

## **KANATLI İNFEKSİYONLARININ SEROLOJİK TEŞHİSİ AMACIYLA KULLANILAN REAKTİFLERİN STANDARDİZASYONU VE AŞI KONTROLÜ (\*\*)**

Doç. Dr. Nejat AYDIN (\*\*)

### **GİRİŞ :**

Serolojik testler, infeksiyöz hastalıkların teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu testlerin popüler olma nedenleri; kan örneklerinin kolay toplanması, testlerin kısa bir süre içerisinde sonuçlandırılması ve sonuçların da genellikle, yüksek spesifitede olmasıdır. İnfeksiyöz hastalıktan salim sertifikasının verilmesi gereken durumlarda serolojik testlere mutlak gereksinim vardır ve genellikle, bu şekildeki uygulama ile pratik bir yaklaşım sağlanabilir. Bununla birlikte kullanılan serolojik testlerle sonuca gidilemediği durumlarda alternatif teşhis yöntemlerinin uygulanma gereksinimi doğar. Diğer taraftan serolojik testlerin usulüne uygun olarak dikkatli bir şekilde uygulanması ve uygulayıcının bu konuda bilinçli olması, sonuçların istenilen şekilde değerlendirilip pratiğe aktarılmasını sağlar. Ancak, klinikçiler çoğu zaman laboratuvar sonuçlarını eleştirerek yorum yaparlar. Bunda; laboratuvardan doğru olmayan sonuçların toplanması, örneklerin alınması ve gönderilmesinden ileri gelen hatalar ve alet hataları gibi faktörler etkili olmaktadır.

---

(\*\*) A.Ü. Vet. Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara - Türkiye

(\* ) 24-27 Nisan 1984'de Pendik Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsünde düzenlenen Hizmet içi Eğitim Seminerinde tebliğ olarak verilmiştir.

Herhangi bir analitik yöntemde test sonuçları gerçek değer in etrafında sıralanır. Önem taşıyan bir sapma testin tipine göre de ği-şiklik gösterir. Bu sapmayı yöntemin kompleks oluşuyla ilgili faktör-ler, reaktiflerin reaksiyon zamanı, pH'sı, ısısı ve iyonik güçleri gibi gerekli kontrol faktörleri de etkiler. Örne ğin; çift katlı sulandırma sisteminde 1/10'luk bir titrede saptanmış bir serum 1/5'ten büyük 1/20'den küçük bir titreye sahiptir. Şayet titrenin daha yakın bir yak-laşımına gereksinim duyulursa di ğer sulandırmaların teste sokulma-sı ve başka bir yöntemin uygulanması gerekir.

Ayrıca kullanılan serolojik testin spesifite ve duyarlılığının da yüksek olması zorunludur. Testin duyarlılığı; tüm infekte hayvanlar için bir testin yetene ğinin ölçümü olarak tanımlanmakta ve şöyle formüle edilmektedir :

$$\text{Duyarlılık} = \frac{\text{Test sonucu pozitif olan infekte hayvanların sayısı}}{\text{Test edilen infekte hayvanların sayısı}} \times 100$$

Bir testin spesifikli ği ise; infekte olmayan tüm hayvanları dışar-da bırakma yetene ği olarak tanımlanmakta veya şöyle formüle edi-lebilmektedir :

$$\text{Spesifite} = \frac{\text{Test sonucu negatif olan infekte olmayan hayvan sayısı}}{\text{Test edilen infekte olmayan hayvan sayısı}} \times 100$$

Ancak bu parametreler içinde, infeksiyonu atlatan fakat antikor taşıyan hayvanların «infekte hayvanlar» grubuna sokulması ya da «infekte olmayan hayvanlar» grubuna sokulması tartışma konusu olabilece ği gibi şüpheli olmayan infekte hayvanların büyük bir po-pulasyonunu teşhis etmenin imkansızlığını da düşünmek gerekir. Ay-rıca infekte olmayan hayvanların tüm populasyonlarını da saptamak zor olabilir veya kros (çapraz) reaksiyonlar araya girebilir. Duyarlı-lığın ve spesifikli ğin düzeyleri duruma ba ğlı olarak de ğişiklik göste-rebilir. Genellikle, % 99 duyarlılıkta ve % 99.9 spesifilikte olan bir test, bir hastalığın eradikasyon kampanyasında de ğerli bir teşhis yöntemi olarak kullanılabilir. Nitekim iyi seçilmiş serolojik bir test, hayvanın infeksiyon etkeni ile daha önceden az da olsa temas etti-ğini ortaya çıkartır. Bu testin yeni bir infeksiyon olup olmadığını, hay-vanın halen infekte olup olmadığını, portör ya da iyileşip iyileşmedi-ğini ve infeksiyon etkenini tamamen elimine edip etmediğini gös-

termesi gerekli olmayabilir. Hastalığın özelliğine göre titrenin değişebileceğini göz önünde tutarak testlerin tekrarlanması düşünülmelidir. Bu arada hayvanın infeksiyon etkeni ile temas etmemesi, kullanılan testin çok az duyarlı oluşu, etkenin zayıf antijenik özellik göstermesi, hayvanın immunolojik yönden yetersiz olması veya toleranslı olması ve infeksiyonun hücresel bir immun yanıtı yol açması gibi faktörler antikor saptanması üzerinde etkili olur. Bu nedenle serolojik sonuçların değerlendirilip yorumlanması kolay olmaz. İnfeksiyonun geçmişi ile birlikte, hastalığın gelişmesi, yaygınlığı patogenezi ve klinik bulgularının da değerlendirmede düşünülmesi gereklidir.

Kanatlı infeksiyonlarının teşhisi amacıyla uygulanan serolojik testler yanında teşhis için kullanılan reaktiflerin de önemli olduğunu unutmamak gerekir. Reaktifler aşı üretiminin kalite kontrolünde, infeksiyonların teşhisinde veya aşı programların düzenlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu reaktifler ve bunlarla ilgili test prosedürleri aşı üretiminde SPF sürülerinin infeksiyondan uzak kalmalarını ve aşıların saflık ve güvenilirliklerini sağlamak gayesi ile kullanılırlar. Hastalığın takibi ve aşıya karşı oluşan immun yanıtı gözlemek için de birçok teşhis laboratuvarları bilinen serolojik testleri kullanmaktadırlar.

Reaktifler spesifitelerini, güvenilirliklerini ve duyarlılıklarını garanti altına alan kurallara göre üretilmeli ve test edilmelidirler.

#### 1) SPESİFİTE :

Reaktiflerin spesifitesinde referens suşun seçimi, kullanılan substratlar, yabancı antijenik maddeler, kontrol serumu ve yakın gelişmelerin önemi bulunmaktadır.

**Referens suşlar :** Antijen hazırlanmasında kullanılan referens bakteri veya virus suşları dikkatli bir şekilde identifiye edilmiş, saflaştırılmış ve karakterize edilmiş olmalı ve pasajlarında özen gösterilmelidir. Yapılan bir araştırmada, araştırmacılar testlerde değişik sonuçlar veren bir IBV antijeni belirlemişler ve inceleme sonucu antijenin başka bir virus içerdiğini saptamışlardır. Bu noktanın önemi, klinik örneklerden veya kültürlerden kaynaklanan yabancı virusların izole edildiğini bildiren raporlarla doğrulanmaktadır. Örneğin; lökosis olgusundan Adenovirus, Marek hastalığı virusundan Retiküloen-

dotelyazis virusu, İnfeksiyöz bronşitis virusundan Newcastle hastalığı virusunun ve Gumboro bir Reovirus'un izolasyonunda olduğu gibi. Parvovirus'lar genellikle kanatlı Adenovirus'ları ile birlikte bulunurlar. Bu nedenle Parvovirus teşhisi için Adenovirus'ların varlığını da ortaya çıkartabilen bir testin kullanılması gerekmektedir.

**Substrat (Materyal) :** Antijen üretilmesinde kullanılan substratın yabancı etkenlerden arınmış olması gerekir. Virusların üretilmesi için genellikle, SPF sürülerden seçilen embriyolu yumurtalar kullanılmalıdır. Mikoplazma, Salmonella, Adenovirus, Reovirus ve lökosis virusları gibi ajanlar tarafından kontaminasyonlar sık sık problemlere yol açmaktadır. Avian ensefalomyelitis virusu, İnfeksiyöz bronşitis virusu ve Newcastle virusu için de aynı durum söz konusudur, Embryolardan hazırlanan hücre kültürleri yumurta ile geçen kontaminantları taşıyabilirler. Buna karşın civcivden hazırlanan kültürler ayrıca Marek hastalığı virusu gibi lateral olarak bulaşabilen ajanları da taşıyabilirler. Hücre kültürlerinde kullanılan serum ve tripsin de kontaminat virus ve bakterilerden arındırılmış olmalıdır.

Bazı durumlarda, antijeni *invivo* olarak hazırlamak gerekebilir. Örneğin; İnfeksiyöz bronşitis virusunun hücre kültüründeki üremesinin agar jel difüzyon testinde kullanılmak üzere hazırlanacak antijen için yetersiz olduğu bildirilmiştir. Ayrıca saha salgınlarından elde edilen materyalin de antijen hazırlanmasında kullanılması sakıncalıdır. Zira böyle bir materyal, diğer etkenleri de içereceğinden testlerde kros reaksiyonlara ve yanlış sonuçlara neden olabilir. Örneğin; Gumboro antijeninin hazırlanması için SPF tavukların bursa fabrisius'u ve Hemorajik enteritis virusundan antijen hazırlamak için de SPF tavukların dalağı kullanılmalıdır.

**Yabancı Antijenik Maddeler :** Bazı virusların üretilmesi ve aşı hazırlanması vs. sırasında ortama sığır serumu katılmaktadır. Böyle materyaller test edildiğinde hatalı sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle antijen hazırlanmasında serum kullanmaktan sakınmalı veya mümkün değilse antijen dikkatli bir şekilde yıkanarak serum konsantrasyonu minimum düzeye indirilmelidir. Şayet tavuk hastalıklarının teşhisi amacıyla kullanılan reaktifler arasında sığır serumu kullanılıyor ise bu noktayı unutmamak gerekir.

Araştırmalara göre; SPF tavuklardan ve saha sürülerinden elde edilen serumda, Marek antijeni içinde bulunan triptoz fosfat buyyon

ile agar jel diffuzyon testinde reaksiyon veren ayırt edilemeyen bir faktörün bulunduğu bildirilmiştir.

**Kontrol Serumları :** Testlerde kullanılacak pozitif ve negatif kontrol serumlarının hazırlanışında da dikkatli olunmalıdır. Normalde, antiserum hazırlanmasında kullanılan antijenle testlerde kullanılan antijenin aynı olmaması gerekir. Şayet aynı antijen kullanılacak olursa antijenle birlikte bulunan her kontaminant antikor yapımını uyararak pozitif kontrollerde yalancı reaksiyona neden olabilir.

Serum hazırlamak için kullanılan antijen mümkün olduğu kadar saf olmalıdır. Tavuklar, inokulum içindeki hücre kültürü materyaline karşı saptanabilir düzeyde anti-tavuk antikorları oluşturmadıkları halde besiyeri artıklarına karşı antikor oluşturabilmektedirler. Bundan sakınmak için canlı haldeki inokulum topikal yolla uygulanmalıdır. Virusların çoğu göze veya buruna damlatılarak infeksiyon oluşturulabilir. Antijen bu yolla uygulandığında sadece virusa karşı immun yanıt oluşmakta fakat, artıklara karşı oluşmamaktadır.

Pozitif kontrol serumunun spesifitesi hazırlama yöntemine göre artırılabilir. Sekonder uyarımdan sonra veya adjuvant içinde antijen verilmesiyle elde edilen antiserumun spesifitesi tek dozla elde edilen antiserumdan daha geniştir. Bazen de pozitif kontrol serumlarının tavşan veya keçi gibi hayvanlarda hazırlanması önerilmektedir. Zira bu hayvanlar kanatlı patojenlerine karşı doğal antikorlara sahip değildirler. Buna rağmen böyle hayvanlar inokulumdaki embryo veya hücre kültürü materyaline karşı anti-tavuk antikorları oluşturabilirler.

Testlerde kullanılmak üzere negatif antiseruma da gereksinim vardır. Bu da pozitif seruma benzer yolla hazırlanır. Ancak pozitif antijenin bakteri ve virus dışındaki tüm komponentlerini içeren negatif bir antijen kullanılır.

Antijen ve antiserum, diğer tüm antijen ve antiserumlarla kontrol edilerek kros reaksiyon olup olmadığı incelenmelidir. Ayrıca bunlar, hazırlanan suşun varyantları ile de test edilerek kullanılan testin aktivitesi belirlenmelidir. Birçok kanatlı patojenlerinde serotiplerin önemi vardır. Bazı testler grup spesifik antikorları belirlemesine karşın, bazıları serotip spesifik veya suş spesifik antikorları belirler.

**Yakın Gelişmeler :** Yakın zamanlarda elde edilen yenilikler ve gelişmeler izlenmelidir. Örneğin; rekombinant DNA ve monoklonal

antikor teknikleri ile sınırsız sayıdaki reaktifler çok spesifik olarak elde edilebilecektir.

## 2) DUYARLILIK :

Reaktiflerin elde edilmesi ve uygulamaya sokulmasında değerlendirme, uygun prosedürler ve standardizasyonun önemi vardır.

**Değerlendirme (Kalibrasyon) :** Kalitatif testler için testin duyarlılığı, gerçek pozitiflerin çoğunluğunun saptanmasına dayandırılır. Şayet tüm pozitif olguları saptamak gerekliyse testin duyarlılığı; bazı testlerin non-spesifik veya yanlış pozitif sonuç verebileceği bazılarınin ise, net bir ayırım yapabileceği esasına göre ayarlanmalıdır.

Antijenin konsantrasyonu genellikle, testin duyarlılığını etkiler. Şayet yoğunluğu düşükse yüksek titreler, fazlaysa hatalı negatif sonuç alınabilir. Bazı testlerde antijen yoğunluğu ile antikor titresi arasında direkt bir ilişki bulunmaktadır. Diğer taraftan kalitatif testlerde, pozitif kontrol serum sahadan elde edilen serumun özelliklerini içermeli ve adjuvantsız olarak tek doz inokulasyon ile hazırlanmalıdır. Kantitatif testlerde pozitif serum bilinen titrede almalıdır.

**Uygun Prosedürler :** Test prosedürü mutlaka standartize edilmelidir. Bu amaçla, yayınlanmış yaygın yöntemler tercih edilmelidir. Test sonuçlarının ısı, inkubasyon süresi, kullanılan playtlerin tipi, dilüsyon yöntemi ve son noktanın seçimi gibi faktörlerden etkilenebileceğini unutmamak gerekir. Sonuçları aynı zamanda kullanılan komplement ve kan gibi materyallerin konsantrasyonu da önemli ölçüde etkiler.

**Standardizasyon :** Testlerin standardizasyonu için gerekli olan özellik, standart bir pozitif serumun kullanılmasıdır. Mümkünse uluslararası veya ulusal bir standart ile değerlendirme yapılabilir. Böyle bir serum antijen yoğunluğunun saptanmasında ve test serumunun titresini etkileyen faktörlerin bulunmasında yararlı olur. Test serumunun uluslararası ünitelere göre titre edilmesi sağlanır. Böylece değişik laboratuvarlar tarafından değişik kriterlerde sonuçların elde edilmesi önlenir ve hepsi ortak bir birim ile ifade edilir. Böyle standart serumların elde edilmesi mümkün değilse, uygun titrede çok miktardaki antiserum hazırlanarak, uygun miktarlarda ve titrenin düşmeyeceği koşullarda saklanır. Buna ek olarak diğer bir kalite

kontrol uygulaması da, çeşitli laboratuvarların belirli serumlarla periyodik testleri işlemesi ve sonuçları karşılaştırmasıdır.

### 3) GÜVENİLİRLİK :

Mümkünse, antijen attenué bir suşla hazırlanmalı ve antijenik yapısı etkilenmeyecek şekilde inaktive edilmelidir. Özellikle, eksojen patojenlerden arındırılmış olmalıdır. S. gallinarum ile kontamine bir S. pullorum antijeninin kullanılmasından sonra tifo olgusunun ortaya çıktığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Ayrıca kontaminasyon şansını azaltmak için araç ve personelin kontrolüne dikkat edilmelidir. Reaktifler ve diğer materyaller kolaylıkla ayırtelebilecek şekilde özenle işaretlenmelidir.

### UYGULAMADAKİ TEST TİPLERİ

**1 — Agar-jel presipitasyon testi :** Bu test genellikle, antikorların belirlenmesinde kullanılır. Influenza-A infeksiyonlarında, agar-jel presipitasyon antijeni tüm tip A suşlarında bulunan ortak antijen reaksiyonu verdiğiinden HI testinden kullanışlıdır. Gumboro antikorlarının belirlenmesinde test oldukça duyarlıdır. Bu test Marek'te ve Newcastle'da HI yerine kullanılabilir. Test Adenovirus ve Reovirus'ların grup antijenlerinin saptanmasında da kullanılabilirse de çok duyarlı değildir.

Agar-jel presipitasyon testi ayrıca, bursa fabrisus'ta antijen bulunması halinde Gumboro, kanda antijenin bulunduğu durumlarda Retikuloendotelyazis ve Pasteurellosis ve tüy follüküllerinde antijen bulunması halinde Marek hastalığının teşhisinde kullanılabilir. Diğer taraftan bu test, doku kültüründe İnfeksiyöz laringotraheitis ve Adenovirus üremesinden sonra lize hücreler kullanılmak suretiyle de uygulanabilir.

Agar-jel presipitasyon testi basit, çabuk ve ekonomik olduğu için popüler bir testtir. Buna rağmen çok duyarlı testlerin yanında tercih edilmez. Testin en çok kullanılan şekli çift yönlü diffüzyon tekniğidir. Çift yönlü diffüzyon tekniğinde tavuk serumu işlenirken agarda yüksek tuz konsantrasyonu (% 8'e kadar) gerektiği halde diğer kanatlı serumlarının işlenmesinde bu orana gerek yoktur. Bu testin duyarlılığı; çukurun boyutlarından, derinliğinden ve boşluğundan etkilenir. Antijen konsantrasyonu testi etkilemezse de iyi bir çiz-

gi görmek için yeterli antijen bulunmalıdır. Antijen olarak parçalanmış virus kullanmak daha iyidir. Zira agarda daha iyi diffuze olur. Bazı durumlarda antijenin konsantre olması gerekebilir. Test serumunun bulunduğu her çukurun yanındaki bir çukura pozitif kontrol konulması testin duyarlılığını artırır. Bazı durumlarda, özellikle, yaşlı kanatlıların serumlarındaki lipidlerden dolayı non-spesifik bir presipitasyon çizgisi görülebilir. Şayet antijeni konsantre etmek için poli etilen glikol kullanılıyorsa agarda prezervatif olarak kullanılan fenol ile reaksiyon verebilir. Ayrıca testin değerlendirilmesinde dikkatlice presipitasyon çizgilerinin varlığı incelenmelidir.

**2 — Aglutinasyon Testi :** Bu test Salmonella ve Mycoplasma antikorlarının belirlenmesi amacıyla kullanılır. Test kalitatif olarak çabuk lam testi şeklinde, kantitatif olarak ise tüp testi şeklinde uygulanabilir. Mycoplasma yönünden yapılan çalışmalarda şayet serum dondurulmuşsa, kontamine olmuşsa veya kanatlılara çeşitli aşılar uygulanmışsa non-spesifik reaksiyonlar görülebilir.

**3 — Hemaglutinasyon İnhibisyon Testi :** Bu test; Newcastle, İnfeksiyöz bronşitis, Egg Drop Syndrom'76, Adenovirus, İnfluenza virusu ve Mycoplasma türlerine karşı oluşan antikorların saptanmasında kullanılır. Mycoplasma ve İnfluenza'da antijen geniş bir serotip popülasyonundan hazırlanmalıdır. İnfeksiyöz bronşitis'in tüm suşları test için uygun değildir. Bu testin duyarlılığında antijen ve eritrosit konsantrasyonu etkili olmaktadır.

**4 — Passif Hemaglutinasyon :** Bu testin pek kullanım alanı yoktur.

**5 — Komplement Fiksasyon :** Tavuk serumu kobay komplementini fikse etmediği için test tavuklarda kullanışlı değildir. Bu nedenle testte, ısıtılmamış, taze normal tavuk serumu kullanılmalıdır. Komplement fiksasyon testinin İnfeksiyöz bronşitis, Marek, Newcastle ve Löykozis teşhisinde uygulandığı bildirilmiştir. Ayrıca Cofal testi löykozis virusunun grup spesifik antijenlerinin saptanmasında kullanılmaktadır.

**6 — Nötralizasyon Testi :** Bu test embroyolu yumurta, doku kültürü ve zaman gerektiren bir testtir. Aslında test çok duyarlıdır ve uzun bir periyot içinde oluşmuş antikorları saptar. Kanatlı Adenovirus'larının ve Reoviruslarının birçok değişik serotipleri bu testle belirlenmiştir.



**7 — ELİSA Testi :** ELİSA testi çok duyarlı bir testtir. Fakat özel ekipmana gereksinim gösterir. Testte kullanılan kitlerin hazırlanması zordur ancak, ticari olarak sağlamak mümkündür. Ayrıca ELİSA çok basamaklı bir işlemdir, bu nedenle her basamağın spesifiteninin belirlenmesi için önceden kontrolleri gerektirir. Bu test ile doku kesitleri ve hücre kültürleri içindeki antijenler de saptanabilir. Kanatlı löykozis virüsü, Tavuk çiçeği ve Derzsy hastalığı Parvo virüsü ile immunoperoksidaz testi uygulamaları bildirilmiştir.

**8 — Floresan Antikor Testi :** Bu test de çabuk sonuç veren duyarlı bir testtir. Fakat özel mikroskop gerektirir. Antijen veya antikorun saptanması amacıyla kullanılabilir. İndirekt testle kullanılan antiserum ticari olarak sağlanabilir. Trahea'dan yapılan sürme preparatlarındaki virüslerin ve kanatlı Reovirus'larının saptanmasında bu testten yararlanılmaktadır. Testin değeri kanatlı dokularında bulunan antijenin miktarına göre değişir. Bazı infeksiyonlarda diğer testlere göre üstündür. Bu test de çok aşamalı bir işlemi gerektirir. Testin uygulanışında pozitif ve negatif kontrol substratları ile serumlarının da işlenmesi gerekir.

**9 — Radyo immunoassay :** Antijen veya antikor teşhisinde kullanılan bu test oldukça duyarlıdır. Fakat özel ekipmanlar gerektirdiğinden çok sık kullanılmaz. Newcastle için uygulaması bildirilmiştir.

**10 — İmmun Elektron Mikroskopi :** Bu test, spesifik antikorlar ile kümeler oluşturan virüsleri belirlemek amacıyla kullanılır. Bilinmeyen veya daha önceden tanımlanmamış mikroorganizmaların ya da virüslerin belirlenmesi, antikor oluşmuş yaşlı sürülerden alınan serum kullanılarak gerçekleştirilebilir.

#### STANDART REAKTİFLER

Günümüzde teşhis amacıyla uygulamada kullanılan ticari olarak hazırlanmış reaktifler bulunmaktadır. Özellikle, *S. pullorum* ve *Mycoplasma* türlerinin saptanmasında kullanılan testler ve ender olarak ta bazı kanatlı hastalıklarının Agar-jel presipitasyon teşhisinde kullanılmak üzere hazır antijenler bulunmaktadır. Aynı şekilde standardize edilmiş antiserumlar da vardır.

Referens serumlar veya uluslararası standartlar, ulusal standartları kurmak için sınırlı miktarda ve ücretsiz olarak Weybridge Merkez Veteriner Laboratuvarından sağlanabilmektedir.

Uluslararası bazı standart referensler arasında anti-S. pullorum serumu, anti-Newcastle serumu, anti-M. gallisepticum serumu bulunmaktadır. Bunların da hazırlanışları özetle :

**a) Anti-S. pullorum serumu için internasyonal standartlar :** Aglutinasyon testinin standardizasyonunda; standart ve varyant suşlardan ibaret iki serum amaçlanmıştır. Bunlar 1000 İ.Ü. lik ampullerde hazır duruma getirilmiştir. Bu serumlar antijeni standardize etmek amacıyla kullanılabilir. Burada esas her serumun 0,5 İ.Ü. içeren 0,5 ml.sinin eşit miktardaki antijen ile 35-40°C de 1 dakika içinde oda ısısında % 50 aglutinasyon oluşturmasıdır.

**b) Anti-Newcastle serumunun hazırlanışında İnternasyonal referens :** Bu hazırlanışa, HI testinin standardizasyonunda kullanılmaya amaçına yöneliktir. Antijen konsantrasyonunun ayarlanmasında, test koşullarının sabitleştirilmesinde ve test serum değerlerinin İ.Ü. birimi ile ifade edilmesinde başvurulabilir.

**c) Anti-M. gallisepticum serumunun hazırlanışında uluslararası referens :** Bu protokol, aglutinasyon ve HI testlerini standardize etmek için kullanılabilir. Antijen konsantrasyonu, testin sabitleştirilmesi ve sonuçların İ.Ü. ile ifade edilmesinde bu protokolden yararlanılır.

Bunlardan başka standart referensler de bulunmaktadır.

### **AŞILARIN KONTROLÜ**

Diğer biyolojik maddelerde olduğu gibi aşılarda kalitesi, ilk aşamadan başlayarak uygulamanın her aşamasında ve bitmiş durumda olan son ürün halindeyken kontrol edilmelidir. Aşıların immunojenik kontrolleri, karakterlerinin kontrolü, mikrobiyel ve kimyasal kontrolleri gerekli olduğundan yetişmiş ve kalifiye elemana da gereksinim vardır.

Aşılar başlıca; istenmeyen veya beklenmeyen reaksiyonları oluşturmadığını saptamak, üretim kontrolünün devamlı etkinliğini sağlamak ve her bir serinin kabul edilen tolerans limitleri içinde orijinaline benzemesinin kontrolü amacıyla test edilmektedir.

Aşı kontrolünde test sayısı aşının risk durumuna, ekonomik görüşler ve etkinliğinin kontrolü için gerekli masrafa göre değişir. Ancak çok pahalı testler kullanmak gereksizdir. Yeni aşılarında ilk test-

ler genellikle, laboratuvarında ve muhtemelen laboratuvar deney hayvanlarında yapılır. Ancak burada duyarlı hayvanların seçimi önem taşır.

Aşıların genellikle, çalışıp çalışmadığının alanda kontrol edilmesi gerekir. Ayrıca ters ve olumsuz durumları da sahada kolayca saptamak mümkündür. Diğer taraftan hayvanlar arasında varyasyonların bulunması da aşının test edilmesini sınırlamaktadır. Canlı aşılarında potens ve zararsızlık kontrolleri yanısıra, diğer önemli nokta da, pasajlarda virulansın artması ve aşılanmamış hayvanlar arasında yayılmasıdır.

Aşı kontrolünde rutin olarak uygulanacak işlemler arasında; kontaminasyon ve yabancı patojenler yönünden tohum kültürlerinin, embriolarının ve hücre kültürlerinin kontrolleri, üretim sırasında ise inaktivasyon ve antijen içeriklerinin kontrolü ve son ürünün de potens, zararsızlık, kontaminasyon ve dayanıklılık testleri bulunmaktadır. Liyofilizasyon araç ve işlemlerinin iyi test edilmesi gereklidir. Burada rutubet içerikleri ve iyi vakum olup olmadığının kontrolü önemlidir.

**1 — Sterilite Testi :** Hem üretimin başlangıcında hem de son ürün üzerinde sterilite kontrolleri yapılır. Küçük örnekler üzerinde yapılan strilite testleri son ürünün steril olacağını garanti etmez. Sterilite kontrolleri iyi malzeme bulunan ve tecrübeli elemana sahip laboratuvarlarca yapılır. Kontaminasyon varsa bunun derecesi saptanabilir. Kontaminasyon kontrolü için 2-3 uygun besi yeri kullanılır. Ayrıca laboratuvardaki herşeye kontaminasyon yönünden özen gösterilir ve gerekli önlemler alınır.

**2 — Yabancı Patojenler için Test :** Ürünün yabancı patojenlerden arıtılmış olması çok önemlidir. Bu amaçla genellikle, en fazla bulunabilen ve tehlikeli olan patojenleri saptamak için en duyarlı ve ekonomik testler kullanılmalıdır.

İnaktif aşılar, aktif olanlardan daha az risk taşırlar ve kullanılan inaktivan madde de non-spesifiktir. Buna karşılık özellikle tavukların canlı aşıları yumurta ve doku kültürlerinde hazırlandıklarından patojenik olan diğer etkenlerle kontaminasyon her an mümkün olabilmekte ve tehlikeli de olmaktadır. Burada patojenleri saptamak için gereken her şey yapılır ve pahalı yöntemler uygulanır. Aşının kontrolü yapılırken sürünün de kontrolü gereklidir. Öncelikle sürünün çeşitli hastalıklardan salim olması şarttır, Zira bunlardan alı-

nan yumurta ve hücre de kontamine olmuş olur. Ayrıca serumlarının da antikorlar yönünden kontrolü gereklidir.

**3— Potens Testi :** Aşıların saha koşullarında da etkili olduğu ve bunun her seri için böyle olması önemlidir. Bu durum üretimin her aşamasının kontrolü ve tohum virus ya da bakterisinin iyi test edilmiş olması ve böyle suşların kullanılması ile mümkündür. Test aşılı hayvanlar üzerinde epruvasyon suretiyle yapılır. Ekonomik nedenler düşünülerek bu işlem laboratuvar deney hayvanlarında da gerçekleştirilebilir. Fakat kanatlı aşıların potens kontrolü tavuklar üzerinde yapılır. Bazı aşılarda antikor cevabı da aşıların immunojenitesinin değerlendirilmesinde indirekt olarak başvurulan bir yöntemdir. Ayrıca laboratuvar da yapılan testin saha koşullarına uydurulması da önemlidir. Bu korelasyonu sağlamak için uygun testler üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Canlı aşıların özellikle, viral aşıların problemleri fazladır. Bunlar aşılanmış hayvanlarda da ürerler ve geniş dozlar kullanılmasını gerektirir ve böylece aşıların duyarlılığında da azalmalar olur. Sabit virus dozlarının kullanılması bugün birçok aşılar da geliştirilmektedir.

**4 — Antijen İçeriğinin Kontrolü :** Aşıların etkin olabilmesi için yeterince antijen içermesi ve antijenin de immunojenik özelliklerinin iyi kalitede olması gereklidir. Canlı bakteri aşılarında sayım besi yerlerinde viruslarda ise, doku kültürü ve embriyolu yumurtalarda yapılır. İnaktif aşılar da (Bakteriyel) opasite testi ve gerekirse spesifik antiserumlarla reaksiyon yapılabilir.

**5 — Zararsızlık Testi :** Aşıların, üretimi sırasında herhangi bir toksik özellik kazanmadığı her serinin uygun deneme hayvanlarına verilmek suretiyle denenebilir. Bu işlem birkaç hayvan üzerinde kendi konakçısında da yapılır. Bu, ya aşılama dozu veya bu dozun birkaç katı miktardaki dozlarla gerçekleştirilir.

**6 — Dayanıklılık Testi :** İyi bir aşı bekletilme, taşınma koşulları ve liyofilize haldeyse sulandırıldığında etkinliğini kaybetmemelidir. Zira, bu dayanıklılık üretim hataları vs. büyük ölçüde etkiler. Bu durumda çeşitli saklama koşullarında (+4°C buzdolabı, oda ısısı, 37°C ve taşınma koşulları vs). potens testleri uygulanarak aradaki farklar saptanır. Lizyofilize aşılar da kontrol işlemlerinde dikkatli olunmalıdır. Özellikle Marek virusu çok labil bir etken olduğundan taşıma koşullarında, sulandırmadan sonra vs. birçok aşamalarda kontrollerin yapılması gerekli olmaktadır.

## SONUÇ

Yukarda kısaca önemini vurgulamaya çalıştığımız standart reaktifler ve aşı kontrolü teşhis yönünden olduğu kadar hastalıklardan korunma ve eradikasyonda büyük kolaylıklar ve yararlar sağlamaktadır. Serolojik testlerde standardize edilmiş reaktiflerin kullanılması bu testlerin daha güvenilir olmasını ve laboratuvarlar arasındaki verilerin de doğru olarak karşılaştırılmasını mümkün kılmaktadır. Diğer taraftan hastalıkların teşhisi için yükselen titreler gösterildiği gibi etken izolasyonuna da gidilebilir. Daha önceden olan bir hastalık olgusundan, aşılardan veya bazı özel ajanlardan (Adenovirus, Reovirus gibi) ileri gelen antikoları göz önünde tutmak gerekir. Serolojik testlerin uygulamasında serum ve antijenlerin standart preparatları için çok dikkatli olunması zorunluluğu vardır. Ayrıca belirli çalışma yöntemleri ile sahadaki problemlerin de spesifik teşhisinde büyük yarar bulunmaktadır. Diğer taraftan aşılarda kalite kontrol yöntemleri şayet standardize reaktiflerle gerçekleştirilebilirse güvenilirlik daha da artar. Ayrıca aşılarda kontrol edildiği gibi testler de çeşitli standartlarla kontrol edilmelidir. Özellikle, potens testlerinde kullanılan deneme hayvanının yaşı, cinsi, cinsiyeti, beslenme koşulları, genetik yapısı ve çevresel faktörler etkili olur. Bu nedenle bu hayvanların standart olarak aynı ırk aynı yaş, aynı ağırlıkta, cinsiyette vs. olmaları ve özellikle SPF özellik taşımaları tercih edilir.

## KAYNAKLAR

- 1 — ANONİM (1977) : Specifications for the Production and control of Avian Live Virus Vaccines, Ministry of Agriculture Fisheries and Food, Sec. Ed, Biological Prod. and Stand. Dept, Control Vet, Lab. Weybridge, Surrey.
- 2 — BAINS, B.S. (1979) : A Manuel of Poultry Diseases. Editiones «Roche», F. Hffmann-La Roche and Co. Ltd, Comp. Basle, Switzerland.
- 3 — BAŞKAYA, H. ve MİNBAY, A. (1979) : Kümes Hayvanları Hastalıkları. A.Ü. Vet. Fak. Yay., 354. Ders Kitabı, 252. A.Ü. Basımevi-Ankara.
- 4 — DAVIDSON, I. (1975) : Testing Veterinary Vaccines. Vet. Rec, 97, 389-392.
- 5 — GORDON, R.F. (1969) : Pathologie des Volailles, Traduit de L'Anglais par p. d'Autherville, Malone S.A, Editeur. Paris.
- 6 — THORNTON, D.H. and ALLAN, W.H. (1983) : Standardization of Reagents for Serological tests to Detect Infections in Poultry. World Poultry Sci. J, 39, 229-237.
- 7 — WORTHINGTON, R.W. (1982) : Serology as an aid to Diagnosis : Uses and Abuses, N.Z. Vet. J, 30, 93-97.