

Viroloji'de Embriyolu Tavuk Yumurtasına İnokülasyon Metodları

Les Méthodes d'Inoculation à Virologie sur l'Oeuf Embrio

Ahmet AKIN (*)

15 - 30 ilâ 200 milimikron arasında değişen viruslar 1 — Deney hayvanı 2 — Embriyolu tavuk yumurtası, 3 — Doku kültürü gibi sadece canlı ortamlarda üretilebilir. Deney hayvanı metodunun ekonomik olmaması, Doku kültürünün zor olması, buna mukabil embriyolu tavuk yumurtasının hem ucuz ve hemde kolay temin edilmesi nedeniyle embriyolu tavuk yumurtasına inokülasyon metodu, son yıllara kadar lâboratuvarlarda en çok kullanılan bir metod olmuştur.

OMURTAG (11); Embriyolu tavuk yumurtasına ekim metodlarının; bol miktarda virusi materyalin temin edilmesi, inokülasyondan sonra deney hayvanlarında olduğu gibi antikor teşkil etmenin söz konusu olmaması, virusların embriyolu tavuk yumurtasına inokülasyon suretiyle elde edilen aşuların deney hayvanına inokülasyon ile elde edilene nazaran daha az protein ihtiva etmesi gibi faydaları yanında, yumurtanın kendi bünyesindeki latent viral enfeksiyonları beraberinde aşı materyaline intikal ettirmesi, *Pleurapneumonia like* organizmler ile *Ornithosis*, *Rous sarcoma*, *Avian encephalitis* ve *New-castle* etkenlerinin barınağı olması gibi mahsurlarının da bulunduğunu bildirmektedir.

Embriyolu tavuk yumurtasına inokülasyon; ilk defa 1911 yılında ROUE ve MORPHY tarafından Rous sarcoma üzerindeki araştırmalar sırasında kullanılmış (5.), 1931 yılında GOOD PASTEUR ve WOODRUF (5.), 1946 senesinde BEVERIDGE ve BURNET (8), virusu yumurta embriyosuna inoküle ederek, embriyoya ekim üzerindeki çalışmaları hakiki inkişaf sahasına doğru intikalini temin etmişlerdir.

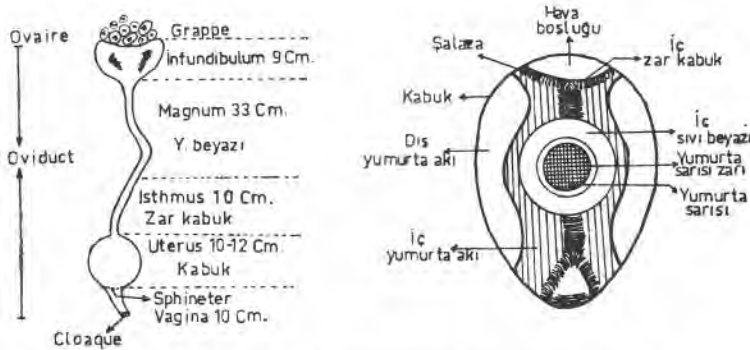
Redaksiyona verildiği tarih : 27 Haziran 1973

(*) Mikrobiyoloji ve Besin Analizleri Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi

Bu gün; *Rickettsial* ve virusların embriyo kültürlerinin yapılmasında, serolojik reaksiyonlarda kullanılan antigen'lerin hazırlanmasında ve aşı imalinde kullanılan en önemli bir vasıta haline gelmiştir. Bu nedenle fekonde edilmiş tavuk yumurtasına yapılacak ekim nev'i ve tekniğinin bilinmesi, en önemli hususu teşkil eder. Ancak burada tavuk foetus'unun biyolojisi, yumurtanın teşekkülü, kuluçkaya konacak olan yumurtanın menşeyi hakkında bilgi sahibi olmak gerekmektedir.

Yumurta teşekkülünün biyolojisi :

Cinsel olgunluğa erişmiş olan her tavuğun Ovaryumunda, ancak mikroskopla görülebilen yüzlerce yumurta sarısı hücreleri vardır. Büyüme ve olgunlaşması sona eren yumurta sarısı, Folikül adı verilen zarının uygun bir yerinden çatlaması sonucu Oviduct'a geçer. Yumurta Oviduct'un ön kısmında takriben 3 saat kalır. Bu süre esnasında sarının etrafını çeviren yumurta akının % 45' i oluşur. Keza fekondasyon'da Oviduct'un ön kısmında vukua gelir. İsthmus'a geçen yumurta 1 saat kadar bekler ve bu esnada yumurta akının geriye kalan % 10 u ile zar kabuğun teşkiline yaran yapışkan maddeler meydana gelir. Nihayet Uterus'a geçen yumurtanın zar kabuğu ve kabuğu oluşur. Vagina'dan hızla geçen yumurta dışarı atılırken yumurta kanalı öne doğru uzanarak dışkı deliğini kapar. Böylece yumurta Cloaca'dan genellikle temiz çıkar (4-5).



Şek. 1 : Genital organ ve yumurtanın sematik görünümü (10).

Embriyonun teşekkülünün biyolojisi :

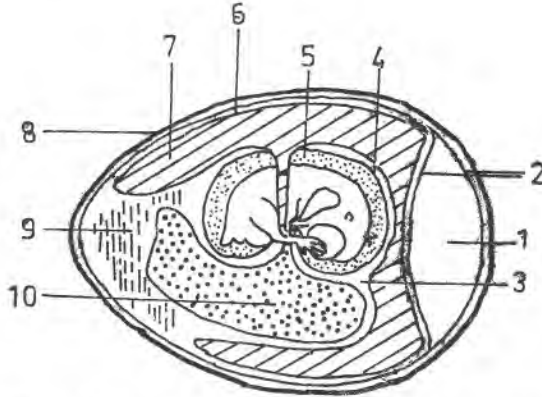
Yumurta daha uterusda iken Zigot'ta bölünmeler başlar. Fakat dışarı çıkan yumurta müsait hararet ve şartları bulamadığı için bölünme durur. Dışarıda duran bu bölünmeler, yumurtanın inkübatorre konmasından sonra yeniden başlar. 21 günlük kuluçka müddetinde embriyoda bir çok değişiklikler olur. Taze olarak kuluçka makinesine konan, döllenmiş yumurtada; Morula, Blastula ve Gastrula adı verilen bölünme safhalarından sonra Ektoderm, Eno-derm ve Mezoderm tabakaları husule gelir. ERENÇİN (4)'e göre Ektoderm'den deri, tüy ve sinir sistemi, Endoderm'den; solunum ve sindirim organları, Mezoderm'den ise; kemik, adele ve kan dokusu oluşur.

Kuluçka makinesine konan yumurtanın 2. gününde, yumurta sarısı oval bir şekil alır ve yukarı doğru çıkar. Bu hali ile yumurta sarısı adeta yumurta akı içinde yüzer vaziyettedir. Bir süre sonra da yumurtada kan damarları oluşur. Embriyo yumurta akını doğrudan doğruya alamaz. Ancak yumurta sarısı aracılığı ile alabilir. Bunun içindir ki kan damarları yumurta akının içinde değil sarının etrafındadır. Kan damarlarının oluşumundan sonra gıda alma işide başlamış olur. Bu nedenle sindirilen besin maddeleri artıklarının dışarı atılması yani Defekasyon işleminin de başlaması gerekir. Defekasyon 2. günün nihayetinde teşekküle başlayan ve 4. gün tamamlanan Allantois aracılığı ile olur. Chorio-allantois üzerinde yumurta sarısından gelen kan damarları solunum işini yüklenmişlerdir. Allantois'in teşekkülünden önce zigotun etrafını çeviren yumurta akından alınmış su ile dolu ve oksijen ile doyurulmuş vaziyette Amnion kesesi meydana gelir. Zigot bunun içinde yüzer vaziyettedir. 3. gün embriyo ile birlikte Chorio-allantoic zar da teşekküle başlar ve zaman geçtikçe büyür. Embriyonun vaziyeti sırt yukarı, vücut bütünüyle yumurtanın uzun eksenini boyunca uzanır. 4. gün ayak ve kanat yerleri belirmeye başlar. 6. gün ayak ve kanatlar belli olur. 9. gün embriyo bir kuş manzarasını alır. 13. gün ise sırtta tüylerin teşekkül etmeğe başladığı görülür (4-5).

10 günlük bir yumurta embriyosunun şematik görünümü şekil (2) de gösterilmiştir. Bunlar sırası ile;

1 — **Zar Kabuk** : Yumurta sarısı, kabuğu her taraftan ona bitişik olarak kaplamıştır. Zar kabuk yumurtanın geniş kısmındaki hava kesesi tarafında daha iyi inkişaf etmiştir.

2 — **Chorio - allantoic membran** : Haricen Chorionic ektoderm, dahilen Chorionic endoderm'den meydana gelmiştir (5). Bu iki tabakadan kan damarları yani kapiller arteri ve kapiller venler bulunur. Daha önce de bahsedildiği gibi bu membran, embriyonun solunum işini görmektedir. Chorio-allantoic membran her tarafından zar kabuğa yapışmıştır, fakat birbirlerinden kolayca ayrılırlar.



1-Hava kesesi 2-Zar kabuk 3-Extraembryonic boşluk 4-Amniotic membrane 5-Amniotic boşluk 6-Chorioallantoic membrane 7-Allantoic boşluk 8-Kabuk 9-Yumurta akı 10-Yumurta sarısı.

Sek. 2 : Embriyolu tavuk yumurtasının şematik görünümü (8).

3 — **Chorio-allantoic cavité** : Chorionic ektoderm ile Chorionic endoderm arasındaki boşluktur ki bu boşlukta Allantois sıvısı bulunur. 6-8 ci günlerde 1 c.c. olan bu sıvı 12-13 cü günlerde 6-8 c.c. ye ulaşır. Önceden berrak olan bu sıvı 13-14 cü günlerde böbreklerin çıkardığı Ekstra üretaz ve Fosfatazlar nedeniyle bulanır. 12-13 cü günde alkali, daha sonraki günlerde aside dönüşen bu sıvının, pH sı 6 dır (8). 13 cü günden sonra sıvı azalır ve civcivin çık-

ması esnasında Chorio-allantoic sıvı bulunmaz (3). Allantois sıvısının aşı ve antigen hazırlanmasında, virus pasajlarında önemli yeri vardır.

4 — **Amnion kesesi** : İçindeki sıvı ile birlikte embriyoyu çevirmiştir. Embriyonun kolaylıkla hareket etmesini temin eder.

5 — **Amnionic cavité** : Yaklaşık olarak 1 cc. sıvı ihtiva eder. Bu sıvı 12 nci güne kadar berraktır. Sonraki günlerde bulanmaya başlar. İnokülasyon yapılmayan bir yumurtanın amnion sıvısında % 0,006 oranında albumin bulunmaktadır (3).

6 — **Yumurta sarısı** : Sindirim ve defekasyonun başlamasından önce embriyonun beslenmesinde en önemli rolü oynamaktadır. Yumurta sarısı endodermal orijinlidir. Etrafı kan damarları ile kaplı yumurta sarısı kesesi içinde yer alır ve 6 ncı günden itibaren azalmaya başlar.

Kuluçkaya konacak olan yumurtanın menşei ve canlılık muayenesinin yapılması :

Embriyolu yumurtanın *Rickettsia* ve Virusların üretilmesinde kullanılan en uygun ve temini kolay vasatlardan biri olduğunu yukarıda belirtmiştik. Bu maksat için; yumurta belirli ve hastalısız bir tavuk çiftliğindeki Legorn'lardan elde edilmiş, beyaz kabuklu, döllenmiş, 55 - 60 gr. ağırlığında olmalıdır. Her şeyden önce seçilen yumurtaların parazit vs. gibi yabancı maddeleri ihtiva etmemesi, sarısız ve kabuksuz, yumurta içinde yumurta gibi anormal yumurta olmaması gerekmektedir. Kullanılacak yumurtaların kabuklarının temiz ve sağlam olması gerekir. Bazı müellifler kirli kabukları sabunlu su veya alkolle silmeyi tavsiye ettikleri halde (8), bazı müellifler silinen yumurtalarda kontaminasyon'un kolaylaşacağını söyleyerek temizlenmemesi fikrini savunmaktadırlar (3). Kuluçkaya konacak olan yumurtalar dış ortamda 10 günden fazla bekletilmemeli, mümkünse 5 günü geçirmemelidir. Kuluçkaya konmadan önce yumurtalar 4,5 - 20°C de muhafaza edilmelidir. Kuluçka makinesine konan yumurtalar günde en az iki defa çevrilmeli ve 5 dakika kadar soğutulmalıdır.

Yumurtalar inokülasyondan önce 7 - 14 günlük iken karanlık bir odada, içine 100 W. bir lâmba yerleştirilmiş ve ortasına yumur-

tanın küçük ekseninden daha dar bir delik açılmış «Yumurta muayene lâmbası»nda muayene edilir. Muayene sırasında embriyonun; canlı, siyah renkli, hareketli ve Chorio-allantoic zar üzerinde bulunan kan damarlarının dolgun olması gerekmektedir. Keza bu sırada hava kesesinin alt sınırı ile embriyonun bulunduğu yer bir kurşun kalemle işaretlenir. Yumurta kabuğu çeşitli ekim metodlarında bir biz veya sivri uçlu bir alet yardımıyla zar kabuk zedelenmeden delinir. İnokülasyon için lastik puar, ucuna ince bir iğne takılmış enjektör, kapiller pipetlerden istifade edilir. İnokülasyon asepsi ve antisepsiye dikkat edilerek ve steril aletler kullanılarak yapılır. Ekimden sonra yumurtalar BÉTTTS ve YORK'a göre 33, 35, 37 ve 36 - 38°C (1) lik bir bakteriyolojik etüve kaldırılarak inkübe edilirler.

İnokülasyon için embriyonun gelişme devresinin seçimi :

İnokülasyon için embriyonun gelişme devresinin seçimi, virusun tabiatına ve inokülasyon yoluna göre değişmekle beraber, ekim yollarına göre embriyonun gün olarak yaşı tablo (1) de gösterilmiştir.

İnokülasyon nev'i	İnokülasyon için İnkübasyon süresi, gün olarak	Ekim günü
1 — Chorio-allantoic membran	10 - 13	10. ve 12. gün
2 — Allantois boşluğu	10 - 12	10. gün
3 — Amnion boşluğu	12 - 14	13. gün
4 — Yumurta sarısı	5 - 7	6. gün
5 — İntraveineuse	12 - 13	12. gün
6 — İntracérébrale	12	12. gün

Tablo 1 : Çeşitli inokülasyon şekilleri için elverişli inkübasyon süreleri (gün olarak) (6).

Buraya kadar fekonde bir yumurtada embriyonun oluşumu ve inokülasyonun yapılacağı yumurtanın haiz olması gereken özellikleri kısaca belirttik. Şimdi inokülasyon çeşitlerine göre uygulanacak teknik hakkında bilgi vermeye geçebiliriz.

İnokülasyon metodları

Yukarıda da bir nebze temas edildiği gibi, yumurta embriyosuna yapılan inokülasyonlar başlıca; 1 — Chorio - allantoic membran, 2 — Allantois sıvısı, 3 — Amnion kesesi, 4 — Yumurta sarısı, 5 — Intraveineuse, 6 — Intracérébrale şekillerde yapılır.

I — Chorio - allantoic membrana inokülasyon

Bu nev'i inokülasyon üç şekilde yapılabilir.

a — Görerek ekim : Yumurta muayene lâmbasında hava kesesinin alt sınırı ve embriyonun bulunduğu yer işaretlenir. Embriyonun bulunduğu taarfta, kabuk üzerinde kan damarlarının bulunmadığı bir bölgede, üçgen tarzında bir saha çizilerek üzeri dezenfekte edilir. Keskin bir alet veya dirille zar kabuğa zarar verilmeden kabuk kesilerek kaldırılır. Zar kabuk üzerine bir kaç damla steril serum fizyolojik damlatılır. Zar kabukla Chorio-allantoic membran arasına yayılan serum fizyolojik bu iki zarın biri birinden ayrılmasını temin eder. Hava kesesinin tepesine biz yardımıyla bir delik açılır. Bu deliğe tatbik edilen bir lastik puar ile hafifçe emilerek Chorio-allantoic membranın düşmesi ve sun'i bir hava boşluğunun meydana gelmesi sağlanır. Üçgen şeklinde açılan pencereden girilerek, bir pasteur pipeti veya ucuna 18-20 (3) nolu iğne takılmış bir enjektör ile zar kabuk geçilerek 0,05-0,1 c.c. inokülüm membran üzerine damlatılır.

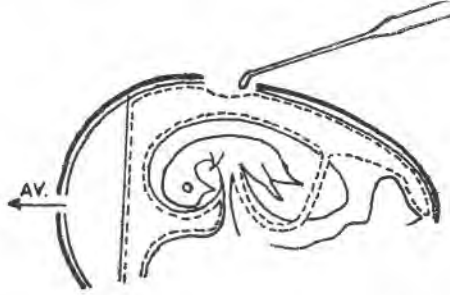
İnokülasyondan sonra, pencere bir lâmelle kapatılarak üzeri ve hava kesesi tepesindeki delik; tırnak cilası, eritilmiş parafin, mühür mumu veya %5 yumurta akı (7) ile iyice kapatılarak, horizontal şekilde inkübasyona bırakılır.

b — Görmeden ekim : Yumurta yine horizontal tutularak, hava kesesi tavanında ve inokülasyon için elverişli olan bir noktada işaretlenen yerler, uygun bir antiseptikle dezenfekte edilir. Bu noktalar, zar kabuğa zarar vermeden 2 mm. genişliğinde delinir. İnokülasyon yapılacak noktadaki deliğin etrafına bir damla steril mayi parafin koyulur. Hava kesesi üzerindeki delikten hafifçe emilerek, yumurta muayene lâmbasında sun'i hava boşluğu meydana gelip gelmediği kontrol edilip, düştüyse sınırı bir kurşun kalemle çizilir. Horizontal vaziyette tutulan yumurtaya 0,05 cc. inokülüm enjekte

edilerek, delikler uygun bir kapatıcı ile kapatılıp, inkübasyona kaldırılır.

c — Görmeden ekim : Hava kesesinin tepesinde yumurta kabuğu dezenfekte edilerek 1,5x1,5 cm ebadında kesilip kaldırılır. Aynı şekilde zar kabukta bir pens veya makasla kesilerek kaldırılır. İnokülüm enjektör veya pasteur pipeti ile damlatılır, pencere seloteyp ile kapatılarak yumurta dikey pozisyonda inkübatöre kaldırılır (3).

Chorio-allantoic membran üzerine ekim özellikle; *Vaccinia*, *Variola*, *Larigo-thraheitis*, *Aujeszky* viruslarının izolasyonları ve kültürleri için kullanılır. Chorio-allantoic membran; patolojik oluşumlar ve *Einschulusskörperchen*'lerin teşekkülü, virus ve antiserumların «Pock» (Düğümçük) sayma tekniği ile titrasyonların ve kimyasal tedavi aktivitesinin tesbiti için en elverişli yerdur (3).



Şek. 3 : Chorio - allantoic membran üzerine görerek direkt ekim (7).

Enfekte materyalin toplanması için; yumurta kabuğu, sun'i hava kesesinin üstü iyice dezenfekte edildikten sonra bir makas ile kesilerek atılır. Zar kabuk ile Chorio - allantoic membran da aynı bir makasla kesildikten sonra, yumurta muhteviyatı bir petri kutusuna aktarılır. Membran muhteviyattan temizlenerek ayırt edilir.

Ekim hava kesesi tepesinde 1,5x1,5 cm ebadında bir pencere açılarak yapılmış ise, yumurta kabuğu (hava kesesinin üst kısmı) dezenfekte edilir. Hava kesesinin alt sınırından 5 mm üstte olmak üzere kabuk kesilerek kaldırılır. Zar kabuk bir pens ile tutularak

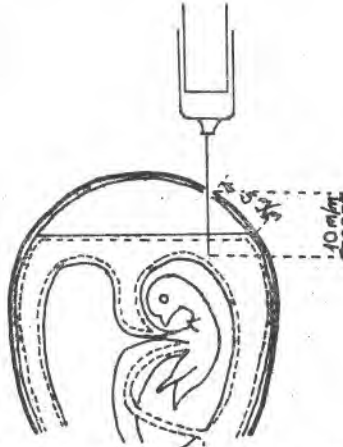
ayırt edilir. Chorio - allantoic membran yırtılır. Yumurta muhteviyatı boşaltılarak, Chorio - allantoic membran alınır.

2 — Allantois boşluğuna inokülasyon :

Allantois boşluğuna ekim için de 3 ayrı teknik uygulanabilir.

a — Aspirasyon vasıtası ile ekim tekniği : Bu maksat için 10-12 günlük yumurtalar kullanılır. Yumurta, muayene lâmbasında muayene edilerek hava kesesinin alt sınırı ile embriyonun bulunduğu yer bir kurşun kalemle çizilir. Embriyonun bulunduğu tarafta, bu noktadan 0,5 cm. kadar uzakta, kan damarlarından fakir bir nokta işaretlenir. Her iki nokta da 1/10 alkolle dilüe edilmiş iode (7) ile dezenfekte edilir. Zar kabuğu zarar vermeden küçük bir delici ile 3 mm. ebadında delinir. Ucuna 18-20 (3) nolu iğne takılmış bir enjektör ile, embriyo üzerine isabet eden delikten 3-4 mm. kadar girilerek 0,05-02 cc. inokülüm enjekte edilir.

Embriyoya zarar vermemek için kullanılan iğnenin ucunun mutlaka kırık veya aşındırılmış olması gerekir (3, 7, 8). Delikler parafin, tırnak cilası gibi uygun bir kapatıcı ile kapatılarak inkübasyona kaldırılır.



Şek. 4 : Allantois boşluğuna aspirasyon ile ekim tekniği (7).

b — Hava kesesi boşluğu yolu ile ekim tekniği : Bu yolla ekim hava kesesi boşluğu katedilerek yapılır. Bunun için hava kesesi ta-

banından 0,5 cm. uzaklıkta, embriyonun bulunduğu tarafta bir nokta işaretlenir. Ucu düzleştirilmiş bir iğne takılmış enjektör ile delikten 10 - 15 mm. girilerek 0,05 - 0,2 cc. inokülüm enjekte edilir.

c — Direk inokülasyon tekniği : LEPİNE ve SOHIER; allantois boşluğuna, hava kesesinin tepesinden 0,5 - 1 cm. uzaklıktaki bir noktadan dik olarak girilerek, inokülümün enjekte edilmesini tavsiye etmektedir.

Allantois mayininin toplanması : Kabuk, hava kesesinin üzerinde uygun bir dezenfektan ile dezenfekte edilerek, hava kesesinin alt sınırından 0,5 cm. kadar yukarıda kesilerek kaldırılır. Chorio-allantoic membran yırtılır. Bir pens ile embriyoya bastırılarak, steril bir pipet yardımıyla allantois mayii emilir.

3 — Amnion boşluğuna inokülasyon :

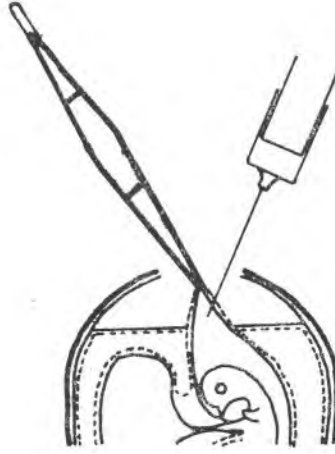
a — Görerek direk ekim : Hava kesesi üzerinde kabuk dezenfekte edildikten sonra 2 cm. çapında yuvarlak bir pencere açılır. Zar kabuk kaldırılır. Allantois zarı ucuna küt bir iğne takılmış enjektörle geçilerek inokülasyon yapılır. Enjeksiyondan önce bir pens yardımıyla allantois zarının tutularak çekilmesi ekimi kolaylaştırır. İnokülasyondan sonra, açılmış olan pencere lâmel veya selefona ile kapatılarak üzeri parafinlenir ve inkübasyona kaldırılır.

b — Yarı görerek ekim : Hava kesesi üzerinde kabuk dezenfekte edildikten sonra 1,5x1,5 cm. genişliğinde bir pencere açılır. Zar kabuk üzerine bir kaç damla steril serum fizyolojik damlatılır. Embriyonun hareket etmesi beklenirken gözünün olduğu yer tayin edilir. Ucuna küt bir iğne takılmış enjektör, bu istikamette batırılarak materyal enjekte edilir. Açılan pencere yukarıdaki şekilde kapatılarak inkübasyona bırakılır.

c — Görmeden ekim tekniği : Yumurta, muayene lâmbasında muayene edilerek, hava kesesi tepesinde ve embriyonun bulunduğu tarafta birer nokta işaretlenir, üzerleri dezenfekte edilerek delinir. Enjektör embriyoya dokunacak şekilde sokularak 0,2 cc. inokülüm enjekte edilir. LEPİNE ve SOHIER görmeden ekimin aşağıdaki şekillerde de yapılabileceğini bildirmektedirler.

1 — Karanlık odada hava kesesinin alt sınırı ve embriyonun yeri işaretlenir. Hava kesesi dezenfekte edilir. Hava kesesi üzerinde embriyoya 2 cm. uzaklıkta bir yer işaretlenerek delinir. Ucu küt iğneli enjektör, embriyo istikametinde sokulur; 0,2 cc. inokülüm enjekte edilir. Delik kapatılır ve yumurta dik olarak viole yerleştirilerek inkübasyona kaldırılır.

2 — Yumurta viol üzerine vertikal olarak yerleştirilir ve embriyonun zıt tarafı aydınlatılır. Hava kesesinin alt sınırına yakın ve embriyonun bulunduğu yerde bir nokta işaretlenerek dezenfekte edilip, delinir. İğne bu noktadan sokularak, embriyonun hareket ederek iğneye temas etmesi beklenir. Bu anda 0,1 - 0,2 cc. materyal inoküle edilir. Delikler kapatılır ve yumurta inkübasyona kaldırılır.



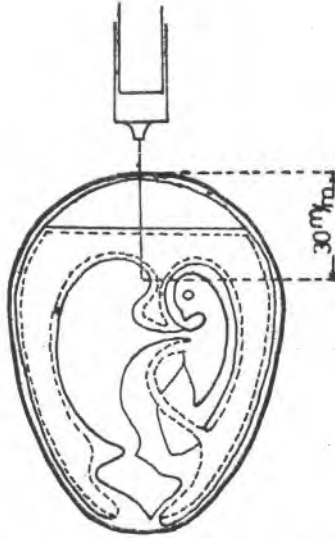
Şek. 5 : Amnion boşluğunu görerek ekim (7).

Amnion mayiinin toplanması : 3 - 5 günlük inkübasyondan sonra, kabuk dezenfekte edilerek üstten kesilir. Allantoic sıvı dışarı atılır, amnion zarı bir pensle tutularak, steril kapiller bir pipetle boşluğa girilip, amnion mayii emilir ve virusun serolojik yollarla mevcudiyeti kontrol edilir.

4 — Yumurta sarısına inokülasyon :

a — Hava kesesi tepesinde 1 - 3 mm. bir delik açılır. İnoküle

edilecek materyalden, 4-5cm. uzunluğunda 7 mm çapında (7) ucu küt bir iğne takılmış enjektöre çekilir. Açılan delikten dikey olarak 2,5-3 cm. kadar girilerek 0,1-1 cc. materyal inoküle edilir. Delik uygun bir kapatıcı ile kapatılarak, yumurtalar inkübatöre kaldırılır.



Şek. 6 : Yumurta sarısına inokülasyon (7).

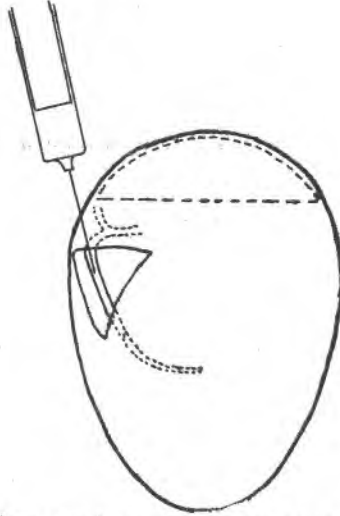
b — Dikey olarak vialde konmuş yumurta, dikey eksene göre embriyonun bulunduğu tarafa 20-25 derecelik bir meyille yatırılır. Tepede bir delik açılır. Bu deliğin yumurta sarısı tarafında ve 0,5-1 cm. uzaklıkta ikinci bir delik açılır. Ucu küt iğne takılmış bir enjektörle 2,5-3 cm. kadar girilerek inokülasyon enjekte edilir. Delikler kapatılır ve yumurtalar inkübasyona kaldırılır (7).

c — Yumurta, muayene lâmbasında muayene edilerek, yumurta kabuğuna sarının olduğu tarafta, hemen hemen ortada bir nokta işaretlenir ve dezenfekte edilir. Yumurtanın uzun eksenine dik bir şekilde 1,5 cm. kadar girilir ve virüsü materyal inoküle edilir. Kabuk parafin ile kapatılarak, genellikle 36°C de inkübasyona kaldırılır (7).

Yumurta sarısının toplanması : Embriyo öldükten veya gerekli inkübasyondan sonra, yumurta sarısı kesesi yumurtadan ayır edilir. Bu da; hava kesesi üzerindeki yumurta kabuğunun kesilip atılması, zar kabuk ve Chorio-allantoic zarın kesilmesi ile olur. Sarı kesesi yırtılarak, yumurta sarısı ve sarı kesesi ayrı ayrı kaplara alınır.

5 — İntraveineuse inokülasyon

İntraveineuse inokülasyon genellikle, Chorio-allantoic membran üzerindeki dolgun ve belirgin damarlara yapılır. Hava kesesine yakın bir bölgede, iyice gelişmiş ve belirgin bir damar seçilerek, kurşun kalemle damarın doğrultusu çizilir. Damara rastlayan bölgede 1,5x1,5 cm. ebadında kabuk, damara zarar verilmeden kaldırılır. Zar kabuk üzerine bir damla steril vazelin likit damlatılarak görüş kolaylaştırılır. Kanın akış yönü tayin edilerek, ince bir iğne ile damara girilip, 0,05 - 0,5 cc. virusi materyal enjekte edilir. Kabukta açılan pencere uygun bir kapatıcı ile kapatılarak, inkübasyona kaldırılır.



Şek. 7 : İntraveineuse inokülasyon (7).

12 - 13 günlük embriyolu yumurtalar bu metod için elverişlidir. Bu inokülasyon şekli daha çok Hematolojik çalışmalarda tercih edilir (3).

6 — İntracérébrale inokülasyon :

Hava kesesi üzerinde kabuk 1,5x1,5 cm genişliğinde kaldırılır. İnoküle edilecek virusi materyal, ucuna 20 numara (3) iğne takılmış ve iyice tesbit edilmiş bir enjektöre çekilir. Bir pens ile embriyoya temas edilerek, başın yeri tayin edilir. Aynı pens ile gagadan tutularak sert bir darbe ile kafatasına girilir. 2 mm kadar ilerlenerek 0,02 cc. inokülüm enjekte edilir.

Bu metod daha ziyade beyinde patolojik değişiklikler yapan hastahklarla ilgili çalışmalarda kullanılır. Örneğin Herpes simplex veya Lyssa virusları bu yol ile enjekte edilerek üretilirler. Bu metod için 12 günlük embriyolu yumurtalar kullanılır ve ekim 12. gün yapılır.

Yukarıda bahsedilen inokülasyonlardan sonra, embriyolar 1-6 günlük inkübasyona bırakılırlar. İnkübyasyon süresinde yumurtalar, günde en az iki defa muayeneye tabî tutulurlar. Bazı viruslar embriyoyu 24 saat içinde, bazıları daha geç öldürürler. Bazı viruslar da ilk inokülasyonlarda ya hiç veya kısmen öldürür. İkinci pasajdan sonra, örneğin Enfeksiyöz bronşit'te olduğu gibi ölümler artabilir.

İnkübasyon sırasında embriyonun öldüğü; yapılan muayene sırasında embriyonun hareketsiz ve bir kütle şeklinde durmasından, damarların dolgun olmamasından anlaşılır. SERTER; Chorio-allantoic membrandaki kan damarlarının, inkübasyonun 5. gününden itibaren görülmeğe başladığını, 6-8. günlerde embriyonun kabuğa yakın bir leke halinde, 9-11. günlerde hareketli olduğunun fark edildiğini bildirmektedir.

Çiçek grubu viruslar, Chorio-allantoic membran üzerinde, makroskobik olarak görülebilen çiçek düğümçüklerinin «Pock» teşekülüne sebep olurlar. Bununla beraber embriyoyu öldürmeyen ve hemde makroskobik bulgular meydana getirmeyen viruslar da mevcuttur. Bunların üremeleri histolojik ve serolojik özel metodlar ile tesbit edilir.

Genel olarak embriyolu tavuk yumurtasında üretilen viruslar şunlardır; *Myxo virusların* çoğu, *Çiçek virusları*, *Lymphocyter choriomeningitis virusu*, *Lyssa*, *Enfeksiyöz tavuk Bronchitis* ve *Laryngotracheitis virusları*, *Stomatitis vesicularis*, *Enten hepa-*

titis virusu, Aujeszky, Sarı humma virusu, Gençlik hastalığı virusu, Şap ve Poliomyelitis virüsleri (6), Doğu ve batı beygir *Encephalitis virüsleri* (12)'dir.

Virusun mevcudiyetinin anlaşılması için kriter, sadece inokülasyon yapılmış embriyonun ölmesi değildir. Bazı patolojik değişiklikler de virusun varlığını ortaya koymada kriter olarak kullanılır. Bu değişikliklerin bazıları aşağıdadır (9);

- 1 — Embriyonun ölmesi,
- 2 — Subcutan dokunun kanaması, Occipital bölgede tüylü Foliküllerin oluşumu,
- 3 — Ayak ve kanat damarlarının veya bütün embriyonun Congestionu,
- 4 — Embriyonun büzülmesi ve cüce kalması,
- 5 — Amniotik sıvının miktarının azalması,
- 6 — Allantoik sıvının miktarının çoğalması,
- 7 — Chorio-allantoic membranın ödemli bir hâl alması ve kalınlaşması,
- 8 — Chorio - allantoic membranda «Pock» düğümçüklerinin oluşumu,
- 9 — Mikroskobik lesionların oluşumu,
- 10 — Inclusion (Einschlusskörperchen) cisimciklerinin teşekkülü,
- 11 — Böbrek stromasında ürat birimi ve mezonefroz'lar.

Ö Z E T

Embriyolu tavuk yumurtasının hem ucuz ve hem de kolay temin edilmesi nedeniyle embriyolu tavuk yumurtasına inokülasyon metodu, son yıllara kadar lâboratuvarlarda en çok kullanılan bir metod olmuştur.

Virusların embriyolu tavuk yumurtasına inokülasyonları aşağıda belirtildiği gibi bir kaç şekilde yapılmaktadır :

- 1 — Chorio - allantoic membran üzerine ekim,
- 2 — Allantoic cavité'ye ekim,
- 3 — Amnion kesesine ekim,
- 4 — Yumurta sarısına ekim,
- 5 — İntraveineuse ekim,
- 6 — İntracérébrale ekim.

Virusla enfekte edilmiş yumurtada teşekkül eden makroskobik ve mikroskobik lesionlar, bazı viral enfeksiyonların teşhisinde rol oynayan önemli kriterlerdir. Embriyo ya öldükten veya gerekli in-kübasyon süresinden sonra öldürülerek, dokularda oluşan patolojik değişiklikler dikkatle incelenip, virus hakkında bir bilgi edinmek mümkün olur. Ayrıca devamlı pasajlarla embriyoya adapte edilen viruslar, hastalık yaptığı canlıya karşı patogenitesini kaybettiği halde, bağışıklık verme yeteneğini kaybetmemektedirler. Böylece virusun embriyolu tavuk yumurtasına adapte edilmesi ile aşımali de mümkün olmaktadır.

RESUME

La méthode d'inoculation sur l'oeuf embryo, est une méthode qui s'emploie passablement jusqu'aux derniers ans à cause de procurer l'oeuf embryo aussi bon marché et aussi facile.

L'inoculation des virus sur les oeufs embryos se fait des façons différentes indiquées ci-dessous;

- 1 — İnoculation sur la membrane Chorio - allantoique,
- 2 — İnoculation dans la cavité allantoique,
- 3 — İnoculation dans la cavité amniotique,
- 4 — İnoculation dans le sac vitellin,
- 5 — İnoculation intraveineuse,
- 6 — İnoculation intracérébrale.

Les lésions microscopiques et macroscopiques formés dans l'oeuf infecté par le virus, sont les critères importantes qui permettent l'identification de certaines infections virals. Après la mort d'embryo ou après avoir le tué ou bout d'un temps nécessaire pour l'incubation, il est possible d'obtenir des renseignements sur le virus en examinant attentivement les changements pathologiques se sont produits dans le tissu. Les virus qui sont adaptés à l'embryo aux passages continus perdent leur pathogénités mais ils ne perdent pas leur immunités dans ce cas, il est possible de produire vaccin par adaptation des virus sur l'oeuf embryo.

LİTERATÜR

- 1 — Akman, M. ve Gülmezoğlu, E. (1966) : Tıbbi Mikrobiyoloji (Çeviri). A.Ü. Basımevi, 390.
- 2 — Betts, A.O. and York, C.J. (1967) : Viral and Rickettsial infections of animals, Volume 1. Academic Press. Newyork and London, 102.
- 3 — Can, S. (1972) : Şahsi kominikasyon.
- 4 — Erençin, Z. (1967) : Embriyoloji ders notları.
- 5 — Finci, E. (1965) : Şahsi kominikasyon.
- 6 — Gürtürk, S. (1968) : Viroloji ders kitabı, Veteriner Fakültesi yayınları, No : 233, Ankara Üniversitesi Basımevi, 27-28.
- 7 — Lépine, P. et Sohier, R. (1954) : Techniques de Laboratoire appliquées au diagnostic des maladies a virus, Libraires de l'académie de médecine.
- 8 — Maramorosch, K. and Kaprowski, H. (1967) : Methods in Virology, Volume 1., Academic Press. Newyork and London, 183.
- 9 — Mercant, I.A. and Packer, R.A. (1961) : Veterinary Bacteriology and Virology, 6. edition, Iowa state university press. Ames, Iowa. 716-719.
- 10 — Olive, J.P. (1968) : L'OEUF, Special sur diététique. Gazette Médicale de France, 459.
- 11 — Omurtaş, A.C. (1973) : Viroloji ders kitabı, Eczacılık Fakültesi yayınları, No : 25, Fon Matbaası.
- 12 — Serter, F. (1971) : Klinik Viroloji, Tıp Fakültesi yayınları, No : 86. Ege Üniversitesi matbaası. 45.