

I. EGG DROP SYNDROME - 1976 (EDS'76)'YA KARŞI AŞILI VE AŞISIZ TAVUKLARIN YUMURTA SARISI VE SERUMLARINDAKİ ANTİKORLARIN HEMAGLUTİNASYON - İNHİBİSYON (HI) TESTİ İLE BELİRLENMESİ

Ömer AKAY (*)

Müjgan İZGÜR (**)

Hatice AYHAN (***)

G İ R İ Ş

Tavuk yetiştiriciliğinde hayvan popülasyonunun çok fazla olması, hastalıklara karşı alınacak önlemleri ve sürü sağlığının etkin bir şekilde kontrol altında tutulmasını güçleştirmektedir. Yetiştirme şekli ne olursa olsun belirli enfeksiyöz hastalıklara karşı hayvanları korumak ancak aşılama yolu ile olmaktadır. Bugün, özellikle, tavuklarda gözlenen viral hastalıklardan korunmada en önde gelen önlem, hayvanların aşılanmasıdır. Ancak, aşıli bir sürüde aşının hangi düzeyde bağışıklık meydana getirdiğini saptamak her zaman mümkün olamamaktadır. Bu kontrollerin yapılması ve sürü bağışıklığının ortaya konması için, hayvanlardan teker teker kan alınması ve ayrıca alınan bu örneklerin sürüyü temsil edecek sayıda bulunması gerekmektedir. Bu nedenlerle, bazı araştırmacılar hayvanların bağışıklık durumlarını belirlemede kan serumu yerine yumurta sarısının kullanılmasının geçerliliği üzerinde durmaktadırlar (15, 17, 18).

Enfeksiyöz hastalıklara karşı yumurta sarısındaki antikörlerin saptanması amacıyla sınırlı sayıda da olsa çeşitli ülkelerde çalışmalar yapılmıştır (2, 7, 15, 17, 19). Araştırmacılar, Newcastle (15, 17), İnfeksiyöz bronşitis (15), Mycoplasma gallisepticum (11, 15), Pul-

(*) Doç. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Bakteriyoloji Bilim Dalı, Ankara.

(**) Yrd. Doç. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Bakteriyoloji Bilim Dalı, Ankara,

(***) Uzm. Bio., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Bakteriyoloji Bilim Dalı, Ankara.

lorum (10) ve Egg-Drop-Syndrome-1976 (2, 9, 14, 18) gibi enfeksiyonlarda, yumurta sarısında bu hastalıklara karşı oluşan antikorların varlığını çeşitli serolojik testlerle ortaya koymuşlardır.

Egg Drop Syndrome - 1976 (EDS'76), yumurta dönemindeki tavuklarda görülen yumurta veriminde düşme, kabuk kırılması, yumuşak kabukluluk, kabuk pigmentasyonunun kaybolması ve şekil bozukluğu ile karakterize bir hastalıktır (13, 18, 19). Bu sendrom'un teşhisi ve aşılama sonucu serum (4, 5, 6, 8, 12) ve yumurta sarısında (9, 14, 18) oluşan antikorların saptanması amacıyla değişik serolojik testler kullanılarak çalışmalar yapılmıştır (2, 3, 8, 14, 18). Yamaguchi ve ark. (18), Rhode Island yumurta tavuklarını EDS'76 JPA-1 suşu ile oral yolla enfekte etmişler ve inokulasyonu takiben 10. günde serumda HI, 14. günde ise bu virusa karşı yumurta sarısında HI ve AGP antikorlarını belirlediklerini, enfekte edilmeyen hayvanların hem serum ve hem de yumurta sarılarında antikor saptayamadıklarını, Amaro ve ark. (2), parent ve grand parent sürülere ait damızlık için uygun olmayan yumurtaların sarılarında EDS'76 virusuna karşı HI antikorlarını belirlediklerini açıklamışlardır. Piela ve ark. (14) 25 haftalık 30 adet Golden Comet yumurta tavuklarını Adenovirus 127 benzeri bir suşla enfekte ederek yaptıkları çalışmada; enfeksiyondan bir hafta sonra tavukların kan serumunda HI antikorları saptadıkları halde bu sürüde yumurta sarısında antikor belirleyemediklerini, 2. hafta sonunda ise sarıda antikor tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Bu çalışmanın amacı, EDS'76'ya karşı aşılanmış ve aşılanmamış tavukların serum ve yumurta sarılarındaki antikorları HI testi ile saptamak ve yumurta sarısının serum yerine kullanılıp kullanılmayacağını ortaya koymaktır.

M A T E R Y A L V E M E T O T

Yumurtalar : Denemede kullanılan Egg Drop Syndrome-76'ya karşı aşıllı ve aşısız hayvanlara ait yumurtalar Ankara Üniversitesi Bakteriyoloji Bilim Dalı deneme hayvanları ünitesinden ve piyasadadan sağlanmıştır. Çalışmada, 150 aşıllı ve 150 aşısız tavuğa ait yumurta kullanılmıştır.

Serumlar : Denemede, EDS'76'ya karşı aşılı tavuklara ait 150 ve aşısız tavuklara ait 150 serum örneğinden yararlanılmıştır.

Mikroplate'ler : Çalışmada kullanılan virusun HA titresini saptamak, aşılı ve aşısız hayvanlara ait serum ve yumurta sarılarındaki antikorları ortaya koymak için yapılan HI testlerinde Greiner firmasına ait altı yuvarlak mikroplate'ler kullanılmıştır.

Virus : Çalışmada kullanılan Egg Drop Syndrome-76 (EDS'76) virusu (D-suşu), Dr. Young Ok Rhee, Kore'den temin edilmiştir.

Embryolu yumurtalar : Virusun üretilmesi amacı ile kullanılan embryolu ördek yumurtaları A.Ü. Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümünden sağlanmıştır.

Virusun üretilmesi : Bu amaçla, 11 günlük embryolu ördek yumurtalarının koryoallantoik boşluğuna EDS'76 virusu inokule edilmiş ve yumurtalar 37°C'de 6 gün inkube edildikten sonra koryoallantoik sıvıları toplanmış (16) ve çalışmada kullanılmıştır.

Yumurta sarısının hazırlanması : Yumurta sarıları, Yamaguchi ve ark. (18)'nin bildirdikleri yöntemle göre hazırlanmıştır. EDS'76 aşılı ve aşısız hayvanlara ait yumurtalar steril koşullar altında açılarak sarıları ayrılmış, 1 ml sarı 1 ml (1:1 v/v) PBS ile homojenize edilmiş ve karışımın 1 ml'sine 2 ml kloroform (Merck) katılarak (1:2 v/v) 1 saat oda derecesinde tutulmuştur. Bu süre sonunda süspansiyon 4000 rpm.de 10 dakika santrifüje edilmiş ve üst sıvı HI testinde kullanılmıştır.

HA testi : Bu test, Piel'a ve ark. (15)'nin bildirdikleri yöntemle göre mikroplate'lerde yapılmıştır. Çukurlara önce 0.025 ml FTS konmuş, birinci çukura 0.025 ml virus ilave edildikten sonra otomatik diluterde (Dynatech - Microtiter) 1/2'den başlamak üzere 1/32768'e kadar sulandırılmıştır. Daha sonra tüm çukurlara 3 kez yıkanmış % 2'lik tavuk eritrositlerinden 0.025 ml konmuş ve çalkalayıcıda (Microshaker AM69) bir dakika çalkalandıktan sonra oda derecesinde 40 dakika tutulmuş ve sonuçları değerlendirilmiştir.

HI testi : Bu test, Piela ve ark. (15)'nin bildirdikleri yönteme göre serum ve kloroform ile ekstre edilmiş yumurta sarıları ile yapılmıştır. Bu iki uygulamada da aynı yöntem kullanılmıştır.

Mikroplate'lerin çukurlarına önce 0.025 ml FTS konmuş, daha sonra birinci çukura 0.025 ml serum veya yumurta sarısı ilave edilmiş ve otomatik diluterle 1/2'den başlamak üzere 1/4096'ya kadar sulandırmaları yapıldıktan sonra 4HA ünitesinde sabit tutulan EDS'76 virusundan 0.025 ml çukurlara konarak oda derecesinde 20 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüm çukurlara % 2'lik eritrositlerden 0.025 ml ilave edilmiş ve 40 dakika oda derecesinde tutulduktan sonra sonuçlar değerlendirilmiştir.

B U L G U L A R

HA test sonuçları : Denemede kullanılan EDS'76 virusunun HA titrelerini saptamak amacıyla, mikrotiter plate'lerinde test dört kez tekrarlanmış ve titre 1/2048 olarak belirlenmiştir.

HI sonuçları :

Aşısız tavuklara ait serum sonuçları : Çalışmada, aşısız tavuklara ait 150 adet serumdan 138'i negatif sonuç verirken, 9'u 1/8 ve 3 tanesi de 1/16 titre göstermiş ve bu hayvanlara ait ortalama titre \log_2 HI 0.26 olarak belirlenmiştir (Tablo-1).

Aşısız tavuklara ait yumurta sarısı sonuçları : Aşısız tavuklara ait 150 yumurta sarısı ile yapılan HI testinde, tüm yumurta sarıları negatif sonuç vermiş, ortalama titre \log_2 HI 0 olarak saptanmıştır (Tablo-1).

Aşılı tavuklara ait serum sonuçları : Aşılı tavuklara ait 150 serum -5 ile -13 arasında değişen HI titreleri göstermiş ve ortalama titre \log_2 HI 8.7 olarak belirlenmiştir (Tablo-2).

Aşılı tavuklara ait yumurta sarısı sonuçları : Aşılı hayvanlara ait 150 yumurta sarısı -3 ile -11 arasında değişen HI titreleri göstermiş ve ortalama titre \log_2 HI 6.97 olarak saptanmıştır (Tablo-2).

TABLO 1 : Aşısız tavuklara ait serum ve yumurta sarıları ile yapılan HI test sonuçları

Test edilen örnek	Titreler			Ortalama titre
	Negatif	-3	-4	
Serum	138	9	3	0.26
Yumurta sarısı	150	—	—	0

TABLO 2 : Aşılı tavuklara ait serum ve yumurta sarıları ile yapılan HI test sonuçları

Test edilen örnek	Negatif	Titreler											Ortalama titre
		-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10	-11	-12	-13	
Serum	—	—	—	5	11	21	31	31	29	15	6	1	8.7
Yumurta sarısı	—	8	11	20	21	28	25	20	11	6	—	—	6.97

TARTIŞMA

Egg Drop Syndorme-1976 (EDS'76)'ya karşı oluşan antikorlar değişik serolojik reaksiyonlarla saptanabilmektedir (1, 2, 14, 15, 18). Bu serolojik reaksiyonlar arasında en çok kullanılanı HI testi olup, testin güvenilir sonuçlar verdiği araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur (1,9, 15). HI testi, serum ve yumurta sarısındaki antikorları belirlemede kullanılmakta, ancak oluşan bu antikorlar değişik sürelerde ortaya çıkmaktadır. Bu konuda çalışma yapan Eck (9), 26. haftada Golden Comet tavuklarını konjonktival yolla BC14 EDS'76 virusu ile enfekte etmiş, inokulasyonu takiben 7. günde serumda, 12. günde ise yumurta sarısında antikorları saptadığını, aradaki farklılığın Ig'lerden ileri geldiğini, IgM'lerin serumda bu-

lunmalarına rağmen yumurta sarısında bulunmadıklarını bildirmişlerdir. Piela ve akr. (14), Adenovirus 127 benzeri bir etkenle tavukları deneysel enfekte ederek yaptıkları bir çalışmada, birinci hafta sonu tavukların serumlarında 1/32 - 1/64 arasında değişen bir titre saptadıkları halde bu sürede yumurtada herhangi bir titre gözleyemediklerini, ikinci hafta sonu ise, hem serumda ve hem de yumurta sarısında antikor belirlediklerini, ancak serum titrelerinin yumurtaya oranla az da olsa yüksek bulunduğunu açıklamışlardır.

Denemede, EDS'76'ya karşı aşılanmamış hayvanların yumurtalarında en düşük düzeyde bile HI antikorları saptanamamış ancak bu hayvanların serumlarında 1/8 titrede 9 ve 1/16 titrede 3 pozitif sonuç elde edilmiş, diğerleri (138) ise negatif bulunmuştur. Aşılı hayvanlara ait serum ve yumurta sarılarında değişik titrelerde HI antikorları saptanmış ve non-spesifik herhangi bir reaksiyona raslanmamıştır. Ancak serum ortalama HI titrelerinin yumurta sarısına oranla az da olsa yüksek olduğu belirlenmiştir.

Alınan bu sonuçlara göre, EDS'76'ya karşı oluşan antikorların saptanmasında, yumurta sarısının serum yerine güvenle kullanılabilmesi kanısına varılmıştır. Bundan sonra yapılacak çalışmada, antikorların hangi sürelerle kan serumu ve yumurta sarısında ortaya çıktığı ve bu antikor düzeyinin ne şekilde devam ettiği araştırılacaktır.

Ö Z E T

EDS'76 virusuna karşı HI antikorları taşımayan Studler ırkı yumurta tavukları EDS'76 aşısı ile aşılanmışlardır. Aşılamadan önce ve aşılamadan sonra hayvanlardan 150'şer olmak üzere toplam 300 serum ve 300 yumurta alınarak EDS'76 yönünden HI testi uygulanmış, aşılanmamış grupta serum ve yumurta sarısı HI titreleri negatif bulunmuştur. Aşılanmış grupta ise; serum HI titreleri $\log_2 5-13$, yumurta sarısı HI titrelerinin $\log_2 3-11$ arasında değiştiği ve aralarında uygun bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Alınan sonuçlara göre EDS'76'ya karşı oluşan antikorları saptama da serum yerine yumurta sarısının kullanılabilmesi belirlenmiştir.

S U M M A R Y

DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST EGG DROP SYNDROME-1976 (EDS'76) IN YOLK AND SERUM OF VACCINATED, NON-VACCINATED CHICKENS BY HAEMAGGLUTINATION - INHIBITION (HI) TEST.

Studler laying hens that lacked haemagglutination-inhibition antibody were vaccinated intramuscularly with the EDS'76 vaccine. Before and after vaccination, 300 sera and 300 yolks were collected from chickens. Antibodies were not detected in sera of 150 and in yolks of 150 of unvaccinated hens by HI tests. In the vaccinated group, 150 sera were positive in the EDS'76 HI test, with titres ranging from \log_2 5-13 and 150 yolks treated with chloroform were positive in the same test, with titres ranging from \log_2 3-11. A good correlation was observed between serum and yolk titers. Results of this study show that yolk from EDS'76 vaccinated hens is readily used instead of serum for detection of antibodies against EDS'76.

K A Y N A K L A R

- 1 — ADAIR, B.M., TODD, D., McFERRAN, J.B. and McKILLOP, E.R. (1986) : Comparative serological studies with egg drop syndrome virus. *Avian Pathol.*, 15: 677-685.
- 2 — AMARO, M.M., MARTINEZ, B.L. and ORTEGA, C.R. (1986) : Presencia de anticuerpos contra el síndrome de la baja de postura 1976, en parvadas de gallinas reproductoras y progenitoras de IEEstado de Morelos. *Vet. Mex.*, 17: 243-248.
- 3 — BATTISTACCI, L., VIVOLI, P., FRESCURA, T. and GIALLETTI, T. (1982) : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of avian adenovirus diseases. *Clin. Vet.*, 19 9/12): 289-296.
- 4 — BAXENDALE, W. (1980) : The results of field trials conducted with an inactivated vaccine against the egg drop syndrome 76 (EDS'76). *Avian Pathol.* 9: 77-91.
- 5 — CALNEK, B.W. (1978) : Haemagglutination-inhibition antibodies against an adenovirus (virus-127) in white Pekin ducks in the United States. *Avian Dis.*, 22: 789-801.
- 6 — COOK, J.K.A. (1982) : Aspect of vaccination against egg drop syndrome 1976 (EDS'76). *Develop. Biol. Standard.* 51: 123-126.

- 7 — DAWSON, G.J., CHANG-P.W., YATES, V.J. and FRY, D.E. (1980) : Neutralizing antibodies to CELO and avian adenovirus-associated viruses in the albumen of chicken egg. *Avian Dis.*, 24: 890-895.
- 8 — DURHAM, P.K.J. and CARTHCART, A. (1979) : A serological survey for the presence of antibodies to Egg-Drop-Syndrome-1976-Adenovirus. *N.Z.Vet.*, 26: 106.
- 9 — ECK, J.H.H. (1986) : Antibodies in ovarian follicles, thick albumen and uterine fluid of mature fowl following experimental EDS'76 virus infection. *Proefschrift Fawlteit der Diergeneskunde Riykurivesiteit. Utrecht.* 145-150.
- 10 — FENGZHEN, Z. and XUEXIAN, C.L. (1981) : A new method for diagnosis pullorum disease in breeding hens. *Acta Vet. Zootech. Sinzca.* 12 (4): 274-276.
- 11 — GLISSON, J.R. and KLEVEN, S.H. (1984) : *Mycoplasma gallicepticum* vaccination. Effect on egg transmission and egg production. *Avian Dis.*, 28: 406-415.
- 12 — JOSIPOVIS, D., SPILER, E., MRZEL, L. and FORSTHUBER, V. (1982) : First results of vaccination agains the adenovirus EDS in Sloveria. *Zbornik Bio. Fak. Univ. Kardelya, Ljubljani, veterinarstvo.* 19 (2): 201-207.
- 13 — McCracken, R.M. and McFERRAN, J.B. (1978) : Experimental reproduction of the egg drop syndrome 1976 with a haemagglutinating adenovirus. *Avian Pathol.*, 7: 483-490.
- 14 — PIELA, T.H., VALES, V.J. and CHANG, P.W. (1985) : Use of egg yolk to determine antibody elvels in chickens inoculated with haemagglutinating duck adenovirus (Adenovirus 127-like). *Avian Dis.*, 29 (2): 457-464.
- 15 — PIELA, T.H., GULKA, C.M., YATES, V.J. and CHANG, P.W. (1984) : Use of egg yolk in serological tests (ELISA and HI) to detect antibody to Newcastle disease, infectious bronchitis and *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, 28 (4): 877-883.
- 16 — RHEE, Y.O., PARK, B.K., JIN, Y.W., KIM, J.H. and KIM, S.J. (1982) : Outbreak of Egg Drop Syndrome-1976 in Korea. Report of the Office of Rural Development, Korea, 24: 112-118.
- 17 — ROSSI, V.R., GALLARDO, K.E. and BERKHOFF, M.G. (1966) : Determination of antibodies against Newcastle disease in yolk and serum of vaccinated, nonvaccinated and convalescent fowls. *Zooitria.* 7: 4-12.
- 18 — YAMAGUCHI, S., IMADA, T., KAWAMURA, H., TANIGUCHI, T. and KAWAKAMI, M. (1981) : Pathogenicity and distribution of Egg Drop Syndrome-1976 virus (JPA-1) in inoculated laying hens. *Avian Dis.*, 25 (3): 642-649.
- 19 — YAMAGUCHI, S.T., IMADA, H., KAWAMARA, S., TANIGUCHI, H., SAIO, H. and SHIMAMATU, K. (1981) : Outbreaks of egg-drop-syndrome-1976 in Japan and its etiological agent. *Avian Dis.*, 25: 628-641.