

# Agarda Lökosit Göçü Önlenim Tekniği (LMIT) Kullanılarak Newcastle Virusu İle Aşılannış Civcivlerde Hücresel ( Sellüler ) Yanıtın Değerlendirilmesi

Nejat AYDIN<sup>1</sup>

K. Semih GÜMÜŞSOY<sup>1</sup>

**ÖZET** :Deneysel olarak civcivlerde gerçekleştirilen bu çalışmada Agarda Lökosit Göçü Önlenim Tekniği kullanılarak Newcastle aşısı ile aşılanan civcivlerde karakteristik hücresel ( sellüler ) bağışıklığın saptanabileceği belirlendi. Elde edilen verilere göre Agarda Lökosit Göçü Önlenim Tekniği ( LMIT ); kullanışlı, uygulaması kolay ve pahalı aletler gerektirmeyen bir testtir. Araştırmada, Hitchner B1 ile birinci aşılama sonunda Log2 8.7 antikor titresi, LMIT'de % 25'lik bir migrasyon inhibisyon elde edilmiştir. İkinci aşılama LaSota ile yapılan hayvanlarda ise Log2 9.5 antikor titresi ve LMIT'de % 29'luk migrasyon inhibisyonu şekillenmiştir. Buna göre aşılama sonucuna ortaya çıkan antikor titrelerinin oluşturduğu humoral yanıt ile LMIT sonucu elde edilen hücresel ( sellüler ) yanıt arasında bir ilişkinin bulunduğu gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler** : LMIT, Newcastle virus, aşılama, hücresel immunité

## Evaluation Of The Cell - Mediated Immune Response Of Chicks Vaccinated With Newcastle Virus By Agarose Leukocyte Migration Inhibition Technique (LMIT)

**ABSTRACT** :The cell-mediated immune response was experimentally evaluated in chicks by agarose leukocyte migration inhibition technique. It was determined that cell-mediated immune response of chicks vaccinated with Newcastle virus be determined by this technique. According to the obtained results, agarose leukocyte migration inhibition technique ( LMIT ) is a reliable easy and cheap test. In this study, post vaccination of first Hitchner B1 antibody titres were Log2 8.7 and migration inhibition was 25 %. The antibody titres of chicks vaccinated with Lasota were Log2 9.5 and migration inhibition was 29 %. Thus, it was shown that there was a relationship between antibody titers of humoral immune response and results of LMIT due to cell - mediated immune response .

**Key words** : LMIT, Newcastle virus, vaccination, cell - mediated immunity

### GİRİŞ

Newcastle hastalığı ( Yalancı Tavuk Vebası ), kanatlı hayvan yetiştiriciliği yapılan işletmelerde büyük kayıplara yol açan viral bir enfeksiyondur (8,9). Enfeksiyon her yaştaki kanatlıların solunum, sindirim ve sinir sisteminde değişik şekillerde bozukluk meydana getirmektedir. (11).

Ülkemizde Newcastle hastalığına karşı yapılan kontrol programına karşın enfeksiyon, özellikle, başta bazı bölgelerde olmak üzere epidemik tarzda seyrederek kanatlı hayvanlar arasında yüksek mortaliteye neden olmaktadır. Newcastle hastalığının kesin teşhisi; virüs izolasyonu ve identifikasyonu ile yapılır (8). Klinik semptomların gözlenmesi ve otopsi sonuçlarının birlikte dikkatlice değerlendirilmesi, enfeksiyonun Newcastle hastalığından şüphe edilmesine ve doğruya yakın bir teşhis konulmasına yardımcı olur (11). Ancak, Newcastle hastalığında meydana gelen semptomların bazı bakteriyel ve viral hastalıklarla, zehirlenmelerde de görülmesi klinik ve otopsi muayenelerinin tek başına tanıya yetersiz olacağını göstermiştir (7). Bu bulgularla direkt ve indirekt yöntemlerden elde edilecek olan sonuçların bir arada incelenip teşhisin konulması gerekmektedir (8). Newcastle hastalığına karşı değişik aşı programları uygulanan sürülerde kazanılan bağışıklığın saptanmasının büyük önemi bulunmaktadır. Etkenin biyolojik bir karakteri olarak kabul edilen hemaglutinasyon

yeteneği ve bunun bağışık serumlardaki spesifik antikorlar tarafından önlenmesi özelliği (hemaglutinasyon inhibisyon) aşılama sonu hayvanlardaki bağışıklığı saptamada ve enfeksiyonun direkt ve indirekt teşhisinde kullanılmaktadır (5).

İnsan ve evcil hayvanların enfeksiyöz hastalıklarında, gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarında ve transplantasyonda hücresel immunitenin rolünün belirlenmesinde ve ölçümünde çeşitli testlerden yararlanılmaktadır. Hücresel yanıtta rol alan hücrelerden heterofiller bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı konakçı savunma mekanizmasında önemli rol oynamaktadır. Hücresel yanıtın saptanmasında kullanılan kan hücrelerinin sürekli değişim içerisinde bulunması, antijene duyarlı birçok hücrenin kanda yer alması ve kan serumunun bazı hücre inhibitör veya stimulator faktörlerini içermesi, hücresel ölçüm sonuçlarını stabilitesini etkilemektedir (6). Kanatlılarda hücresel yanıtın değerlendirilmesine yönelik yapılan testlerde lökositlerden yararlanılmaktadır. Lökositlerin kandaki diğer şekilli elementlerden seperasyonunda yeni metotlar geliştirilmiştir (2). Koruyucu bağışıklıkta ve otoallerjik hastalıklarda görülen doku yıkımlarında hücresel bağışıklık büyük önem taşımaktadır. Hücresel bağışıklığın in vitro ölçülmesi bu konularda önemli yararlar sağlamaktadır (1).

Bu çalışmada, Newcastle hastalığına karşı

Agarda Lökosit Göçü Önlenim Tekniği (LMIT) kullanılarak birinci aşılama Hb1 ve ikinci aşılama LaSota aşı suşu ile burun yoluyla aşılama civcivlerde hücrel (sellüler) yanıtın belirlenmesi, bu hayvanlardan alınacak olan kanların H1 testine tabi tutulması ile ortaya çıkan sıvısal (humoral) yanıtın saptanması, enfeksiyon teşhisinde kullanılan her iki yanıt arasında önemli bir fark bulunup bulunmadığı ve bu amaçla kullanılan testlerden hangisinin rutin olarak uygulamada kullanılabileceğini belirlemek amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

**Deneme Hayvanları :** Aşılamaalarda kullanılmak üzere 40 adet SPF yumurta Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma Enstitüsünden temin edildi. SPF yumurtalar civciv çıkımı için kuluçka makinasına konuldu. Kuluçkadan çıkan 30 adet civciv hijyenik koşulların yerine getirildiği uygun bir ortamda barındırıldı. Hayvanlar deneme süresince Kayseri Yem A.Ş'nin civciv yemi ile beslendiler.

**Embriyolu Yumurtalar :** Denemede suşların üretilmesi ve hemaglutinasyon inhibisyon (HI) testinde kullanılmak üzere Kayseri KÖYTÜR A.Ş'nin kuluçkahanesinden aşısız kümes orijinli 11 günlük Ross-PM3 embriyolu yumurtalar temin edildi.

**Aşılar :** Aşılamaada kullanılacak olan Newcastle burun- göz kitchner B1 (HB1) ve LaSota içme suyu aşılama Kayseri KÖYTÜR A. Ş'den temin edildi.

**Antijen :** Agarda Lökosit Göçünün Önlenim Tekniği (LMIT) ve hemaglutinasyon inhibisyon (HI) testinde kullanılan antijen HB1 suşunun 11 günlük embriyolu yumurtalarda üretilmesi ile hazırlandı. Antijenin hemaglutinasyon ünitesi (HAÜ) 1/1024 olarak tespit edildi.

**Serolojik Testler :** HI testi için Hollanda yönteminden yararlanıldı (4).

**Maternal Antikor Saptanması :** Civcivlerden 10. günde 10'ar adedinin v.cutanea ulnaris'lerinden aseptik koşullarda kanları alınarak aşılama öncesi maternal antikor düzeyleri belirlendi.

**Lökositlerin boyanması :** Agar ortamındaki hücrelerin göçlerinin net olarak tespit edilip ölçülmesi amacıyla Giemsa boyası ile boyandılar. Bu amaçla hücrelerin agara tam olarak tespit amacıyla agar yüzeyini kaplayacak şekilde petrolere metil alkol konularak 3-5 dk beklenildi. Metil alkol dökülerek agarın kuruması sağlandı. Her bir petriye 10 cc boya solusyon olacak şekilde giemsa boyası hazırlandı (10 cc distile suya 10 damla giemsa ana eriyiği damlatılarak giemsa boyası hazırlandı. )

**Aşılamaalar :** Newcastle hastalığına karşı savaş ve koruma yönetmeliğinde belirtilen programa göre aşılama yapıldı (3). Maternal antikor titreleri belirlenen civcivlerden 15'er adedinin 11. günde ilk aşılama yapıldı. Bu hayvanlar standart bir damlalıklarla buruna bir damla (0.05 ml) HB1 aşı virüsü damlatmak suretiyle aşılandılar. Aşılama gruptan 15 gün sonra (26. gün) tesadüfî örnekleme yöntemi ile

seçilen 10'ar adet civcivin kanları alındı. Alınan kan numuneleri hücrel (sellüler) yanıtın belirlenmesi amacıyla lökosit hazırlanmasında ayrıca sıvısal (humoral) bağışıklığın tespitinde ise hemaglutinasyon inhibisyon (HI) testinde yararlanılmak üzere serum elde edilmesinde kullanıldı. İkinci aşılama 27. günde ilk aşılama yapılan 15'er adet civcivin buruna aynı damlalıklarla LaSota aşı virüsü damlatmak suretiyle uygulandı. Hayvanlardan 15 gün sonra (42. gün) alınan kan örneklerinde LMIT ve HI testi ile sellüler yanıt ve serum titreleri saptandı. Ayrıca, 15 adet aşısız civcivin de kanları kontrol grup olarak LMIT ve HI testleri incelendi.

**Lökosit Hazırlanması :** Lökosit süspansiyonu ml'de  $5 \times 10^7$  hücre olacak şekilde belirtilen yöntemle hazırlandı (1). Bu amaçla kanatlılardan alınan sodyum heparinli kan örnekleri 1000 devirde 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst tabaka (plazma) uzaklaştırıldı. Geriye kalan kısım 1/4 oranında Ficoll-Hypaque ile muamele edilmiş PBS ile süspansiyon edildi. Histopaque 1119 (spesifik özgül ağırlığı 1119, Sigma Chemical Co., st. Lovis, Missouri) dan 15 cc'lik santrifüj tüpüne 3 cc olacak şekilde konuldu. Bunun üzerine ( Histopaque 1119) tabaka oluşturacak şekilde 3 cc Histopaque 1077 (Spesifik özgül ağırlığı 1.077; Sigma )'den ilave edildi. Histopaque 1077 tabakası üzerine dikkatli bir şekilde 6cc Ficoll-Hypaque'lı PBS'den konularak oda derecesinde 1500 devirde 40 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası plazma ile Histopaque 1077 arasındaki hücrel katman steril bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Lökositler Honk's salt içeren M-199 medyumda 1250 devirde 10 dk 3 kez santrifüjlenerek yıkandı. Elde edilen son hücrel katman M-199 mediyumun 1 cc ile süspansiyon edildi. Total lökosit sayısı Nevbaver hemositometresi kullanılarak hesaplandı. Lökositlerde canlılığın tespiti amacıyla trypan blue boyası ile boyandılar. Canlılığın %90'ın üzerinde olması sağlandı. Final lökosit konsantrasyonun ml'de  $5 \times 10^7$  hücre olacak şekilde ayarlanması yapıldı.

**Agar Ortamının Hazırlanması :** Agar ortamı denemede kullanılmak üzere en az 24 saat önceden aşağıdaki şekilde hazırlandı (1).

**Solusyon A:** 1.6 gr agar (Indubiose 45, Gallard - Schlessinger Industries, Carle Place, N.Y.) 160 ml steril distile su içinde 10-15 dk benmaride ısıtılarak çözdürüldü. Eritilen agar karışımı 1 dk otoklavlandı ve daha sonra 52 °C'de su banyosunda bekletildi.

**Solusyon B:** 20 ml fetal sığır serumu, 18 ml Hanks salt içeren 10 x M - 199 (Hazleton Research Products, Denver, Pa.), 2 ml penicilin-streptomycin solusyonu (Sigma) ve 1 ml %7.5 sodyum bikarbonat solusyonunun karıştırılması ile hazırlandı. PH 7.2'ye ayarlandı ve bu karışım 52 °C'de su banyosunda tutuldu.

Solusyon A ve B birlikte karıştırılarak benmaride 52 °C'de bekletildi. Final mediyum % 0.8 agar, % 10 fetal sığır serumu ve % 1 penicilin-streptomycin solusyonundan oluştu. Agar mediyumdan petrolere 13 ml olacak şekilde konuldu. Agarın katılmasından

sonra petriler rutubetli koşullar altında 4 °C'de saklandı.

### Lökosit Göçü Önlenim Testinin Yapılışı :

Lökosit süspansiyonu ( $5 \times 10^7$  ml) 5 ml miktarda iki steril tüpe ayrıldı. Newcastle antijeni (100µl/ml) olacak şekilde 1 ml miktarında ilk tüpe konularak antijenli ve eşit miktarda M-199 mediumdan da kontrol tüpe ilave edilerek antijensiz tüp hazırlandı. Antijenli ve antijensiz lökosit süspansiyonlarını içeren bütün tüpler 37 °C'de 30 dk inkube edildi. Agarın bulunduğu petrilerin her birine belirtilen yöntemlerle altı adet çukur açıldı. Üç göze antijen içeren hücre süspansiyonundan (her göz için 10 µl) ilave edildi. Diğer 3 gözede antijensiz lökosit süspansiyonundan konuldu. Bütün petriler 37 °C'de 18 saat süre ile % 5 CO<sub>2</sub>'li rutubetli ortamda inkube edildi. İnkubasyon sonunda petriler % 8'lik ticari glutaraldehit solusyonu ile 60 dk fikse edildi. Katılaşmış agar toplandı ve buradaki hücreler Giemsa boyası ile boyandılar. Hücresel göçün çapı cetvel kullanarak ölçüldü ve göç sahası  $\pi r^2$  formülü ile hesaplandı. Antijen varlığında ve yokluğunda ortalama göç alanı karşılaştırıldı ve % migrasyon aşağıdaki şekilde hesaplandı.

$$\% \text{ Migrasyon} = \frac{\text{Antijen varlığında ortalama migrasyon}}{\text{Antijen yokluğunda ortalama migrasyon}} \times 100$$

$$\% \text{ Migrasyonun inhibisyonu} = 100 - \% \text{ migrasyon}$$

Genel olarak antijen varlığında % 20'lik inhibisyonundan daha büyük değerlerin önemli lökosit inhibisyon faktör aktivitesi gösterdiği kabul edildi.

Lökosit göçü önlenim testinde aynı zamanda aşılama yapılan hayvanlardan alınan kan numunelerinde hücresel yanıtın belirlenmesi amacıyla lökositler elde edildiği gibi ayrıca aşılama kontrol olarak ayrılan 10 hayvandan alınan kan numunelerinden elde edilen lökositlerde incelemeye alınmışlardır.

### BULGULAR

**Hemaglutinasyon Test Antijeni ve Aşı Virusu :** Hayvanların maternal antikör titrelerinin saptanmasında ve hayvanların aşılmasında Hitchner B1 (HB) ve LaSota suşları kullanıldı. Bu suşların HA titreleri sırası ile 1/1024 ve 1/512 olduğu tespit edildi. Hemaglutinasyon (HA) ve hemaglutinasyon inhibisyon (HI) testlerinde antijen olarak HB1 aşı virusundan yararlanıldı. Virus HI testlerinde kullanılmak üzere 8 HAÜ'de sabit tutuldu.

**Civcivlerde Maternal Antikör Saptanması :** Civcivler 10 günlük iken 10 adedinin vena cutanea ulnarisinden kan alındı. Elde edilen serumların maternal antikör titreleri HI testi kullanılarak saptandı. Ortalama HI titresinin Log<sub>2</sub> tabanına göre 5.6 olduğu saptandı (Tablo - 1).

### Çizelge - 1 : Civcivlerin Maternal Antikör Titre Sonuçları

Table - 1 : Maternal Antibod Titer Results of Chiks

| Serum Sayısı | Log <sub>2</sub> HI titrelesi (x) |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    | Ort. Titre |
|--------------|-----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|------------|
|              | 0                                 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12         |
| 10           | --- 1 4 3 2 - - - - -             |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    | 5.6        |

$$(x) = 1/2^n$$

**Aşılama :** Maternal antikörleri negatif olarak saptanan civcivler 11. gün burun yoluyla aşılandılar. Aşılanan 10 adet hayvandan 15 gün sonra kan alındı. Serumların ortalama Log<sub>2</sub> HI titreleri 8.7 olarak belirlendi (Tablo - 2).

### Çizelge - 2 : HB 1 ile Burun Aşılması Sonrası HI Titreleleri

Table - 2 : HI Titers After Nose Vaccination With HB 1

| Serum Sayısı | Log <sub>2</sub> HI titreleleri (x) |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    | Ort. Titre |
|--------------|-------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|------------|
|              | 0                                   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12         |
| 10           | - - - - - 1 3 4 2 - -               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    | 8.7        |

$$(x) = 1/2^n$$

LaSota aşı suşu ile burun yoluyla ikinci aşamaları yapılan 10 adet hayvandan 15 gün sonra alınan kan numunelerinin ortalama Log<sub>2</sub> HI titreleri 9.5 olarak saptandı (Tablo - 3).

### Çizelge - 3 : LaSota ile Burun Aşılması Sonrası HI Titreleleri

Table - 3 : HI Titers After Nose Vaccination With LaSota

| Serum Sayısı | Log <sub>2</sub> HI titreleleri (x) |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    | Ort. Titre |
|--------------|-------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|------------|
|              | 0                                   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12         |
| 10           | - - - - - - - - 2 3 3 2 -           |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    | 9.5        |

$$(x) = 1/2^n$$

Elde edilen titrelelere göre her iki aşılama sonunda 7 ve 7'nin üzerindeki serum sayısı 10 adet olup ortalama titreye göre bağışıklık durumunun yüzde oranı 100 (% 100) dür.

**Lökosit Göçü Önlenim Testi :** Birinci aşılama HB1 ile burun yoluyla yapılan hayvanlardan alınan kan numunelerinden lökositler, ml'de  $5 \times 10^7$  adet hücre olacak şekilde elde edildi. LMIT'nin uygulanması sonucu antijen varlığında ve yokluğunda lökositlerin meydana getirdiği hücresel göçün çapı bir cetvel ile ölçüldü ve ortalama göç alanı  $\pi r^2$  formülüyle hesaplandı. Elde edilen verilerle % migrasyon belirlendi (Tablo - 4).

**Çizelge - 4 :HB1 ile Burun Aşılması Sonrası LMIT****Table - 4 :LMIT After Nose Vaccination With HB1**

| Serum<br>Sayısı 10 | Hücresele göç çapı (mm) |   |   |   |   |   |    |    | Ort.<br>Göç Alanı | %<br>Migrasyon | %<br>Migrasyon inhibisyon |
|--------------------|-------------------------|---|---|---|---|---|----|----|-------------------|----------------|---------------------------|
|                    | 4                       | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |                   |                |                           |
| Antijenli Dağılım  | 1                       | 3 | 4 | 2 | - | - | -  | -  | 25.50             | 75             | 25                        |
| Antijensiz Dağılım | -                       | 1 | 4 | 3 | 2 | - | -  | -  | 34.19             |                |                           |

Aynı şekilde ikinci aşamaları LaSota suşu ile yapılan hayvanlarda da alınan kan numunelerine uygulanan LMIT sonuçları Tablo - 5'de gösterilmiştir.

**Çizelge - 5 : LaSota ile Burun Aşılması Sonrası LMIT****Table - 5 : LMIT After Noise Vaccination With LaSota**

| Serum<br>sayısı 10 | Hücresele göç çapı mm |   |   |   |   |    |    |    | Ort.Göç Alan | % Migrasyon | %Migrasyon inhibion |
|--------------------|-----------------------|---|---|---|---|----|----|----|--------------|-------------|---------------------|
|                    | 5                     | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |              |             |                     |
| Antijenli dağım    | 1                     | 4 | 4 | 1 | - | -  | -  | -  | 33.16        | 71          | 29                  |
| Antijensiz dağılım | -                     | 2 | 3 | 2 | 2 | 1  | -  | -  | 46.54        |             |                     |

Genel olarak, HB1 ve LaSota suşları ile yapılan aşılama sonucu antijen varlığında sırası ile %25 ve %29'luk bir inhibisyon elde edildiğinden önemli lökosit inhibisyon faktör aktivitesi belirlenmiştir.

Kontrol grubu oluşturan 10 adet hayvanda ise yapılan LMIT sonucu %20'nin altında bir İnhibisyon elde edilmiş olup önemli lökosit inhibisyon faktör aktivitesi belirlenmemiştir.

**Tablo - 6 : Kontrol Grup LMIT****Table - 6 : Control Group LMIT**

| Serum<br>sayısı 10 | Hücresele göç çapı mm |   |   |   | Ort.Göç Alan | % Migrasyon | %Migrasyon inhibion |
|--------------------|-----------------------|---|---|---|--------------|-------------|---------------------|
|                    | 5                     | 4 | 5 | 6 |              |             |                     |
| Antijenli dağım    | 3                     | 4 | 3 | - | 12.56        | 87          | 13                  |
| Antijensiz dağılım | 2                     | 4 | 3 | 1 | 14.51        |             |                     |

**TARTIŞMA ve SONUÇ**

Sürü başışıklığında humoral yanıt önemli bir yere sahiptir. Buna bağlı olarak kanatlı hayvanların aşılama programlarının düzenli bir şekilde yapılabilmesi humoral yanıtın belirlenmesi ile mümkündür. Newcastle hastalığının indirekt teşhisinde kullanılan HI testi ile serumdaki antikor konsantrasyonu güvenilir ve pratik bir şekilde tespit edilebilmektedir. Buradan çıkan sonuca göre humoral yanıt, hücresele yanıtla oranla koruyucu önlemlerin alınmasına ve infeksiyonun teşhisi açısından daha fazla önem taşımaktadır (4).

Evcil hayvan türlerinde mononukleer ve polimorf nukleer hücrelerin yanıtlarını veya aktivitelerini incelemek için hücresele başışıklığın ölçülmesinde kullanılan testlerden yararlanılmaktadır. Yeni tekniklerin uygulanması veya bazı modifikasyonların yapılması, hayvan türleri için bu testlerin standart hale getirilmesine olanak sağlamaktadır (2). Agarda Lökosit Göçü Önlenim Yöntemi (LMIT) kanatlı hayvanların viral ve bakteriyel hastalıklarında kapiller tüp uygulanarak denlenmiştir.

Kapiller tüp lökosit göçü önlenim testi, Newcastle hastalığı (14). Mycobacterium tuberculosis (13) ve Mycoplasma synoviae (15)'ye karşı hücresele başışıklığın değerlendirilmesinde yararlanılmıştır. Bu test yanında lenfosit trasformasyon testi de hücresele (sellüler) immün yanıtın ölçülmesinde ve değerlendirilmesinde kullanılmıştır (10). Ancak, bu testlerin uygulanışı, uzun zaman alması, pahalı alet ve cihazlar gerektirmesi gibi dezavantajları taşımaktadır. Buna karşılık, Agarda Lökosit Göçü Önlenim Testinin uygulanması hem pratik hem de hiçbir pahalı aleti gerektirmeyen yöntem olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, kullanılan teknikte radioisotopları gerektirmemesi, agarın fıkse edilebilir, boyanabilir ve herhangi bir zamanda değerlendirilmek üzere saklanabilir olması da avantaj olarak kabul edilmiştir (1). Hitchner B1 ile birinci aşılama sonucu Log<sub>8.7</sub> antikor titresi, LMIT'de % 25'lik bir migrasyon inhibisyon elde edilmiştir. İkinci aşamaları LaSota ile yapılan hayvanlarda ise Log<sub>9.5</sub> antikor titresi %29'luk migrasyon inhibisyonu şekillenmiştir. LMIT düzeyinin birinci aşılamalara oranla ikinci aşılama sonucu daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur. Bu

sonuç araştırmacıları ile paralellik göstermektedir (1). Buna göre aşılama sonucunda ortaya çıkan antikor titrelerinin oluşturduğu humoral yanıt ile LMIT sonucu elde edilen hücresel (sellüler) yanıt arasında bir ilişkinin bulunduğu gösterilmiştir. Bu konu ile ilgili olarak hücresel yanıtın varlığı daima serolojik bir immun yanıtın varlığı ile ilişkili iken bunun tam tersinin de söz konusu olabileceği bildirilmiştir (1). Humoral ölçüm yöntemlerinin aksine hücresel ölçüm yöntemlerinin sonuçları daha değişkendir. Bu yöntemlerle ölçülen hücrelerin yerleşim ve dolaşım şekilleri oldukça farklıdır ve ekzojen faktörlere karşı oldukça duyarlıdır (6).

Sonuç olarak, Agar Lökosit Göçü Önlenim Tekniği kullanılması özellikle, Newcastle aşılama çalışmalarında bağışıklık kontrollerinin hücresel bazda değerlendirilmesinde önemli yararlar sağlayacağı kanısına varılmıştır.

#### KAYNAKLAR

1. Agrawal, P.K. and Reynolds, D.L., 1991. Evaluation of the cell - mediated immune response of chickens vaccinated with Newcastle disease virus as determined by the under agarose leukocyte migration inhibition technique. Avian Dis., 35; 360 - 364.
2. Andreasen, C.B. and Latimer, K.S., 1989. Separation of avian heterophils from blood using ficoll - hypaque discontinuous gradients. Avian Dis., 33 : 163 - 167.
3. Anonim. 1971. Newcastle hastalığı burun-göz damla aşısı protokolü. 13.10.1971 tarihli ve 309 No.lu Bak. Sağ. Müş. Kur. Kar.
4. Arda, M., 1976. Hollanda'da Newcastle hastalığı üzerinde çalışmalar ve HI testinin yeni yöntemine göre değerlendirilmesi. Vet. Hek. Dern. Derg., 46 : 19 - 28.
5. Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., ve İzgür, M., 1994. Kanatlı hayvan hastalıkları. 2. Baskı Medisan Yayn., Ankara.
6. Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M., ve Diker, K.S., 1994. İmmunoloji. 1. Baskı Medisan Yayn. No: 13, Ankara.
7. Barton, J.T., Bickford, A.A., Cooper, G.L., Charlton, B.R. and Cardona, C.J., 1992. Avian paramyxovirus type 1 infections in Racing pigeons in California. I Clinical signs, pathology and serology. Avian Dis., 36: 463-468.
8. Bruning-Fann, C., Kaneene, J. and Heamon, J., 1992. Investigation of an outbreak of velogenic viscerotropic Newcastle disease in pet birds in Michigan, Indiana, Illinois and Texas. J.A.V.M.A., 201 : 1709-1714.
9. Fang, H. and Chen, C.Z., 1993. Experimental of infection quails with Newcastle disease virus. Acta Vet. Zootech. Sin., 24 : 148 - 154.
10. Ghumman, J.S. and Bankowski, R.A., 1976. In vitro DNA synthesis in lymphocytes from turkeys vaccines. Avian Dis., 20: 18 - 31.
11. Jordan, F.T.W., 1990. Poultry disease. 3rd ed. Bailliere Tindall, England.
12. Nelson, R.D., Quie, P.G. and Simmonas, R.L., 1975. Chemotaxis under agarose: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. J. Immun., 115: 1650 - 1656.
13. Timms, L.M., 1979. Correlation of the lymphocyte transformation, migration inhibition and the delayed cutaneous hypersensitivity tests in chickens sensitized to Mycobacteria tuberculosis. Res Vet. Sci., 27: 347 - 353.
14. Timms, L.M. and Alexander, D.J., 1977. Cell-mediated and humoral immune response of chickens to Newcastle disease vaccines. Avian Pathol., 6: 51 - 59.
15. Timms, L.M. and Cullen, G.A., 1976. Cell-mediated and humoral immune response of chickens to Mycoplasma synoviae. Avian Dis., 20: 96 - 107.