

KANATLILARIN IBV-ENFEKSİYÖZ BRONŞİTİS HASTALIĞINA KARŞI H-120 ve H-52 SUŞLARI İLE CANLI, LİYOFİLİZE, PİLOT AŞI HAZIRLANMASI

Preparation of live Lyophilized, pilot vaccine with H-52 strain against IBV-
Infections Bronchitis Disease of poultry

Ragıp BAYRAKTAR* CananTAYHANI**
M.Zafer ZOĞ**** Salih Çiçek***

ÖZET

Bu araştırmada embriyolu SPF yumurtada liyofilize Mass. tipi H-120 ve H-52 Enfeksiyöz Bronşitis virüs suşları ile aşı üretilip, kanatlıların bu hastalığa karşı kullanılması amaçlanmıştır.

Canlı, liyofilize, Mass. tipi H-120 ve H-52 IBV suşları 9-11 günlük embriyolu SPF yumurtaya corio-allantoik yolla inkule edilmiş, 36-48 saatler arası amnio-allantoik sıvı toplanmış, sterilite ve titre kontrolleri yapıldıktan sonra %2-3 oranında tinalize edilmiş süt tozu ilave edilmiş ve 1000 doz olacak şekilde ampullere taksim edilerek liyofilize edilen ve -20 °C'lik deep-freeze odalarda saklanmaktadır. (20,23)

Aşılar şu anda istekler doğrultusunda +4 °C'de özel ambalajlarında tüm yurda sevk edilmekte olup üretimimiz tüm ülkenin ihtiyacına cevap verecek durumdadır.

SUMMARY

The Study on live, Lyophilized IBV vaccines production by using IBV H-120 and H-52 strains.

* Etlik Vet. Kont. Araşt. Enst. ANKARA

** Tavuk Hast. Araşt. ve Aşı Üretim Enst. MANİSA

*** İl Kont. Lâb. BURSA

**** Koruma Kontrol Gn. Md. ANKARA.

In this research; Vaccine production against to Infections Bronchitis disease had been aimed by the live, freeze-dried, Mass. type H-120 and H-52 IBV strains had been inoculated to 9-11 days old embryoted SPF eggs by the corio-allontoic route. After 36-48 hours, the virus content. 2-3 % tyndalized skimmed milk powder is added to vaccine harvest and lyophilized. Lyophilized vaccines are stored in the -20 °C deep-freeze room. (20,23)

According to demands, the vaccines have been dispatching to all over the country, in the special boxes at +4°C.

GİRİŞ

Enstitümüz Türkiye'nin tüm tavuk aşılarının ihtiyacına cevap vermek üzere kurulmuş ve bu konuda FAO ile ortak proje yürütmektedir. Ülkemizde son yıllarda sıkça görülen kanatlıların Enfeksiyöz Bronşitis-IB hastalığına karşı aşı üretmek gereği hasıl olmuştur.

Enfeksiyöz Bronşitis-IB hastalığı civciv, piliç ve tavukların bulaşıcı, hırıltı, solunum artması, öksürük, burun akıntısı, yumurta tavuklarında verimin azalması ile karakterize, hayvanların solunum ve yumurta kanallarında lokalize olan enfeksiyöz viral hastalıktır. Hayvanlarda görülen semptomlar hemen her yaşta aynı olup, solunum sayısının artması, tracheal hırıltı, öksürük, burun akıntısı, gözlerin sulanması bazen sinusların şişmesi, yem tüketiminin azalması, tavuklarda yumurta veriminde azalma, yumuşak kabuklu ve anormal şekilli yumurtaların görülmesi, yumurta kabuğu renginde değişiklikler başlıca beldeklendir. Hastalık sürü içinde çok çabuk yayılır. Enfekte bir tavukla aynı yerde bırakılan bu hastalığa karşı duyarlı hayvanlar 48 saat içinde bu hastalığın semptomlarını göstermeye başlarlar. Hasta olanlar enfeksiyon kaynağı olup burun akıntısı, ağız akıntısı ve dışkılarıyla etrafa bulaştırırlar. Mortalite oranı özellikle civcivlerde % 30'a kadar çıkabilir. (6,8)

IB virüsü dayanıksız ve ısıya karşı çok duyarlı bir virüstür. İyileşen hayvanlardan virüs izole edilememiştir. (12,13,19)

IB hastalığı dünyada olduğu gibi son senelerde yurdumuzda da tavukçuluk sektörünün yoğun olduğu bölgelerimizde insidensi çok yüksek olduğundan sıkça görülmeğe ve problem teşkil etmeğe başlamıştır. Dolayısıyla yaptığımız bu araştırmada İngiltere'nin Houghton ve Weybridge Enstitüleri ile Macaristan'ın

Phylaxia Enstitüleri Aşı üretim bölümleri ve literatürlerinden faydalanarak yaptığımız pilot aşı üretimi sonunda bu hastalığa karşı canlı, liyofilize Mass. tipi H-120 ve H-52 suşları ile ENFEKSİYÖZ BRONŞİTİS aşısının aşı üretim protokol ve prospektüsleri hazırlanmış ve daha sonra Bakanlığımız Yetkili Danışma Kuruluna sunulmuş, ilgili kurul tarafından kesinleştirilip tastik edilmiş ve enstitümüzde seri şekilde aşı üretimine geçilmiştir. Aşılarımız şu anda istekler doğrultusunda tüm yurda sevk edilmekte olup üretimimiz tüm ülkenin ihtiyacına cevap verecek durumdadır. (2,3)

MATERYAL VE METOD

A. ARAÇ-GEREÇ: Embriyolu SPF yumurta (Enstitü üretimi), laboratuvar cam malzemeleri, (Flasklar, Steril bujiler, erlenmayer ve balonlar, petriler, pipetler, pisetler, nötr camdan mamul aşı ambalaj şişeleri, non-toksik aşı şişe mantarı- alimünyum kapaklar, v.s.), H-120 ve H-52 Mass. tipi aşı tohum virüsü (USA-SPAFAS ve UK-WEYBRIDGE laboratuvarlarından temin edilmiş), vakum pompası, manyetik karıştırıcı, pH metre, mekanik yumurta açıcı, yumurta delici, kuluçka makinesi, otoklav, kuru sterilizatör, kurutma dolabı, deep-freeze, santrüfuj, mikroskop, pens, makas, bistüri, forceps, otomatik ve normal enjektörler, otomatik pipet ve uçları, Takachy micro titrasyon seti.

B. KİMYASAL MALZEMELER: Sodyum klorür, Potosayum klorür, Di sodyum hidrojen fosfat, Potasyum di hidrojen fosfat, Triptoz fosfat medyum, Penisilin, Streptomisin, Kanamisin, Gentamisin, Fungizone, Etil alkol, İyod, Potasyum iyodür, Deionize su, Yağsız süt tozu, Kanlı agar, Thyogluccolate agar ve buyyonu, Mertiyolat, Nötr deterjan.

Bu araştırmada USA-SPAFAS ve UK-WEYBRIDGE Referans araştırma Enstitülerinden temin edilen canlı, liyofilize Mass. tip H-120 ve H-52 IBV virüsü üretilip, kanatlıların bu hastalığa karşı kullanılmıştır. Adı geçen virüslerin 9-11 günlük embriyolu yumurtalarda ortalama öldürme zamanı 2-6 gün, allantoik sıvıda maximum virüs titresinin görüldüğü zaman 36-48 saat olup, intracerebral patojenite indexide orjinal karakterlerine uygun olarak günlük civcivlerde sıfır olarak bulunmuştur. H-120 ve H-52 aşı suşları civciv embriyolarına karşı patojen

olduğu halde kümes hayvanlarında çok hafif bir enfeksiyon oluşturmaktadırlar. Mortalite %1'den azdır. Aşılamalardan sonra 4-7 gün içinde bazen hafif solunum bozuklukları görülebilmekte fakat bu durum bir kaç gün içinde kaybolmaktadır. Aşı üretiminde kullanılacak virüsün $EID_{50}=10^{-6}$ 'dan aşağı olmaması gerekmektedir. (10,20,23)

Araştırmada Enstitü SPF ünitesinden temin edilen beyaz kabuklu, 50-55 gr. ağırlıkta, normal şekilli ve temiz, SPF yumurtalar kullanılmıştır. Kuluçka makineleri yumurtalar konmadan ve konduktan sonra olmak üzere iki defa formalin gazı ile dezenfekte edilmişlerdir. Yumurtalar kuluçka makinalarında 37 °C'de %70 relatif nemde 10 gün inkube edilmişler, bu sürenin sonunda embriyolardan steril, ölü ve bozuk olanlar ile az gelişmiş zayıf embriyolar atılmışlar, kalan embriyolar inokulasyonda kullanılmışlardır. Muayene sırasında hava boşluğu sınırı ve inokulasyon noktasında kurşun kalemle tespit edilmiştir. İnokulasyondan önce yumurtaların hava boşluğu etrafı %70'lik alkol ile 1/3 oranında sulandırılmış tentirdüyt ile iyice dezenfekte edilerek yumurta deliciler ile delinmiş ve bu 10 günlük SPF Embriyolu yumurtalara ucu küt ve sınırlı hipodermik iğneler kullanılarak daha önce 10^{-2} dilusyonu yapılmış IBV H-120 ve H-52suşları ile ayrı şekilde virüs inokulasyonları yapılmıştır. Delikler inokulasyonu takiben eritilmiş boyalı parafinle kapatılmış ve enfekte edilen bu yumurtalar tekrar kuluçka makinalarına konularak inkubasyona devam edilmiştir. Yumurtalar her gün kontrol edilmiş, ilk 24 saatte ölenler atılmıştır. İnokulasyondan 48 sonra yumurtalar +4 °C'deki soğuk odaya konularak 3-4 saat bekletilmiştir.

Daha sonra soğutulmuş bu yumurtalar, ultraviyole lambaları ve absolut filtreli aircondition'lar ile steril edilmiş özel odalarda, laminar flow kabinlerde mekanik yumurta açıcılar ile açılmış, steril pensler ile zarlarda açılarak amnio-allantoik sıvılar elektirikli vakum cihazları ile steril bir şekilde erlenmayerlere itina ile toplanmışlardır. Gözle yumurta sarısı, albumin ve bulanıklılık kontrolleri yapılmış uygun olmayanlar atılmıştır. 500-1000 cc.'lik erlenmayerlere ayrı ayrı toplanan bu sıvılara tyndalize edilerek sterilize edilmiş %3 oranında süt tozu katılarak liyofilize edilmiş ve -20 °C'deki deep-freeze'de aşı üretiminde kullanılmak üzere saklanmıştır.

AŞI SUŞUNUN KONTROLLERİ

Sterilite Kontrolleri, Diğer etkenlerin kontrolü, Titre tayini, Zararsızlık kontrolü, Bağışıklık kontrolü ve aşının saflık kontrolü olmak üzere 6 safhada yapılmıştır.

1) Sterilite Kontrolü:

Uluslararası biyolojik maddeler standardizasyon enstitüsünün sterilite kontrolü standart metodlarına göre aerobik ve anaerobik bakteri, Salmonella, PPLO, Mantar kontrolü olarak yapıldı ve steril bulundu. (10,20,23)

2) Diğer Etkenlerin Kontrolü:

4 grup SPF yumurtaya aşağıdaki şekillerde inokulasyon yapıldı:

a. 10 adet 9-11 günlük embriyolu SPF yumurtanın corio-allantoik boşluğuna aşı dozunun 10 katı konsantre edilmiş virüsten 0.2 ml. inokule edildi.

b. 10 adet 9-11 günlük embriyolu SPF yumurtanın corio-allantoik membranına, aşı dozunun 10 katı konsantre edilmiş virüsten 0.2 ml. inokule edildi.

c. 10 adet 5-6 günlük embriyolu SPF yumurtanın sarı kesesine, aşı dozunun 10 katı konsantre edilmiş virüsten 0.2 ml. inokule edildi..

d. 10 adet 9-11 günlük embriyolu SPF yumurtanın corio-allantoik boşluğuna virüs+antiserum karışımı inokule edildi.

İnokulasyonları takiben ilk 24 saatte ölen yumurtalar atıldı. İnokulasyondan 24 saatten sonra her grupta en az 6 adetten fazla canlı embriyo kaldığından teste devam edildi. 1. ve 2. grup embriyolar 7 ve 12 gün sırası ile tekrar kontrol edildi. Testte herhangi bir ölüm veya anormallik olmadığından (ILT, AE, vs. gibi) virüs aşı tohum virüsü olarak kullanıldı. (10, 23)

3) Titre Tayini:

Gerekli malzeme: En az 50 adet 9-11 günlük embriyolu SPF yumurta, steril tüpler, 1,2,5 ve 10 ml.'lik pipet, 200 ul. ve 5 ml.'lik otomatik pipet ile bu pipetlerin steril uçları, %5 sığır serumu ihtiva eden FTS veya PBS (pH=7.2)" TPB kullanılırsa sığır serumuna gerek duyulmamaktadır.", buz banyosu.

10^{-2} , 10^{-3} , olmak üzere 8 dilüsyon tüpü hazırlandı, bütün tüplere 1.8 ml. dilüent kondu. 1. tüpe 200ul. (0.2 ml.) virüs konup iyice karıştırıldı ve başka

bir pipet veya pipet ucu değiştirilerek 200 ul. diğer tüpe aktarıldı ve işlem 8. tüpe kadar sürdürülüp son tüpten 200 ul. dışarı atıldı.

Bu hazırlanan dilüsyondan 5 adet yumurtaya 0.1 ml. (100 ul) intra-allantoik inokulasyon yapıldı, en az 10 yumurtada kontrol olarak bırakıldı. İnokule edilen yumurtalar inkubasyonun 19. gününe kadar her gün en az bir defa kontrol edildi, ölenler kayda alındı ve embriyolar toplu halde otopsi muayenesi için +4 °C'deki soğuk odada bekletildi. İlk 24 saatte ölenler atıldıktan sonra embriyoların yaklaşık % 50'sinin inokulasyonundan 2-7 gün sonra ölmesi, kontrollerin ise hayatta kalması gerekiyordu. 19. günde ölmeyenlerde soğuk odaya konarak öldürüldü ve tüm embriyolar otopsi tepsisinde numaralanarak muayene edilip, Enfeksiyöz Bronşitis bulguları görülmeye çalışıldı. Ölenlerin allantoik sıvılarından hemaglütinasyon yapıldı, hamaglütinasyon görülmeydi. (Newcastle, Influenza virus kontaminasyonları için.)

Daha sonra virüs titresi Sperman-Karber metoduna göre hesaplandı ve $EID_{50} = 10^{-6}$ olarak bulundu. Aşı sıvısı olarak toplanan virüs sıvısının titresi uluslararası standartlara göre $EID_{50} = 10^{-5}$ 'den aşağı olmamalıdır. Kontrol olarak bırakılan inokulasyon yapılmamış embriyolarında mutlaka açılıp otopsi muayenesi yapıldı ve enfekte edilenler ile mukayesesi yapıldı ve negatif olarak değerlendirildiler. (10,19,20,23)

4. Zararsızlık Kontrolü:

Bu kontrollerde 2-3 haftalık piliçler kullanıldı. 10 adet piliç normal aşı dozunun 10 misli doz ile Burun-Göz damla metodu ile aşılandı. 10 adet piliçte kontrol olarak bırakıldı. Bu piliçler 15 gün müddetle izolatörlerde müşahade altında bulunduruldu. Deneyin sonunda hayvanlarda herhangi bir Enfeksiyöz Bronşitis semptomu göstermediler. Sebebi saptanamayan ölümlerde görülmeydi. (10)

5. Bağışıklık Kontrolü:

Normal aşı dozu ile aşılanmış 20 adet 2-3 haftalık civciv (Minimum aşı dozu civciv başına $EID_{50} = 10^3$ olarak kabul edilmektedir.) ve aşısız kontroller aşılamaı takip eden 21. günde intratracheal yolla $10^3 EID_{50}$ olarak IBV M-41 suşu ile eprüve edilirler.

Aşılanmış civcivlerin eprüvasyondan önce kanları alınıp muayene edildiler

ve antikor seviyeleri HI testi ile tespit edilerek 1/64 bulundu. Epruvasyondan sonra ölen yada hastalık semptomu gösteren aşı ve aşısız piliçlerin trachealarının üst 1/3 ünden tracheal swap alınıp 3ml. TPB içinde 30 dk. bırakıldı ve virüs izolasyonu için 5 adet 9-11 günlük SPF embriyolu yumurtaya buradan inokulasyon yapıldı. Bu embriyolu yumurtalardan izole edilen allantoik sıvıya virüs serum nötralizasyon-VN testi uygulanarak kontrol edildi. Deney sonunda aşıllılar hayatta kaldı, kontroller öldü. Aşının gerekli bağıışıklığı verdiği kanaatine varıldı. (10,20,23)

6. Aşının Safılık Kontrolü:

Aşı içinde başka kanatlı patojen viruslar, bakteriler (Salmonella, Mycoplasma ve Mantar), lymphoid leucosis ve en önemlisi yumurta ile taşınan kanatlı patojenleri bulunup bulunmadığının tespiti için bir izolatörün içine 4-6 haftalık SPF 10 adet piliç alındı, bunlara trachea içi, BGD ve içme suyu ile 10 misli dozda aşı verildi, ayrıca çiçek hastalığı için ibikleri kanatılmadan çizilip ibiklere bir miktar aşı sürüldü. Bu piliçler 21 gün müşahade altında tutuldular. Bu süre zarfında acut seyirli hastalıklardan hiçbirinin semptom ve lezyonlarını göstermediler. Aşılanan civcivlerden serum alınarak ILT yönünden spesifik reaksiyon veren bir avian suşla AGP, Marek hastalığı yönünden AGP, Newcastle yönünden HI testi, Çiçek hastalığı yönünden klinik muayene, M. gallinarum yönünden S6 antijeni ile aglütinasyon, S.pullorum yönünden polivalan bir antijenle aglütinasyon, diğer salmonella enfeksiyonları yönünden fekal izolasyon ve buna benzer diğer hastalıklar yönünden elde mevcut antijenler ve spesifik reaksiyonlar veren suşlar ile usulüne uygun olarak oglütinasyon veya AGP yada HI testi uygulandı ve testler sonunda bu belirtilen hastalıklardan hiçbirine karşı sonuçta pozitif reaksiyon görülmedi. (10,19,20,23)

AŞI ÜRETİMİ

Yukarıda anlatılan üretim ve kontrol prosedürüne uygun olarak hazırlanan ve Bakanlığımız Yetkili Danışma Kurulunca da kabul edilip tastiklenen aşı üretim protokolüne uygun olarak yapıldı. Virüs içeren amnio-allantoik sıvı, sterilite testlerinden sonra %3 oranında tyndalize edilerek steril edilmiş yağsız süt tozu katılarak nötr camdan mamül 10 ml.'lik şişelere 5 ml. dağıtılıp tekniğe

uygun olarak liyofilize edildi, 5 ml. dağıtılan aşılarda 1000 doz olup $EID_{50} = 10^{-5}$ ve yukarıdır (20,23). Hazırladığımız aşılarda prospektüslerine uygun olarak içme suyu, püskürtme ve BGD yoluyla uygulanabilir. (3,4,19,20,21,22,23)

HEMAGLUTİNİN ANTİJEN ÜRETİMİ

Bu araştırmaya ilave olarak yürütülen Corona virüs grubundan Enfeksiyöz Bronşitis virüsünün-IBV, hemagglütinasyon ve hemagglütinasyon inhibisyon testinde kullanılması için gerekli hemagglütinasyon özelliği kazandırılmış hemagglutinini antijeni üretimi ve testin prosedürü laboratuvarımızda gerçekleştirilerek, laboratuvarımıza göre antijen üretimi ve testin prosedürü standardize edilmiştir. (1,5,9)

Antijen üretimi: Antijen üretimine IBV M-41 virüsü ($100 EID_{50} / 0.1 \text{ ml.}$) kullanıldı. Virüsün TPB içinde 10^{-5} dilüsyonu yapılarak, buz banyosunda 15 dak. bekletilip, dinlendirildi. Bu dilüsyondan 9-10 günlük Enstitü üretimi embriyolu SPF yumurtaya corio-allantoik yolla inkulasyon tekniğine uygun olarak yapıldı. 24 saat sonra yapılan kontrolde ölenler atıldı, 48 saatin sonunda bütün yumurtalar $+4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki soğuk odaya kaldırıldı. Ertesi gün AAF-Amnio Allantoik Sıvı toplandı, toplama kabı devamlı buz içinde tutuldu. Toplanan AAF soğutmalı santrifüjde 2000 rpm.'de 20 dak. santrifüje edilerek büyük tortular uzaklaştırıldı. Klarifiye edilen süpernatant alınıp tekrar soğutmalı santrifüjde 8000 rpm.'de 30 dak. santrifüje edilerek ikinci klarifikasyonu yapıldı, elde edilen bu temiz virüs sıvısı alınıp ultrasantrifüjde 18000 rpm.'de 60 dak. santrifüje edildi. Santrifugasyonun sonunda tüplerdeki süpernatant atılarak, her tüpteki (96 ml.) pelet için ortalama 1 ml. citrate buffer-pH:6.4 konup, peletler resuspense yapıldı ve otomatik pipetle tüplerden bir üniversal şişeye toplandı. Her ml. için 2 IU olacak şekilde Phospholypase-C type-I "Sigma" enzimi tartılıp, toplanan konsantre edilmiş virüs hacmi kadar PBS"A" ile sulandırıldı. Derhal enzim solüsyonu ve konsantre virüs solüsyonu birbirine karıştırılıp $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki Ben-Marie cihazında her 15-20 dak.'da bir karıştırılmak suretiyle 3 saat bekletildi ve bu sürenin sonunda elde edilen antijen $+4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi (9).

HA test prosedürü:

1. Mikropleyitin her gözüne PBS"Complate" den 50 ul. konur.

2. Birinci göze 50 µl. hazırlanan IBV antijeninde konup karıştırılır ve dilüsyon yapılır.

3. Her göze 50 µl. %1'lik RBC-eritrosit süspansiyonu konup, oda ısısında devamlı kontrol edilerek 20-30 dak. beklenip sonuç okunur (1).

HAI test prosedürü:

1. HA'sı tespit edilen antijen 4HA ünite olacak şekilde sulandırılır.
2. Serum numunesi PBS"Comp" ile 1:1 oranında sulandırılır.
3. Pleytin yukarıdan aşağı birinci gözlerine hiç bir şey koymadan bütün gözler 50 µl. PBS"comp" ile doldurulur. 1.nci göze 1:1 sulandırılmış serumdan konur, 2. göze de aynı serumdan 50 µl. konur ve diğer gözlerde dilüsyonu yapılır.
4. Sonra bütün gözlerle 50 µl. 4 HA ünite sulandırılmış antijen ilave edilir.
5. Bütün gözlerin üzerine tekrar 50 µl. PBS"Comp" konup 15. dak beklenir.
6. Daha sonra bütün gözlerle 50 µl. %1 RBC süspansiyonu konup 20-30 dak. beklenir ve sonuç okunur. Pleytin sonunda bir sırada negatif kontrol serum için, bir sırada da sadece PBS+RBC için aynı işlemlerin yapılması unutulmamalıdır. (5,9)

PBS"A" X10 Solüsyonu: 100 gr. NaCl, 2.5. gr. KCl, 14.375 gr. Na₂HPO₄ ve 2.5 gr. KH₂PO₄ üzerleri 1 lt.'ye deionize veya distile su ile tamamlanıp, oda derecesinde saklanır.

PBS"B" X10 Solüsyonu: 10 gr. CaCl₂, 6H₂O ve 6.5 gr. CaCl₂.2H₂O üzeri deionize veya distile su ile 1 lt.'ye tamamlanır ve +4 °C'de saklanır.

PBS"C" X10 Solüsyonu: 40 mg. MgCl₂. 6H₂O üzeri deionize veya distile su ile tamamlanır ve +4 °C'de saklanır.

PBS"Complete" Solüsyonu (1X): 80 ml. PBS"A" X10, 10 ml. PBS"B" ve 10 ml. PBS"C" X10'dan alınıp üzerine 900 ml. deinoize veya distile su ilave edilip karıştırılır.

CİTRATE BUFFER pH: 6.4 : A) 0.1 M citric asit solüsyonu

B) 0.2 M di basik sodyum fosfat solüsyonu

A solüsyonundan 15.4 ml., B solüsyonundan 34.6 ml. alınıp üzeri 100 ml.ye distile veya deionize su ile tamamlanır.

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan araştırma ve sonuçları Enstitümüz Araştırma Komisyonunca incelenerek Araştırmanın Araştırma Kesin Raporu şeklinde düzenlenip Bakanlığımız Yetkili Danışma Kuruluna arzına karar vermiştir. Yetkili Danışma Kuruluna gönderilen Aşı Üretim Protokolü ve Kullanma Prospektüsleri, A.Ü. Veteriner Fakültesi, Bakanlık ve Enstitülerin ilgili uzmanlarından teşkil edilen komisyon tarafından 29-30/03/1988 tarihinde toplanarak araştırma konusu olan aşının üretim protokolü ve kullanma propektüsleri incelemişler ve üretilecek olan **Enfeksiyöz Bronşitin** aşısının H-120 ve H-52 suşu ile iki ayrı aşı şekilde üretimine karar verilmişlerdir.

Adı geçen komisyonun yaptığı bu incelemeden sonra Aşı Üretim Protokolü ve Kullanma Prospektüsleri tastik edilmiş ve Bakanlığımız Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğüne verilmiştir. Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğümüzünde Bakanlığımızdan 05.05.1988 tarih ve KH-HSK-1254-534 sayılı olur ile de **Canlı virüs, Liyofilize Enfeksiyöz Bronşitis Aşısı'** nın kabul edilen üretim protokolü dâhilinde MANİSA-Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü Müdürlüğünde üretimi uygun görülmüştür.

LİTERATÜR

1. A.J. BROWN, C.D. BRACEWEL, 1985: Application of the haemagglutination inhibition test to typhing of infectious brochitis virus. Veterinary Record, 166: 47-48.
2. A.P.A. MOCKETT, JANE K.A. COOK and M.B. HUGGINS, 1987: Maternally-derived antibody to Infectious Bronchitis virus: It's detection in chick trachea and serum and its role in protection. Avian Pathology, 16: 407-416.
3. A..J.BROWN, C.D.BRACEWELL, 1988: Effect of repeated infections of chickens with Infectious bronchitis viruses on the specifity of their antibody responses. Veterinary record. 122: 707-708.
4. C. PEJKOVSKI, F.G.DAVELAAR and B.KOUWENHOVEN, 1979: Immunnosuppressive effect of Infectious Bursal disease virus on vaccination against Infectious Bronchtis. Avian Pathology. 8: 95-106.

5. D.J.ALEXANDER and N.J.CHETTLE, 1977: Procedures for the haemagglutination and the haemagglutination inhibition tests for avian Infectious bronchitis virus. *Avian Pathology*, 6: 9-17.
6. F.G. DAVELAAR, A.NOORDZIJ and J.A.VAN DER DONK, 1982: A study on the synthesis and secretion of immunoglobulins by the harderian gland of the fowl after drop vaccination against Infectious Bronchitis at 1 day-old. *Avian Pathology*. 11: 63,79.
7. GORDON and JORDON, 1984: Infectious Bronchitis disease. *Poultry Disease*, 2. nd. Edition, 164-172.
8. H. WILLIAMS SMITH, JANE K.A. COOK and ZÖE E.PARSELL, 1985: The experimental infection of chickens with mixtures of infectious Bronchitis virus and E.coli. *J.Gen.Virol.* 66: 777-786
9. HOUGHTON POULTRY RESEARCH STATION-HPRS, UK, 1987: Infectious Bronchitis laboratuvarı standart ve metotları.
10. International Association of Biological Standardization, 1973: Report of the Avian product standardization committee. 1:12-15.
11. JANE K.A. COOK, J.H. DARBYSHIRE and R.W. PETERS, 1976: The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of Avian Infectious Bronchitis virus. *Archives of Virology*. 50: 109-118.
12. JANE K.A. COOK, 1984: The classification of new serotypes of Infectious Bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. *Avian Pathology*, 13: 733,741.
13. JANE K.A. COOK and M.B. HUGGINS, 1986: Newly isolated serotypes of Infectious Bronchitis virus: their role in disease. *Avian Pathology*, 15: 128-138.
14. JANE K.A. COOK, 1988: IB virus serum neutralisation test in tracheal organ culture. *HPRS journal*, 1: 1-2.
15. K.OTSUKI, M.TSUBOKURA, 1981: Plaque formation by avian Infectious Bronchitis virus in primary chick embryo fibroblast cells in the presence of Trypsin. *Archives of virology*. 70: 315-320.
16. K. OTSUKI, T. NAKAMURA, Y.KAWAOKA and M.TSUBOKURA, 1987: Interferon induction by Avian infectious Bronchitis virus in chickens. *Japanese journal Veterinary science*, 44: 535-537.

17. K. OTSUKİ, Y. SAKAGAMİ, T. NAKAMURA, N. KUBUTA, Y. KAWAOKA, M. TSUBOKURA, 1987: Comparison of two strains of Avian Infectious Bronchitis virus for their interferon induction, viral growth and development of virus-neutralizing antibody in experimentally-infected chickens. *Veterinary Microbiology*, 15: 31-40.

18. K. OTSUKİ, Y. SAKAGAMİ, M. TSUBOKURA, 1987: Serological relationship among ten strains of Avian Infectious Bronchitis virus. *Acta Virology*, 31: 138,145.

19. M.S. Hofstad, 1984: Infectious Bronchitis Disease of poultry. 8. th.Edition. 429-443.

20. PHYLAXIA Veterinary Research Institute, Hungary , 1989: IB aşı üretim laboratuvarı standart ve metodları.

21. R.E.GOUGH, W.H. ALLAN and D. NEDELÇIU, 1977: Immune response to monovalent and bivalent Newcastle disease and Infectious Bronchitis inactivated vaccines. *Avian Pathology*. 6: 131-142.

22. S.G. THAYER, C.S. EIDSON and S.H. KLEVEN, 1983: Multivalent inactivated virus oil emulsion vaccines in Broiler Breeder chickens. 1. Newcastle disease virus and Infectious Bronchitis virus bivalent vaccines. *Poultry science* 62: 1978-1983.

23. WEYBRIDGE Veterinary Central Laboratory, UK, 1982: Compendium of Guidelines on the quality control of veterinary immunological products. 1:1-19.