olarak -20°C 'de muhafaza edildi (20). Bu yöntemle ilave olarak inokulasyondan sonra 6, 7 ve 8. ile 12. günlerde ölen embriyoların beyinleri ve mide barsak sisteminden ayrı ayrı antijen hazırlandı. A.G.P. testinde pozitif serum karşısında test edilerek -20°C 'de muhafaza edildi.

Antiserum üretiminde; yukarıda tekniği açıklanan antijenlerden hem beyin hem de gövde süspansiyondan 3-4 haftalık piliçlere 0,01 ml I. Cerebral ve I. Muskuler olarak enfekte edildi. Gün aşırı yapılan serum kontrollerinde pozitif serumlar inaktive edilerek -20°C 'de muhafaza edildi (2, 20, 6).

Egg Drop Sendrom hastalığının kontrolünde kullanılan H.I testi için antijen hazırlamak amacıyla EDS 127 suşu temin edilmiştir. Fakat CEF hücre kültürüne ekimde üreme temin edilemedi. Daha sonra yeniden suş temin edilemediği için çalışma devam ettirilemedi.

Bu araştırma devam ettiği müddet içinde üretilen antijen ve antiserumların dışında izolasyon çalışmaları da yapıldı.

Etlik Vet. Kont. ve Araş. Enst. Tavuk Teşhis Laboratuvarında «Çankaya» kodu ile gönderilen enfekte B. Fabricius'un 1/10 süspansiyonu hazırlandı.

Süspansiyondan;

1 — Onbir günlük embriyolu yumurtanın Chorio-allantoik boşluğuna 0,1 ml inokule edildi ve ölen embriyolar histopatolojiye verildi.

2 — Üç haftalık piliçler ayrı süspansiyondan 0,05 kloaka yoluyla enfekte edildiler. Enfeksiyonu takip eden üç gün içinde ölen ve ağır klinik belirtiler gösteren civcivlerin B. Fabriciuslar alın-

rak bir kısmı histopatoloji laboratuvarına gönderildi. Bir kısmı da yeniden homogenize edilerek referans antiserumla A.G.P. testine tabi tutuldu.

Aynı şekilde canlı kalanlardan kan almak suretiyle serumları referans antijenli A.G.P. testine tabi tutuldu.

Bu ilk vakanın dışında Afyon'dan 13, Etlik'ten 9, Bursa Bölge Laboratuvarı'ndan 15 adet B. fabricius'dan aynı şekilde izolasyon çalışmaları yapıldı.

Bunların dışında, Türkiye Kalkınma Vakfı Bolu ve Çubuk üniversitelerinden gelen 57 adet serum Inf. Bronşit ve Ensefalomyelit yönünden Elazığ Viroloji Enstitüsü'nden gelen 32 serum I. Bursal hastalığı yönünden A.G.P. testine tabi tutuldu.

BULGULAR

Adenovirus enfeksiyonlarının taranmasında grup antijeni olarak kabul edilen CELO (Chicken embriyo lethal arphan), I.B. (Inf. Bronchitis), I.B.D. (Inf. Brusal Disease), karşı antijen ve antiserum hazırlanmasında ve bunların serodiagnostik olarak kullanılmasında oldukça başarılı sonuçlar alındı.

CELO antijeninin hazırlanmasında metod bölümünde açıklandığı üzere enfekte embriyolardan alınan amnio. allantoik mayi ve C.A.M.'dan ayrı ayrı antijen hazırlandı. Ancak her iki yöntemle hazırlanan antijenlerden, üçve dördüncü günlerde ölen embriyoların C.A.M.'dan hazırlanmış antijenin araştırma süresince iyi netice verdiği gözlemlendi (32, 33, 43).

Antiserum hazırlanmasında ise, I. Nasal ve kloaka yoluyla yalnız bir defa enfekte edilmiş hayvanlardan enfeksiyondan sonra alınan kan serumlarında presipitin bandına nadir olarak rastlandı (43). Buna karşın I. Venöz ve kloaka yoluyla birer hafta ara ile üç defa enfekte edilen piliçlerden enfeksiyondan sonra gün aşısı alınan kan serumlarında; ilk pozitifseruma ikinci enfeksiyondan 6 gün sonra I. Venöz yolla enfekte edilen gruplar rastlandı ve üçüncü enfeksiyondan sonra ise pozitif serumların adedi arttı. Kloaka yoluyla enfekte edilen grupta ise son enfeksiyondan üç hafta sonra presipitin antikoruna rastlandı. (5, 23, 24).

Materyal metod bölümünde de açıklandığı gibi Inf. Bronşit antijeninin hazırlanmasında birkaç yöntem denendi. Bu açıklama

süresince embriyolu yumurtaya inokulasyondan sonra 3. ve 4. günlerde ölen embriyoların C.A.M.'den hazırlanan antigenden başarılı sonuç alındı. Buna karşın bazı veriler aksine enfekte amnio-allantoik sıvıdan hazırladığımız antijenlerde presipitin bandı oluşmadığı gözlemlendi (32, 33).

Antiserum hazırlanmasında; CELO antiserumun hazırlanmasında olduğu gibi hangi yolla enfekte edilirse edilsin, tek injeksiyondan sonra çok az serum presipitin oluşturdu.

Buna karşın burun - göz ve içme suyu ile aşılanmış gruplarda, ikinci aşılamaadan 2 ve 4 gün sonra pozitif seruma rastlandı. Üçüncü enfeksiyondan 7 - 10 gün sonra ise piliçlerin hepsi pozitif (4, 11, 23, 24, 34).

I. Laryngotracheitis antigeni hazırlanmasında bütün verilerde aynı yöntemden yararlanıldığı dikkati çekmektedir. Kaynaklara uyularak aynı şekilde 4 ve 5. günlerde ölen enfekte embriyoların C.A.M. ile 5 günde canlı kalan fakat C.A.M.'lerinde kalınlaşma ve plak teşekkülü olanlar ayrıldı. Bilahare eşit hacimde PBS ilave edilerek homogenize edildi ve böylece I.L.T. karşı A.G.P. antigeni hazırlanmış oldu. Ancak CELO ve I.B. olduğu gibi pasaj yapmak suretiyle stok virusu artırmak mümkün olmadı. Çünkü pasaj esnasında virus presipitin bandı oluşma özelliğini kaybediyordu. Dolayısıyla araştırmanın devam ettiği 3 yıl müddetince düzenli üretim sağlanamadı (1, 6, 19).

Laryngotracheitis antiserumunun hazırlanmasında CEL^o ve I. Bronşitte olduğu gibi I.N. ve I. Venöz olarak bir defa enfekte edilen piliçlerde nadir olarak presipitin antikorları görüldü (6).

Buna rağmen iki hafta ara ile üç defa tekrarlanan injeksiyonla enfekte olan piliçlerde gün aşırı yapılan kontrolde 8 ve 10'uncu günlerde hayvanların büyük çoğunluğunun pozitif olduğu görüldü (5, 33, 34).

Enfeksiyöz Bursal hastalığına karşı A.G.P. test antigeni hazırlanmasında enfekte B. Fabriciuslardan yararlanıldı. Başlangıçta, Cheville'in patogen suşundan kullanılmakla beraber daha sonraki deneysel enfeksiyonlar mahallî suşlarla gerçekleştirildi. Enfeksiyonun üçüncü gününde alınan enfekte B. fabriciusların homogenizasyonunda purifikasyon için kullanılan Arcton 113'ün çok önemli rolünün olmadığı gözlemlendi. Bazı verilerin sonuçlarından farklı ola-

rak, araştırma boyunca yaptığımız mukayeseli çalışmada yalnız PBS ile homogenizasyonu takiben santrifüjden sonra kullanılan antijenin daha iyi presipitin bandı oluşturduğu gözlemlendi (6, 7, 27, 38, 49).

Serum elde edilmesinde ise kloaka yoluyla enfekte edilen hayvanlardan enfeksiyondan sonra gün aşırı kan alınarak pozitif bir antijen karşısında A.G.P. testine tabi tutuldu. Değişik zamanlarda birkaç defa antiserum temini için enfekte edilen deneme piliçlerinde enfeksiyonun 1'inci ve 3'üncü günlerinde dahi pozitif seruma rastlamakla birlikte hayvanların % 100'ünde 9. günde presipitin antikoru bulunuyordu (7, 15, 16, 46).

A. Ensafalomyelit antijeninin hazırlanmasında bazı araştırmalar dışında genellikle adapte Van Roekel suşu kullanılmaktadır. A.G.P. test antijeninin temin için birkaç yöntem denenmiştir. Bizim çalışmalarımızda, embriyoların enfeksiyondan sonra, hangi günde olursa olsun enfekte embriyoların beyin ve gövdelerinden hiç bir konsantrasyona tabi tutmadan hazırlanan antigenden sonuç alınamadı. A.G.P. testinde en iyi presipitin bandını enfeksiyondan sonra 9. ve 10. günlerde embriyoların gastro-intestinal sisteminden hazırlanan antijen oluşturdu (20).

serum üretiminde ise, beyin içi inokulasyon yapılan civcivlerde gün aşırı yapılan serum kontrollerinde 4. hafta pozitif seruma rastlanıldı.

TARTIŞMA

SPF yumurtanın teminindeki güçlük nedeniyle araştırma süresince üretilen antijen ve antiserumlar araştırmaya katılan kurumların ihtiyacını karşılamak amacıyla birkaç defa tekrar edildi. Ve böylece üretim metodları her seferinde yeniden kontrol edilmiş oldu.

Antijen ve antiserumların üretiminde amacımıza uygunluk göstermesi bakımından Woernle'nin (1966) yaptığı araştırma esas alındı. Buna göre CELO'da virusun embriyoya inokulasyonundan sonra 3. ve 4. günlerde, I. L. T.'de 5. günlerde enfekte C.A.M.'dan hazırlanan antijenler spesifik antiserumları ile presipitin bandı oluşturdu (6, 32, 33). Devamlı bir üretim için ekonomik olmayan bu yöntemden sonra CELO antijeninde McFerran (1977) ve

Wan Eck (1976) yaptığı araştırmalara dayanılarak enfekte amnio-allantoik mayi ile de çalışıldı. Aldığımız sonuçlar olumsuz olup bu araştırmacıların sonuçlarına uygunluk göstermedi (27, 39). Inf. Bronşit'te ise Lohr (1976) yaptığı detaylı araştırmada enfektivite ile presipitin arasında bağlantı bulamamıştır. Araştırmacı virüsü embriyoya inokulasyonundan 20, 60 ve 120 saat sonra allantoik mayi enfektif olmakla beraber yalnız 68 saatte presipitin yüksek olduğu sonucunu elde etmiştir. McFerran ise (1977) de enfekte embriyonun amino-allantoik mayi'nin enfeksiyondan sonraki 40. saatte presipitin ihtiva ettiğinden söz etmektedir (21, 27).

Bizim çalışmalarımızda 40 ve 68. saatlerde enfekte amni-allantoik mayiden hazırlanan antijen presipitin bandı oluşturmadı. Daha sonra Schmidt (1967-1969) yıllarında bu konuda yaptığı araştırmaya dayanılarak enfekte C.A.M.'dan hiç bir prisifikasyona tabi tutulmadan hazırlanan antigenden çok iyi sonuç alındı (32, 33).

CELO, I.B., I.L.T., enfeksiyonlarına karşı antiserum hazırlanmasında elde ettiğimiz sonuçlar diğer araştırmaların sonuçları ile paralellik göstermedi. Daha önce açıklandığı gibi, deneme hayvanlarına belirli aralıklarla iki veya daha fazla enfeksiyondan sonra presipitin daha çabuk oluştuğu ve pozitif hayvan sayısının arttığı gözlemlendi (4, 5, 6, 11, 23, 24, 33). Ancak barınaklarımızın yetersizliği nedeniyle denemeye alınan piliçler uzun süre tutulamadı ve presipitin antikorlarının ne zaman kaybolduğu tesbit edilemedi.

Gumboro hastalığının teşhisinde yararlanmak amacıyla A.G.P. test antijeninin hazırlanmasında proje teklif formunda iki yöntem önerilmiştir. Bunlardan biri enfekte embriyoların C.A.M.'dan diğeri ise enfekte piliçlerin B. Fabriciuslarından hazırlanıyordu. Daha sonraki çalışmalarımızda araştırmalarının büyük çoğunluğunun enfekte B. Fabriciuslardan yararlandığını müşahade ettik. Nitekim bu metodu esas alarak hazırladığımız antijenlerden veriler doğrultusunda sürekli olarak müsbet sonuç alındı (6, 7, 27, 38, 49).

Aynı enfeksiyona karşı pozitif serum çalışmalarımızda da enfeksiyondan sonra birinci günden 9. güne kadar pozitif seruma rastlanıldı (7, 15, 16, 46).

A. Ensafalomyelit antigeni hazırlanmasında aldığımız sonuçlar Lukert'in (1971) aldığı sonuçlar tamamen ayrıldı. Van Roekel suşu ile enfekte embriyoların 8, 9 ve 10. günlerde mide ve barsak-

larından hazırlanan antijen A.G.P. testinde presipitin bandı oluştu (20). Buna karşın enfekte embriyoların beyinlerinden hiçbir purifikasyonuna tabi tutulmadan hazırlanan antijen A.G.P. testinde pozitif serum karşısında presipitin çizgisi oluşturmadı. Bu sonuç 6 ayı araştırmacıların elde ettikleri sonuçlara ters düşmekle beraber (6, 8) diğer bazıları ile uyum sağlandı. Nitekim Matsumoto (1977) yine aynı yıllarda, İkade (1977) ve daha sonraları Nichelos (1986) yaptıkları araştırmalarda A. Ensafalomycclitis'in teşhisinde A.G.P. testinin önemini belirterek kullanılan antijenin purifiye ve konsantre olmasının zorunlu olduğunu ifade etmişlerdir (17, 25, 30)

Antiserum üretiminde ise civcivlere beyin içi inokulasyondan sonra, 4. haftada pozitif seruma rastlanıldı. Yapılan araştırmalar A.E.'de presipitin antikorlarının virusun inokulasyon yoluna bağlı olarak enfeksiyondan sonra 4. günde 2 haftaya kadar değişen zamanlarda teşekkül ettiğini gösteriyor (14, 30). Elde ettiğimiz bu sonucu enfekte beyinden standartlara uygun konsantre antijen üretememekteki başarısız sonuçla açıklıyoruz.

SONUÇ ve ÖNERİLER

A.G.P. testi basit fakat halen lobaratuvuarlarımızda bazı viral hastalıkların serolojik teşhisinde kullanılabilen bir yöntemdir. Ancak alınacak sonuçların sağlıklı olması için kullanılacak antijen ve antiserumların standartlara uygun olması ve testi uygulama zamanının iyi bilinmesi gerekmektedir. Bu araştırma bize bu konuda oldukça geniş deney kazandırmıştır. Gerçi A. Ensafalomyelitis ve Egg Drop Sendrom antijenleri zamanında hazırlanamamıştır. Fakat bundan böyle bu antijenleri de yapabilecek bilgi birikimi sağlanmıştır. Bu konudaki çalışmalar devam ettirilmeli, hatta yalnız araştırmaya konu olan enfeksiyonların değil, ilaveten REV (Reticuloendotheliani), REO, Marek ve diğer enfeksiyonlara karşı antijen ve antiserumlar hazırlanmalıdır.

Özellikle viral hastalıklarda izolasyon ve identifikasyon çalışmalarına ağırlık verilmelidir.

ÖZET

Tavukların bazı viral hastalıklarına (I. Bronşit, I. Laringotraheit, I. Bursal hastalığı) (CELO ve Avian Ansafalomyelit) karşı A.G.P. testinde kullanılmak üzere antijen ve antiserum hazırlandı.

I.B., I.L.T., I.B.D. şe CELO antigenlerinin hazırlanmasında SPF nitelikli 9-10 günlük enfekte embriyolarını korio-allentoik membranlarından yararlanıldı. A. Ensafalomiyelit antigeninde ise enfekte embriyoların beyin ve gastro intestinal sisteminden yararlanıldı. Gastro-intestinal sistemden hazırlanan antigen çok iyi sonuç verdi. Fakat aynı yöntemle hazırlanan beyin süspansiyonu bu test için kullanılamadı ve süspansiyonun ultra santrifüjde purifiye ve konsantre edilmesi gerektiği sonucuna varıldı. Gumboro antigeni ise enfekte piliçlerin B. Fabricius'dan hazırlandı ve çok iyi sonuç alındı.

Immun serum hazırlanmasında ise; I.B.D. hariç, diğer enfeksiyonlarda hangi yolla olursa olsun (I. Venoz ve I. Tracheal) antigen, birden fazla inokule edildiğinde presipitin antikor taşıyan pozitif hayvan sayısının arttığı gözlemlendi.

SUMMARY

Against the some viral disease of the chickens (Inf. Bronchitis, Inf. Laryngotracheitis, I. Bursal Disease, CELO and Avian Encephalomyelitis) We prepared an antigen and an antiserum touse with A.G.P. tests. We used C.A.M. of the 9-10 days old infected from SPF flock in ordır to prepare I.B., I.L.T. and CELO antigen. For the antigen. We used brain and gastro-intestinal tracts of the infected embryos. Prepared antigen from the gastro-intestinal tracts, gave a positive reaction at A.G.P. But we could not use the brain suspension in which prepared with the same method for this test So we decided that the suspension (in the ultracentrifuge) has to be purified and concentrated. We prepared I.B.D. antigen from the B. Fabricius of the infected chicks and have very good results.

The preparation of the immun serum for the other infections except I.B.D.; no matter which way we use (I. Venously or I. Tracheally) if the antigen is inoculated more than once We observed that the number of positive animals increased.

LİTERATÜR

- 1 — ADAIR, B. M.; TODD, E. R.; K. BURNS (1986) : Comparison of serological tests for detection of Antibodies to Infectious Lryngotracheitis virus Zootecnica International. February, 68-72.
- 2 — BERGER, R. G. (1982) : An in vitro assay for quantifying the virus of Avian Encephalomyelitis. Reprinted form Avian Diseases, Vol. 26 No. 3(July-September.

- 3 — CALNEK, B. V. W. (1978) : Haemagglutination Inhibition antibodies against adeno virus (virus 127) in white pekin duck in the United States. Avian Disease Vol. 2 No : 4
- 4 — CAPORALE, V.; RAGGI, L.; SEMPRAMI, G. (1972) : Stundy of the double diffusion test and viral disease of fowls. I Infections laryngotracheitis Atti della Societa Italiana delle Scienze Veterinaria, 26, 553-555 (It en fr.) Ist. Zooprofilattica sperimontale, Teramo, Italy.
- 5 — CAPORALE, V.; SEMPRONI, G. (1972) : Stundy of the double diffusion test and viral diseases of fowlls. II. Infections bronchitis virus. Atti della societe Italiana delle scienye Veterinaria, 26, 555-557 (İst. en fr.) Ist. Zooprofilattica sperimentale, Teramo, Italy.
- 6 — CENTRAL VETERINARY LABORATORY POULTRY DEPERTEMANT (1979) : The Use of agar-gel Diffion Precipitating test for diagnosis of some viral diseases. Central Vet. Lab. Poultry Departement Surrey, Veybridge V. K.
- 7 — CULLEN, B. A.; VEYETH, P. J. T. (1975) : Quantitetion of antibodies to Infectious bursal Diseases Veterinary Record 97 (16) (En) Cent., Vet. Lab. New. Haw. Weybridge Surrey U. K.
- 8 — ERGÜN, A. (1978) : Almanya Seyahat Notları.
- 9 — FUCHS. B.; BÖBDECKER, G.; BULOW, V. V. (1985) : Comperative serologica! studies on methods for detecting antibodies against imfectious laryngotracheitis virus in chickens. Berliner und Mühener Tierarzliche Wochenschrift, 98 (8) 261-266 (De, en, 15 ref) Enst. Geflügelkrankheiten, Freie Univ., Koserstr. 21, D-1000 Berlin 33, German Federal Republic.
- 10 — FUHR, F.; SİPAHİOĞLU, A.; ERGÜN, A.; YALÇIN, S. (1976) : Öneli ve Bulaşıcı Bazı Tavuk Hastalıklarının Teşhisinde Agar-gel presipitasyon teşhisinin uygulanması.
- 11 — GAYDZINSKI, P.; McDONALD, J. W.; McMARTIN, D. A. (1977) : The agar-gel precipitin response to the H 120 and H 52 vaccines of Infections bronehitis virus. Avian pathology 6 (2) 143-148 (En, de, Fr. 8 ref) Vet; Lab. Eskgrone, lasswade, Midlothian, U. K.
- 12 — GOUGH, R. E.; ALEXANDER, D. J. (1977) : Comperison of serologica! test the meassurement of the primary immun response to avian infectious brenchitis virus vaccines. Veterinary microbiology 2 (4) 289-301 (En, 17 ref) central Vet. Lab. New. Haw Weybridge Surrey KT, 15 3NB V.K.
- 13 — GULLON, J. C.; A. Vallec, and L. RENAULT (1966) : La technique de precipitation en milieu. Ann. Inst. Past. 103. 921-924.
- 14 — GIRSHICK, T.; CRARY, C. K.; J. R. (1932) : Preparation of an agar-ge! precipitating antigen for avian encephalomyclitis and its Use in ewaluating the antibody Status of poultry. Avian Disease, 26 (4) 798-804. (En, 15 ref) Spafas, Inc.,Storrs. Connecticut, 06, 268 U.S.A.

- 15 — HIROSA, M.; HIRAI, Y.O. (1976) : Precipitating antibody against I.B.D.V. in yolk and serum of chickens. Research Bulletin of The Faculty Agriculture, Gifu University. No. 39, 165-170 (En, za. 11 ref) Rep. Vet. Microbiol., Fac Agric. Gifu. Univ., Japan.
- 16 — IDE, P.R.; SCHULTLE-NERDHOIT, J.A.; DEVIT, W.F.; SMITH, J.D. (1978) : Broiler Breeder vaccination against infectious bursal disease and persistence of maternal antibody in progeny. Canadian Veterinary Journal 19 (5) 123-127 (En, Fr, 14 ref) Anim. Path., Div., Hth. Anim. PO. BOX 1410, Sackville New Brunswick, EOA 300 (1 de) Canada.
- 17 — IKEDA, S. (1977) : Immunodiffusion test in avian encephalomyelitis. I. Standardization of procedure and detection of antigen in infected chickens and embryos. II Detection of precipitating antibody in infected chickens in comparison with neutralizing antibody. National Institute of Animal Health Quarterly, Japan 17 (3) 81-94 (En, 26, ref) Tohoku Branch Lab. Nat. Inst. Anim. Eth. Shickinoko-machi, Kamikitogun, Aomori-ken, 0, 39-25, Japan.
- 18 — LEY, D.U.; STORM, N.; BICKFORD, A.A.; YAMAMOTO, R. (1979) : An infectious bursal disease virus outbreak in 14 and 15 week old chickens. Avian Disease, 23 (1) 235-240 (En, 7 ref) Dep. Epidemiol. Prev., Med. Univ., Davis, California 9, 5, 616, U.S.A.
- 19 — LISOWKA, K.; LISOWKI, K. (1978) : Gel precipitating test in the diagnosis of avian infectious bursitis. Medycyna Weterynaryjna, 34 (12) 727-728. (Pl, en, ru. 8 ref) ul. E. Raczyńskiego, 72, 60-465, Poznań, Poland.
- 20 — LUKERT, P.D.; DAVIS, R.B. (1971) : An antigen used in the agar-gel precipitin reaction to detect avian encephalomyelitis virus antibodies. College of Veterinary Medicine, University of Georgia. Athens, Georgia 30601.
- 21 — Lohr, J.R. (1976) : Infectious Bronchitis Agar-gel precipitin test Research NOTE.
- 22 — MACDONALD, J.W.; RANDALL, C.J.; McMARTIN, D.A.; DAGLESS, M.D. (1981) : Immunity following vaccination with the H 120 strain of infectious bronchitis virus via the drinking water. Avian pathology 10 (3) 295-301. (En, de, Fr, 16 ref) Maff Vet. Lab. Eskgrove, Lasswade, Midlothian, U.K.
- 23 — MACDONALD, J.W.; DAGLESS, M.D.; McMARTIN, L.A.; RANDALL, C.J.; PATTISON, M.; EARLY, J.L.; AUBREY, S. (1982) : Field observations on serological responses to vaccine strains of infectious bronchitis virus administered by coarse spray and via the drinking water. 11 (4) 537-546. (En, de, fr. 10 ref) Maff, Vet. Lab. Eskgrove, Lasswade, Midlothian Scotland, U.K.
- 24 — MACDONALD, J.W.; RANDALL, C.J.; McMARTIN, D.A.; DAGLESS, M.D. (1983) : Immunity following inoculation of the H 120 and H 52 vaccine strains of I. Bronchitis virus into the crop of the domestic fowl. Avian Pathology 12 (3) 379-388 (En, de, fr. 25 ref) Maff Vet. Lab.; Eskgrove Lasswade, Midlothian, U.K.

- 25 — MATSUMOTO, M.; MURPHY, M. (1977): Use of polyethylene glycol and fluocarbon for The Purification of Avian-encephalomyelitis Virus. Avian Disease, 21 (2) 300-309 (En. 18 ref) Sch. Vet., Med., State Univ., Corvallis, Oregon, 97331, U.S.A.
- 26 — McFERRAN, J. B.; CLARKE, J. P.; CONNOR, T. J. (1972): Serological Classification of Avian Adenoviruses. Archiv für die Gesamte Virusforschung, 39 No. 1/3. 132-139 (En) Vet. Res. Lab. Stormont Belfast. N. Ireland.
- 27 — McFERRAN, J. B.; HELEN, M. Ronley; Mc NULDY, M. S. and LINDA J. Montgomery (1977): Serological Studies on flocks showing depressed egg production. Avian pathology, 6: 405-413.
- 28 — MONTREAL, G.; BAUER, H. J.; WIEGMAN, J. (1985): Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), H.I. test and agar-gel precipitation test for the detection of avian infectious bronchitis virus. Avian Pathology 14 (3) 421-434.
- 29 — NICHOLAS, R. A. J.; WOOD, G. W.; DENISE, H. Thornton (1983): Comparison of Techniques for the detection of avian infectious bronchitis virus as a contaminant of vaccines. Journal of biological standardization.
- 30 — NICHOLAS, R. A. J.; WOOD, G. W.; HOPKINS, G. L.; THORNTON, D. H. (1986): Detection of avian encephalomyelitis virus. Research Veterinary Sciences, 40, 119-122.
- 31 — ONUNKWO, O. (1975): An outbreak of infectious bursal disease (IBD) of chickens in Nigeria. Vet. Recad. 97 (22) 433 (En) Fed. Vet. Res. Lab. Vom. Vifos. Nigeria.
- 32 — SCHMIDT, U. (1967): Erfahrungen mit der Präzipitationsreaktion im Hinblick auf ihre Verwendung für die praktische Diagnose bei der Infektion des Huhnes mit dem Virus der infektiösen Laryngotracheitis und der infektiösen Bronchitis sowie mit Celo-Virus, Aus dem Friedrich-Loeffler-Institut Insel Riems der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin.
- 33 — SCHMIDT, V. (1969) Die Herstellung von Präzipitieren den Seren zum Nachweis des Virus der I.B. der I.L.T. und der Hühnerpocken sowie von aviären Adenoviren (CELO). Eingegangen am 6. Januar.
- 34 — BOZKURT, Seher (1983): Infiltrere seyahat notları (The gel diffusion precipitation test for I.B.V. and A.G.P. test on SPF flock sera).
- 35 — SİPAHİOĞLU, A.; GİRGİN, H.; ERGÜN, A.; YALÇIN, S. (1976): Tavukların Marek ve lencosis hastalıklarının araştırılması ve Marek hastalığına karşı etkin bir aşı hazırlama. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Enstitüsü, Cilt 4, Sayı 11-12.
- 36 — SHARMA, K.; SHARMA, S. N.; SAMBYAL, D. S.; BAX, K. K. (1983): Precipitating antibodies against avian adeno and infectious bronchitis viruses in poultry Indian Journal of Animal Sciences, 53 (12) 1357-1358 (En. 6 ref) Coll. Vet. Sci.; Punjab. Agric. Univ.; Ludhiana, Punjab 1411004, India.

- 37 — SRINIVASON, V. A.; MALLICK, B. B. (1977): A note on the growth characteristics, cytopathogenicity and pathogenicity of Infections laryngotracheitis (ILT) virus in developing chick embryos, cell cultures and chickens. *India Journal of Animal Sciences*, 47 (2) 106-109 (En. 11. ref) *Vet. Res. Inst. Izatnagar*, 243-122 India.
- 38 — ULBRICH, F.; ZURECH, I. (1977): Agar-gel precipitin test for diagnosis of infections bursitis in fowl (Gumboro Disease) *Monatshette für Veterinärmedizin*, 32 (15) 558-593 (De. en. ru. 10 ref) *Bezirksinst Veterinärwesen Jägerstr. 10-X 806 Dresden-German Democratic Republic.*
- 39 — Van ECK, J. H. H.; DAVELDAR, F. G.; Van den HEUVEL, PLESMAN, A. M. THEA.; NELVANKOL, KOUWENHOVEN, B.; and GULDIE, F. H. M. (1976): Dropped egg production soft shelled and shell-less eggs associated with appearance of precipitins to adenovirus in flocks of laying fowls. *Avian Pathology*, 5: 261-272.
- 40 — WINDEVOGEL, H.; MEULMANS, G.; HALEN, P. (1975): Gumboro disease Kinetics of precipitating and neutralizing antibodies. *Annales de Medicene Veterinarie* 119 (4) 221-225 (Fr. eu) *Inst. Nat. Recherches Vet.*, 99 Groeselenberg 1180 Bruxelles, Belgium.
- 41 — WOERNLE, H.; Von Brunner, A. (1952): Über das Vorkommen von celo-virus-Infektionen des Huhnes und ihre Diagnose mit Hilfe des Agar-gel Präzipitationstestes. *Aus dem Staatl. Tierärztlichen Untersuchungsamt Stuttgart.*
- 42 — WOOD, G. W.; MUSKETT, J. C.; HEBERT, C. N.; THORRTON, D. H. (1979): Standardization of the quantitative agar-gel precipitin test for antibodies to Infectious bursal disease *Journal of Biological Standardization*, 7 (2) 89-95 (En. ref) *Central Vet. Lab. Weybridge Surrey V. K.*
- 43 — WOERNLE, H. (1966): The use of the Agar-gel Diffusion Technique in the Identification of certain avian virus diseases. *The Veterian Ver.* 4. pp. 17-28, Pergamon Press. Printed in Great Britain.
- 44 — WOERNLE, H. (1972): Agar-gel Diffusion Technique *Staatl. Tierärztliches Untersuchungsamt Stuttgart. Stuttgart-1, Azenbergstrasse 16.*
- 45 — WEISMAN, J.; HITCHNER, S. B. (1978): Virus Neutralization versus agar-gel precipitin test for detecting serological response to Infectious bursal disease virus. *Avian Diseases* 22 (4) 598-603 (en 9 ref) *State Coll. Vet. Med. Cornell Univ. Ithaca Newyork 14853 U.S.A.*
- 46 — WYETH, P. J.; CULLEN, G. A. (1978): Susceptibility of chicks to infectious bursal disease (IBD) following vaccination of their parents with live I.B.D. vaccine, *Veterinary Record*. 103 (13) 281-282 (En 3 ref) *Central Vet. Lab. Weybridge, Surrey, U. K.*
- 47 — YATES, V. J.; PRONOVOST, A. D.; RHEE, Y. O.; FRD. D. S. (1979): Adenovirus-Associated virus precipitating antibody as an early indicator of an adenovirus infection. *American Journal of Veterinary Research*, 40 (2)

277-279 (En 8 ref) Dep. Anim. Path. Agricul. Exp. Sta.; Univ. Kingston, Rhode Island. 02881 U.S.A.

48 — YADAV, M. P.; BHAMBANI, B. D.; KUMAR, S. (1977): Virus isolation from respiratory and intestinal tracts of poultry in India. Indian Journal of Animal Sciences 45 (11) 899-902 (En. 17 ref) Vet. Res. Inst. Izatmagar 243 122, India.

49 — YACHIDA, S.; IRITAMI, Y. (1978): Plague reduction neutralization for the serodiagnosis of the infectious bursal diseases. Japanese Journal of Veterinary Science 39 (1) 1-5 (En, 16 ref) Abdurahilab., Shionogi and Co Ltd., Koka Cho, Shiga 520-34 Japan.