

İNDİREKT ELISA YÖNTEMİNİN TAVUK HASTALIKLARININ TEŞHİSİNDE UYGULANMA OLANAKLARI VE DİĞER TEŞHİS YÖNTEMLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI

**Application of indirect ELISA for the diagnosis of poultry
diseases and comparison with the other test methods**

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

ÖZET

Son yıllarda soluble antijen veya antikorların enzim immunoassay ile solid faz hale getirilip teşhis edilmesinde büyük gelişmeler kaydedilmiştir. Immunoassay, diğer immunokimyasal tekniklerin en önemlilerinden biri olup aynı zamanda diğer tekniklerden daha az komplike, daha kolay ve daha çabuktur (21). Antijen ve antikor tayininde oldukça hassas olan ve ELISA olarak bilinen test 1970'lerin başında Engvall ve arkadaşları Van Weemen ile Schurs tarafından geliştirilmiştir(18).

ELISA yöntemi ile antikorların veya antijenlerin saptanmasında ortam ya antikor yada antijen ile kaplanarak duyarlaştırılır ve üzerine konan antijen veya antikor ile reaksiyona girer, üzerine ilave edilen enzim işaretli anti-immunoglobulin ve substrat ile renk değişimi şeklinde substratın parçalanma oranına göre test sonuçlanır ve mikropleytde oluşturulan bu reaksiyonda bir pleyt üzerinde çok sayıda numune işlenebilmektedir.

Bu araştırmada şu anda ülkemiz tavukculuğunun önemli hastalıklardan Newcastle, Gumboro, Epidemik tremor ve Enfeksiyöz bronşitis için antikor tayin etmekte kullanılacak olan indirekt ELISA metodu laboratuvarımızda standardize edilmiştir.

Anahtar kelimeler: İndirect ELISA, ND, IBD,IB,AE, Antikor teşhis,

SUMMARY

The ELISA assay is an antigen-antibody reaction system which applicates an antibody coupled enzyme with the substrate is directly proportional to the

* *Vet. Kont. ve Arş. Enst. - Etlik*

** *Kor ve Kont. Gn. Md.lüğü-ANKARA*

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

amount of antibody or antigen present in the sample being tested. Immunassay was the linkage of soluble antigen or antibody to an insoluble solid phase in a way in which reactivity of the immunological component was retained. This was the basis of the techniques known ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) pioneered by Engvall and colleagues Van Weemen and Schuurs (18). With the appropriate assay can be remarkably quick and easy yielding information that would be difficult to determine by the other techniques (21).

The ELISA was first introduced in the early 1970's and is a highly sensitive method for assaying either antigens or antibodies. In principle the assay is analogous to radio-immunoassay (RIA), the only major difference being to use of an enzyme other than an isotope. Heterogenous enzyme-immunoassays combine the advantages of immunofluorescence and radioimmunoassay and overcome many of the disadvantages of the other two methods. Enzyme labelled reagents are cheap, easy to prepare and are highly stable so giving a long shelf life, yet yield assays which approach the sensitivity of radioimmunoassay and which give objective result that can be determined, either visually or with rather simple equipment.

In this study, we standardized to determine the antibody with indirect ELISA technique for Gumboro, Newcastle, Avian Encephalomyelitis and Infectious Bronchitis diseases of the important poultry diseases of our country. The ELISA and research laboratory of our institute will go on to develop ELISA test methods for the other important diseases.

Key words: Indirect ELISA, ND, IBD, IB, AE, Antibody detection.

GİRİŞ

İnsan ve hayvanlarda enfeksiyöz hastalıkların tanısında uzun yıllar etkenlerin duyarlı kültür sistemlerinde izolasyonu ve identifikasyonu yolun gidilmiştir. Bu yöntemin enfeksiyöz hastalıkların hızlı teşhisi bakımından bazı dezavantajları vardır. Çünkü çoğu mikroorganizmalar özellikle viruslar ve yavaş çoğalan bakterilerin kültürlerde üretilmeleri uzun zaman almakta, kültür sonucu hekime geç ulaşacağından tedaviyi etkilemektedir. Bazı virusların identifikasyonu yapılmış olduğu halde, kültür sistemlerinde üretilmeleri mümkün olmamıştır. Örn:İnsanlarda hepatitis A ve B virusları klinik hepatitis olaylarının büyük çoğunluğundan sorumlu oldukları halde doku kültürü sistemlerinde üretilmezler.(3) Bu yüzden hastalıkların tanısında direkt etken izolasyon ve identifikasyonu yanısıra serum nötralizasyon agar-jel presipitasyon, hemaglutinasyon-inhibisyon, komplement fiksasyon gibi değişik serolojik testler ile immunokimyasal işaretleme ve test teknikleri başlıca 3 safhada incelenirler

(5). İmmunofluoresans tekniği (IFT), Radioimmunoassay (RIA) ve Enzimlerle işaretleme yöntemleri (EIA),

Son zamanlarda immunoenzimatik reaksiyonlar diğer iki testin yerini almaktadır. Bunun nedeni özellikle ELISA testinin bazı avantajlarıdır ki bunlar;

- a. Çok küçük hacimlerde çalışılması,
- b. Sonuçların kantitatif olması,
- c. Non-spesifik reaksiyonların azlığı,
- d. İşaretli ajanların stabilitesinin daha fazla olması,
- e. Enzim-substrat ilişkisinin sonuç reaksiyonu artırıp çok küçük antijenik miktarlarının picogram seviyesinde dahi tespit edilebilmesi,
- f. Sonucun gözle yada basit araçlarla okunabilmesi.

Bunun yanında her testte olduğu gibi EIA'da çözümlenmesi gereken bazı sorunlar bulunmaktadır. (20) Bunlar;

1. Solid faz immunoassay'e ilişkin olanlar;

- a. Kros reaksiyonların oluşumu,
- b. Yüksek duyarlılık,
- c. Antikor duyarlılığının sınırlılığı,
- d. Non-spesifik reaksiyonlar,
- e. Solid fazda yakalanmadaki değişiklikler,

2. Enzim immunoassay'e ilgili sorunlar;

- a. Konjugat ilavesinden sonra antikor duyarlılığının kaybı,
- b. Enzim-substrat reaksiyonu değişikliği,
- c. Enzimatik aktivitenin inhibitörlere duyarlılığı,
- d. Endojen enzim aktivitenin varlığı,
- e. Substrat belirlenmesindeki sınır.

Solid fazda enzim işaretli antikorların fiziksel bağlanması ile enzim işaretli antikorlar arasında non-spesifik reaksiyonlar oluşmaktadır. Bu fiziksel bağlanmalar buffer'da bulunan jelatin, BSA (sığır serum albumin), vb. gibi immunolojik olan nötral proteinler, yıkama sıvıları ve deterjan kullanımı ile azaltılabilmekte veya elimine edilebilmektedir (20,21).

Klinik marazi maddedeki bazı unsurlar (Şüpheli veya hasta hayvan serumundaki) solid fazla kaplamak için kullanılan immunoglobulinlerin fc kısmına bağlanabildiği durumlarda non-spesifik reaksiyonlar oluşabilir. Bu reaksiyonlar fc kısmı ile bağlanma yeteneğinde olan bakteri komponentleri yada marazi maddedeki rheumatoid faktörün varlığı nedeniyle meydana gelmektedir.

Bu reaksiyonlar non immun serum IgG veya non-spesifik reaktanları nötrilize etmek için reaksiyon karışımına fc fragmentlerinin ilavesi ile en aza indirilebilir. (4,11)

MATERYAL VE METOT

Araştırmamızda kullandığımız materyaller; Otomatik micropleyt dispenser cihazı, Otomatik micropleyt yıkayıcısı, ELISA okuyucusu, Spektrofotometre, Refractometre, Mikropleyt çalkalayıcısı, CO₂'li etüv, Laminar flow kabin, Takaschy mikro titrasyon seti, Vortex mikser, Manyetik karıştırıcı, Soğutmalı santrifüj, Embriyolu SPF yumurta, Cıvciv embriyo fibroblast-CEF ve Cıvciv embryo trachea ring culture-CETRC, ELISA ve Doku kültürü disposable malzemeleri ile Ortophenylen diamine, Lysin monohydrate, Agar Noble, MEM medium, TC vitamins, Newborn ve fetal calf sera, Tween-20, Tris, Poly ethylen glycool-6000, Diethanolamin, 1,1,2, Trichorfluoroethan, 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol, 4-Nitrofenil-fosfat, BSA, Jelatin, Negatif ve pozitif antiserumlar, ND,AE,IBD ve IB ELISA antijenleri, %1 eritrosit süspansiyonu ve diğer kimyasal malzemelerdir.

Bu çalışmamızda indirekt ELISA yönteminin viral tavuk hastalıklarından ND, AE, IB, ve IBD için antikor teşhis metodu geliştirilerek laboratuvarımıza göre standardize edilmiş, immunodiffüzyon test, HI test,embriyolu SPF yumurtada ve doku kültüründe nötralizasyon testi ile karşılaştırılması yapılmıştır.

Immunodiffüzyon testi, Gumboro, ND ve AE için antikorların varlığını tespit etmek için kullanıldı. Bu testte kullanılan agar aşağıdaki gibi hazırlandı.

NaCL	8 gr
Noble Agar	0,7 gr.
0,1 M PBS, pH: 7,2	10 ml.
%1 Thiomersal	1 ml.
Polyethylen giycool-6000MW	2 gr.
Distile su	89 ml.

Karışım iyice eritilip, 10 dk. otoklav edildi, 35 mm.'lik petrilere 2ml. olarak döküldü, agar soğuduktan sonra tekniğine uygun olarak 3mm. çapında 2-2,5 mm. aralıklarla delikler açıldı. Antijen ortaya diğer serumlar, referans pozitif ve negatif serumlar çevre deliklere kondu. 37°C'de %70 nemli etüvde petrilere inkube edilip presipitasyon çizgisi hergün kontrol edilmek şartıyla 3 gün süreyle kontrol edildi. (17)

HI testi için, U veya V tabanlı 96 gözlü mikropleytin tüm gözlerine 50 ul.PBS kondu.1.nci göze test edilecek serumdan 50 ul. konup. 1:2 dilusyonu

yapıldı. Üzerine antijen PBS ile 4 HAU miktarda dilue edilip tüm gözlerle (12.nci gözler kontrol olarak bırakıldı.) 50 ul. miktarda kondu. Serum-antijen 4°C'de 20 dk. inkube edilip üzerine 100 ul. %1 tavuk eritosit süspansiyonu konup 4°C'de 45-60 dk. inkube edilip sonuç okundu. (17)

Nötralizasyon testi, Enfeksiyöz bronşitis için CETRC, Gumboro için CEF doku kültüründe (Beta prosedür ile); Newcastle ve AE için embriyolu SPF yumurtada (Alfa metodu ile) yapıldı (17). Doku kültüründe nötralizasyon testi için, 96 gözlü,steril, düz tabanlı doku kültürü mikropleytlernin birinci gözlerine 100 ul. ikinci gözlerden 11.nci gözlerle kadar (11 dahil) 50 ul. virus (300 ul./50 ul.) kondu. 12.nci gözler hücre kontrol olarak bırakıldı, daha sonra 1.nci gözlerle 56°C'de 30 dk. inaktive edilmiş serum numunelerinden 25 ul. kondu ve 50 ul'lik pipetle 1.nci gözden 10.ncu göze kadar dilusyon yapıldı . 10.cu gözden 50 ul. dilusyon yapıldıktan sonra atıldı. 11.nci gözler virus kontrol olarak bırakıldı. Pleyt yaklaşık 30-45 dk. 37°C'de inkube edildi, üzerine $5 \times 10^{-4}/0,2$ ml. hücre ihtiva eden taze hazırlanmış CEF hücre süspansiyonundan veya CETRC (2 halka) kondu, %5 CO₂'li etüvde 37°C'de 72 saat inkube edildi. Daha sonra %70' lik alkolle fixe edilip trypan blue ile boyandı ve dilusyonu yapılan serumla nötralize edilen virusun CPE görülmeyen son noktası hesaplandı (4,17). **Embriyolu SPF yumurtada serum nötralizasyon testinde**, serum numuneleri 56°C'de30 dk. inaktive edildi. Virus diluyonu tryptose phosphate ile 10⁻¹ den 10⁻⁶ ya kadar yapıldı. ND için NDV-Roakin, AE için AEV-Van Roekel suşu kullanıldı. Serum dilüsyonu ve virusla karışım aşağıdaki şekilde yapıldı ve oda sıcaklığında 1 saat inkube edildi.

- 1.ci tüp= 0,4 ml. serum+0,4 ml. virus10⁻⁶
- 2.ci tüp= 0,4 ml. serum+0,4 ml. virus10⁻⁵
- 3.ci tüp= 0,4 ml. serum+0,4 ml. virus10⁻⁴
- 4.ci tüp= 0,4 ml. serum+0,4 ml. virus10⁻³
- 5.ci tüp= 0,4 ml. serum+0,4 ml. virus10⁻²

Yüksek dilüsyondan başlanmak üzere her dilüsyondan 9-11 günlük 5 adet embriyolu SPF yumurtalara 0.1 ml. miktarda inokulasyon yapıldı. 5 embryo kontrol bırakıldı. 7 gün müddetle embriyolar kontrol edildi. 7.ci gün embriyolar açılıp incelendi ve ölenler kaydedildi , sonuçlara göre nötralizasyon indexi bulundu(4,17).

Newcastle hastalığı antikorlarının indirekt ELISA ile teşhis metodu:

1. NDV-Roakin suşu ile hazırlanıp konsantrasyonu ve purifikasyonu yapılmış antijen, Karbonat/Bikarbonat buffer ile (pH:9,5) 1:1200 oranında sulandırıldı.

2. Pleytler (Nunc-maxisorp, 96 gözlü, düz tabanlı ELISA pleyti cat.no:439454) sulandırılan antijenden tüm tüplere 100 ul.konarak +4°C'de 1 gece bırakılarak kaplandı.

3. Pleytler fosfat buffer salin +%0,5 Tween-20(PBST) yıkama solüsyonu ile 5 kere her yıkama arası 1 dk. beklenecek yıkandı.

4. Tüm gözlere %3 oranında BSA veya FCT ilave edilmiş PBST solüsyonundan bloking için 100 ul. kondu

5. 37°C'de 30 dk. beklendi, pleyt 3. maddede anlatıldığı üzere yıkandı.

6. 1:1000 oranında PBST ile sulandırılan serum örnekleri ile referans pozitif ve negatif serumlar 100 ul. miktarda pleytin gözlerine kondu.

7. 45-60 dk. beklendikten sonra pleyt yıkandı.

8. HRPO ile işaretlenmiş, 1:1000 oranında PBST ile sulandırılmış konjugeyitten tüm gözlere 100 ul. miktarda kondu ve 60 dk. 37°C'de beklendi.

9. Pleyt yıkandı.

10. 34 mg. OPD substrat, 100 ml. pH:5,5 sitrat buffer'da çözündürüldü, OPD ışığa hassas olduğundan koyu renkli şişeye konup dışı aliminyum folyo ile ışık almayacak şekilde kapatıldı, üzerine %37'lik H₂O₂'den 20 ul. konup 15 dk. beklenilip aktivasyonu sağladıktan sonra tüm gözlere 100 ul. olmak üzere kondu ve arasına gözlenmek suretiyle sarı renk oluşumu için 20-25 dk.37°C'de karanlıkta beklendi.

11. Renk oluşumu tamamlandıktan sonra 2,5 M. Sülfirik asit solüsyonundan tüm gözlere 50 ul. konarak reaksiyon durduruldu ve pleyt ELISA okuyucusunda 492 nm' de okundu (12,13,14,15,22).

Enfeksiyöz Bronşitis ve Gumboro hastalığı antikorlarının indirekt ELISA ile teşhis metodu:

1. Enfeksiyöz Bronşitis için IBV-M41ve Enfeksiyöz Bursal Hastalığı için IBDV-Cheville suşu ile hazırlanıp konsantrasyonu ve purifikasyonu yapılmış antijen, Carb/Bicarb, pH;9,5 ile 1:1000 oranında sulandırıldı.

2. Pleytler (Nunc-maxisorp, 96 gözlü, düz tabanlı ELISA pleyti, cat. no:439454) sulandırılan antijenden tüm gözlere 100 ul.konarak +4°C'de 1 gece bırakılarak kaplandı.

3. Pleytler fosfat buffer salin+ %0,5 Tween-20 (PBST)yıkama solüsyonu ile 5 kere her yıkama arası 1 dk. beklenecek yıkandı.

4. Tüm gözlere %3 oranında BSA veya FCS ilave edilmiş PBST solüsyonundan bloking için 100 ul.kondu.

5. 37°C'de 30 dk.beklendi, pleyt 3. maddede anlatıldığı üzere yıkandı.
6. 1:1000 oranında PBST ile sulandırılan serum örnekleri ile referans pozitif ve negatif serumlar 100 ul.miktarda pleytin gözlerine kondu.
7. 45-60 dk.beklendikten sonra pleyt yıkandı.
8. HRPO ile işaretlenmiş, 1:1000 oranında PBST ile sulandırılmış konjugeyitten tüm gözlere 100 ul. miktarda kondu ve 60 dk.37°C'de beklendi.
9. Pleyt yıkandı.
10. 34 mg. OPD substrat, 100 ml. pH:5,5 sitrat buffer'da çözündürüldü,OPD ışığa hassas olduğundan koyu renkli şişeye konup dışı alüminyum folyo ile ışık almayacak şekilde kapatıldı, üzerine 37'lik H₂O₂'den 20 ul.konup 15dk. beklenip aktivasyonu sağladıktan sonra tüm gözlere 100ul.olmak üzere kondu ve arasıra gözlenmek suretiyle sarı renk oluşumu için 20-25dk.37°C'de karanlıkta beklendi.
11. Renk oluşumu tamamlandıktan sonra 2.5 M.sülfirik asit solüsyonunundan tüm gözlere 50 ul.konarak reaksiyon durduruldu ve pleyt ELISA okuyucusunda 492nm'de okundu (6,7,8,9,10,11,15,16,21,22).

Avian Ensefalomyelitis hastalığı antikorlarının indirekt ELISA ile teşhis metodu:

1. Avian Encephalomyelitis için AEV-Van Roekel suşu ile hazırlanıp konsantrasyonu ve purifikasyonu yapılmış antijen, Carb/Bicarb, pH:9,5 buffer ile 1:100 oranında sulandırıldı.
2. Pleytler (Nunc-maxisorp,96 gözlü, düz tabanlı ELISA pleyti, cat.no:439454) sulandırılan antijenden tüm gözlere 100 ul.konarak +4°C'de 1 gece bırakılarak kaplandı.
3. Pleytler fosfat buffer salin +%0,5 Tween-20 (PBST)yıkama solüsyonu ile 5 kere, her yıkama arası 1 dk.beklenerek yıkandı.
4. Tüm gözlere %3 oranında BSA veya FCS ilave edilmiş PBST solüsyonundan blocking için 100 ul.kondu.
5. 37°C'de 30 dk.beklendi, pleyt 3. maddede anlatıldığı üzere yıkandı.
6. 1:50 oranında PBST ile sulandırılan serum örnekleri ile referans pozitif ve nefatif serumlar 100 ul.miktarda pleytin gözlerine kondu.
7. 45-60 dk.beklendikten sonra pleyt yıkandı.
8. HRPO ile işaretlenmiş 1:1000 oranında PBST ile sulandırılmış konjugeyitten 100 ul.miktarda kondu ve 60 dk.37°C'de beklendi.
9. Pleyt yıkandı.
10. 34 mg. OPD substrat,100ml. pH:5,5 sitrat buffer'da çözündürüldü, OPD ışığa hassas olduğundan koyu renkli şişeye konup dışı alüminyum folyo ile ışık

almayacak şekilde kapatıldı, üzerine %37'lik H_2O_2 'den 20 ul.konup 15 dk.beklenip aktivasyonu sağlandıktan sonra tüm gözlere 100 ul.olmak üzere kondu ve arasına gözlenmek suretiyle sarı renk oluşumu için 20-25dk. 37°C'de karanlıkta beklendi.

11. Renk oluşumu tamamlandıktan sonra 2,5 M sülfirik asit solüsyonundan tüm gözlere 50ul.konarak reaksiyon durdurdu ve pleyt ELİSA okuyucusunda 492 nm'de okundu (11,12,22).

BULGULAR

Bu çalışmamızda her hastalık için bulgularımız aşağıda ayrı ayrı belirtilmiştir.

ND: 7 günlük 10 adet SPF civciv izolatorde 10^{-8} EID-50/0,1 ml. dozda Newcastle HB-1 BGD aşısıyla aşılandı. Takip eden 7,14,21 ve 28nci günlerde kan alınarak HI testi, SN ve ELISA testleriyle antikor tayinine çalışıldı (4,11,17,21).

Test	Günler				Toplam civciv sayısı
	7	14	21	28	
ELISA	6	10	10	10	10
VN	-	8	10	10	10
HI	-	5	10	10	10

7.ci günde ELISA testi ile alınan 10 adet kanın 6'sında antikor saptanırken, VN ve HI testi ile antikor testbiti edilemedi. Çalışmamızda bu testler ile ancak 14.cü gün sonrasında antikor tespiti mümkün oldu. Yapılan bir diğer araştırmada (13) ELISA ile HI arasında korelasyon araştırılmış, $P < 0,01$ olarak bulunmuştur. ki bu sonuçlara göre ELISA testi HI testinden yaklaşık 160 defa daha hassastır.

IBD :3 haftalık 10 adet SPF civcive Enstitü üretimi Gumboro modifiye Lukert suşundan 1000 TCID-50/0,5ml. dozda intramuskuler olarak enjekte edildi, enjeksiyondan sonra 1 hafta aralıklarla 4 hafta süreyle kan alınıp, ELISA, VN ve AGP testleriyle antikor tayinine çalışıldı (4,5,11,22).

Test	Günler				Toplam civciv sayısı
	7	14	21	28	
ELISA	5	10	10	10	10
VN	-	8	10	10	10
AGP	-	4	9	10	10

AGP testi ve VN testi (17) ile metot bölümünde anlatıldığı üzere yapılmış, 7. ci günde ELISA indirekt metot kullanılarak 10 civcivden sadece 5'inde antikor tespit edilebilirken VN ve AGP testinde antikor tesbiti mümkün olmamıştır. 14.cü günde ise VN ile 8 adet, AGP ile ancak 4 adet kan serumlarında antikor tespit

edilebilmiştir. AGP testi ile ancak 21. ci günden itibaren antikor tespiti mümkün olmaktadır.

IB : 7 günlük 10 adet SPF civciv izolatorde $10^3EID_{50}/0,1$ ml. dozda IBV-M41 suşu ile enfekte edildi. Takip eden 7,14,21 ve 28. ci günlerde kan alınarak HI testi, VN ve ELISA testleriyle kan serumlarında antikor tayinine çalışıldı (4,11,17,21,22).

7. ci günde ELISA testi ile 7 adet, CETRC doku kültürü kullanılarak yapılan VN testinde ise 5 adet kan serumunda antikor saptanırken HI testi ile antikor saptanamadı. 14. cü günde 10 adet kan serumunun hepsinde ELISA ve VN testi ile antikor saptanırken HI testi ile ancak 5 adet kan serumunda antikor saptayabildik 21. ci gün ve sonrasında ise her üç test ile de antikor tespit etmek mümkün oldu.

Test	Günler				Kullanılan civciv sayısı
	7	14	21	28	
ELISA	7	10	10	10	10
VN	5	10	10	10	10
HI	-	3	9	10	10

AE: 8 haftalık 10 adet SPF piliç izolatorde AE-Calnek 1143 suşu ile $10^9EID_{50}/1$ ml. dozda ağızdan damlalıklı içirmek suretiyle aşılandı. Aşılamayı takip eden 7,14,21 ve 28. ci günlerde kan alınarak ELISA, AGP ve VN testleriyle antikor tayinleri yapıldı.

Test	Günler				Kullanılan piliç sayısı
	7	14	21	28	
ELISA	-	9	10	10	10
VN	-	9	10	10	10
AGP	-	-	7	9	10

Virus nöralizasyon testinde ELISA antijen üretiminde anlatıldığı üzere embriyolu yumurtaya adapte AE-Van Roekel suşu üretilerek, embriyoların beyinleri aseptik olarak çıkartılıp 1:5 oranında FTS ile sulandırılıp antibiyotik katıldı. 300 g kuvvetinde 10 dk. santrifüj edilip süpernatant antijen olarak kullanıldı. Test (12) ve metot bölümünde anlatıldığı üzere her embriyolu yumurta için $200 EID_{50}/0.1$ ml dozda virüs kullanılarak Beta nötralizasyon prosedürüne göre embriyolu SPF yumurtada yapıldı, testler sonunda aşılamayı müteakip 7. ci günde antikor test metodu ile tespit edilemedi. 14. cü günde ELISA ve VN testi ile eşit hassasiyette 9 adet kan serumunda antikor tespit edildi. AGP testi ile ise ancak 21. ci günden sonra antikor tespit etmek mümkün oldu (12,17).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu araştırmada, öncelikle ülkemiz için önemli olan hastalıklardan Newcastle, Gumboro, Enfeksiyöz Bronşitis ve Avian Encephalomyelitis hastalığına karşı antikor tespitinde kullanılan indirekt ELISA tekniği standardize edilmiştir (3,11,17,21,22). Ayrıca Hemagglütinasyon-İnhibisyon (HI), Agar jel prensipitasyon (AGP) ve Virüs Nötralizasyon gibi diğer antikor tespitinde kullanılan testlerle hassasiyet yönünden karşılaştırılmalı olarak mukayesesi yapılmıştır.

ELISA testi, AGP,VN ve HI antikor teşhis metodlarıyla kıyaslandığında (4,11,17,21,22) ELISA testi, daha hassas, çabuk, güvenilir, daha ucuz ve çok sayıdaki serum numunelerini işlemek için otomatizasyon sistem şeklinde çalışılabilirliği yönünden mükemmel bir test olarak bulundu.

MANİSA Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü Türkiye'nin tüm tavuk aşılarının, serum ve biyolojik maddelerin üretilmesi ihtiyacına cevap vermek üzere kurulmuş ve bu konuda FAO ile ortak proje yürütmektedir. Enfeksiyöz hastalıkların tanısında direkt etken izolasyon ve indentifikasyonu hızlı teşhise cevap vermektedir. Bu yüzden değişik serolojik ve immunokimyasal testler günümüzde önem kazanmıştır. Dünyada hem tıp, hemde Veteriner tebabette viral, bakteriyel ve paraziter hastalıkların perakut, akut ve kronik dönemlerinde teşhise olanak veren ve yaygın şekilde kullanılmaya başlanan immunoenzimatik reaksiyonlardan olan ve test metodlarını, kendi ürettiğimiz test için gerekli solüsyonlara ve reagentlere göre standardize etmek amacıyla yapılan bu araştırma öncelikle ülkemiz için önemli olan 4 hastalığa Newcastle, Gumboro, Enfeksiyöz Bronşitis ve Avian Encephalomyelitis'e karşı antikor tespit etmek için indirekt ELISA tekniği standardize edilmiştir (3,5,11,17,21,22).

Bitirdiğimiz diğer bir araştırma sonucuna görede bu standardize ettiğimiz indirekt ELISA testinde kullanılacak solüsyonların hazırlanması ve kullanılmalari da standart hale getirilmiştir. Bu metodlar bu testi kullanacak olan bütün laboratuvarlarada büyük kolaylık sağlayacaktır. Diğer Enstitü ve teşhis laboratuvarlarında da ELISA testinin rutin hale getirilmesi, diğer tavuk ve hayvan hastalıklarının teşhisinde kullanılmaya başlanması ile araştırmacıların başka hastalıklar içinde test metodlarını standardize etmeleri ülkemiz hayvancılığı ve veteriner teşkilatımız için çok yararlı olacağı gibi modernizasyonumuz içinde gereklidir.

TEŞEKKÜR

Araştırmacılar, yardımlarından dolayı Hannover Veteriner Fakültesi Kanatlı Hastalıkları Klinik Başkanı Prof.Dr. U.NEUMANN'a, Macar Araştırma Merkez

Enstitüsünden Dr.C.S.DREN`e, Budapeşte Phylaxia Enstitüsü Biyokimya bölümü sorumlusu Dr.G.KOCHIS`e ve İngiltere Houghton Tavukçuluk Araştırma Enstitüsünden Dr. L.PAYNE`e,Dr.J.WATSON`a ve Jane K.A.COOK`a teşekkürü bir borç bilirlir.

KAYNAKLAR

1. **ASHORA, P., KROHN, K.** 1986 : Washing of ELISA plates with running tap water. Journal of Immunological Methods, 88:141-142.
2. **ENGVALL, E.** 1980 : Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. Methods in Enzymology. 70:419-438.
3. **ENGVALL, E., CARLSSON, H : E;** 1976 : Enzyme-linked Immunosorbent Assay. ELISA. First International symposium on Immunoensymatic techniques INSERM Symposium No:2:135-182
4. **Harlow, E., LANE, D.** 1988 : Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 1:319-359., 553-592.
5. **HATFIELD POLYTECHNIC, Division of Biological and Environmental Sciences, 28-31 MARCH** 1988 : Molecular Biology update in USA. 125-142
6. **MARQUARDT, W.W., SNYDER, D.B. and SCHLOTTHOSER, B.A.** 1981 : Detection and Quantification of Antibodies to Infectious Bronchitis virus by ELISA, Avian Dis. 25:713-722.
7. **MOCKETT, A. P. A. and DARBYSHIRE, J. H.** 1981 : Comparative studies with an ELISA. for antibodies to avian Infectious Bronchitis virus. Avian Pathology, 10:1-10.
8. **MOCKETT, A. P. A. and COOK, J. K. A.** 1986 : The detection of specific IgM to Infectious Bronchitis virus in chicken serum using an ELISA, Avian Path. 15:437-446.
9. **MONREAL, G., BAJER, H. J. and WIEGMANN, J.** 1985 : Comparison of the inhibition test and Agar gel precipitation test for detection of antibodies to Avian. Pathology. 14:421-431.
10. **Nicholas, R. J. A., REED, N. E., WOOD, G. W., HEBERT, C. N., MUSKETT, J. C., THORNTON, D. H.** 1985 : Detection of antibodies against infectious bursal disease virus a comparison of three serological methods. Res. in. Vet Science. 38:189-192
11. **PHYLAXIA Veterinary Research Institute, Hungary.** 1987 : Viral products methods booklet. 30-78.

12. **SMART, I. J. and GRIX, D. C.** 1985 : Measurement of Antibodies to infectious Avian Encephalomyelitis virus by ELISA. Avian Pathology 14:341-352.

13. **SNYDER, D.B., MARQUARDT, W. W., MALLINSON, E. T. and RUSSEK, E.** 1982 : Rapid Serological Profiling by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. I. Measurement of Antibody Activity Titer Against Newcastle Disease Virus in a single serum dilution. Avian Dis 27:161-170.

14. **SNYDER, D. B., Marquaty, W. W., MALLINSON, E. T., ALLEN, D. A., SAVAGE, P. K.** 1985 : An Enzyme linked Immunosorbent assay method for the simultaneous measurement of antibody titer to antibody titer to multiple viral, bacterial or protein antigens. Veterinary Immunology and Immunopathology. 9:303-317.

15. **SNYDER, D. B., Marquarty, W. W., MALLINSON, E. T., ALLEN, D. C.,** 1985 : Rapid Serologyval profiling by Enzme-Linked Immunosorbent Assay. III. Simultaneous measurements of antibody titers to infectious Bronchitis, Infectious Bursal Disease and Newcastle Disease Viruses in a msingle serum dillution. Avian Dis. 28:12-24

16. **SNYEDER, D. B., MARQUARDT. W. W., MALLISON, E. T., and RUSSEKCOHEN - E. SAVAGE, P. K. and ALLEN, D. C.** 1985 : Rapid Serologycal Profiling by enzyme-Linked Immunosorbent Assay. IV. Association of infectious Bursal Disease Serology with Broiler Flock Performance. Avian Dis. 30:139-148.

17. **VILLEGAS, P.** 1987 : Application of ELISA. Avian virus disease, Laboratory Maunal. College of Veterinary Medicine, University of Georgia 48-51.

18. **VOLLER, A.** 1976 : The application of mi c ro-plate enzyme-linked immunosorbent assays to some infectious disease. First International Symposium on Immunoenzymatic techniques INSERM Symposium No:2 North/Holland Publishing Compeny Amsterdam. 167-173.

19. **VOLLER, A.** 1978 : Workshop report on ELISA techniques Immunofluorescence and related staining techniques. Elsevier/North Holland Biomedical Press 337-347.

20. **VOLLER, A., BIDWELL, D. E. and BARTLETT, A.** 1979 : Types of Assay and the applications ELISA. The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 1.st.Edition, The Zoological Society of London. 3-8.10-58.

21. **WEYBRIDGE Central Veterinary Laboratory, U.K.** 1988 : Diagnostic produtes control section method sheets. 3-70.