

NEWCASTLE HASTALIĞINA KARŞI AŞILANMIŞ TAVUKLARDA
HEMAGLUTİNASYON-İNİHİBSYON (HI) TESTİNİN SERUM VE KAĞIT
ŞERİTLERE EMDİRİLMİŞ KAN İLE YAPILARAK
KAPŞILAŞTIRILMASI VE STANDARDİZASYONU (*)

Zergüne Uğur¹

Comparison and Standardisation of the Results of HI Tests Carried Out by
Sera and Blood Samples Absorbed in Paper Strips Obtained from Chickens
Vaccinated against Newcastle Disease

Summary: *In this study, elution fluids obtained from paper strips saturated with blood from chickens vaccinated against Newcastle disease was examined by HI test and compared with HI test using the sera of same chickens. In the study, elution fluids and sera from 245 HI positive chickens were used.*

In preliminary experiments it was determined that the most convenient elution time was 18 hand the temperature was 22°C .

It was determined that HI tests of Newcastle disease vaccinated chicken could be performed with elution fluid obtained from blood saturated paper strips instead of serum. Mean HI titer of serum was higher (1.35 titer) than paper, strips. Although the difference between serum and paper was small, the differences between titers variated between 0.47 and 2.33 .For this reason an immunity criteris for paper strip method could not be established.

Özet: *Bu çalışmada, Newcastle hastalığına karşı aşılanmış tavukların; kağıt şeritlere emdirilmiş kanlarından elde edilen elüsyon sıvıları ve yine aynı hayvanların kan serumları ile karşılaştırılmalı olarak HI testi gerçekleştirilmiş ve testin standardizasyonu sağlanmıştır. Bu amaçla , incelenen ve pozitif sonuç veren 245 tavuğa ait serum ve şeritlerden elde edilen elüsyon sıvı örnekleri değerlendirmeye alınmıştır.*

Yapılan ön çalışma ile kâğıt şeritler için en iyi elüsyon süresi 18 saat, en iyi elüsyon ısı ise 22°C olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, Newcastle hastalığına karşı aşılanmış tavuklarda , HI testinin kan serumu yerine kâğıt şeritlere emdirilmiş kandan elde edilen elüsyon sıvı ile de yapılabileceği kanaatine varılmıştır. Bu denemede, incelenen serumların ortalama HI titresi, şeritlerin ortalama HI titresinden 1.35 daha yüksek

(*): Bu çalışma, doktora tezinin bir bölümünden özetlenmiştir.

1:Dr. Veteriner Hekim Konya - TÜRKİYE

bulunmuştur. Ancak, bu fark küçük olmakla birlikte, incelenen gruplar düzeyinde ortalama HI titreleri arasındaki farklar 0.47 ile 2.33 arasında geniş bir varyasyon gösterdiğinden, şeritlerle yapılan HI testinde, serumlar için bağışıklık göstergesi olarak kabul edilen 7 kriteri gibi kesin bir değer belirlenememiştir.

Giriş

Newcastle hastalığı, başta her yaştaki tavuk ve hindiler olmak üzere, kanatlı hayvanların, çok bulaşıcı, azdan % 100'e varan oranlarda mortaliteye sebep olan viral bir enfeksiyonudur (7,8,15,19,22). Enfeksiyon, kanatlıların, özellikle solunum sistemleri olmak üzere, sindirim ve sinir sistemlerinde (bilhassa beyinde) bozukluklar meydana getirir ve yumurta verimlerinin ciddi şekilde düşmesine neden olur (1,6,7,17). New castle hastalığı; Yalancı tavuk vebası, Asiyatik tavuk vebası, Avian distemper, Ranikhet disease, avian pneumoencephalitis v.s. gibi isimlerle de anılmaktadır (2.11).

İnfeksiyona, tavuklar, hindiler, ördekler, gine tavukları, güvercinler, serçeler, kazlar, papağanlar, sülünler ve diğer tüm kanatlılar duyarlıdır (1,6,7,22).

Newcastle hastalığı, Doyle, Beach, Beaudette, Hitchner ve avirulent enterik olmak üzere 5 klinik form göstermektedir (11).

Newcastle hastalığında kesin teşhisin daima laboratuvar muayeneleri sonucu konulması gerekmektedir. Bu amaçla , virusun izolasyon ve identifikasyonu yapılır.

Newcastle hastalığı Virusunun teşhisinde serolojik muayeneler de kullanılmaktadır. Bu maksatla çok çeşitli testlerden faydalanılmaktadır. Virusun alyuvarları aglutine etme özelliğine bağlı olarak teşhiste Hemaglutinasyon testi uygulanmaktadır (3,12). Hastalığın indirek teşhisinde serumda bulunan antikor titresinin ölçülmesi maksadı ile hemaglutinasyon-İnhibisyon testi geliştirilmiştir. Tavuk ve hindilerde Newcastle hastalığına karşı oluşan immunitenin ölçülmesinde HI testi çok elverişli, pratik, hızlı, güvenli ve ekonomik bir metottur (9).

Serum ve kan numuneleri, kâğıtlara emdirilip, kurutulmuş da serolojik testlerde kullanılabilir. Newcastle hastalığında da, serumda oluşan antikorların HI testi ile belirlenmesinde, kan ve serum örneklerinin kâğıtlara emdirilmesi işlemi çeşitli araştırmacılar tarafından denenmiştir (10,13,14,16,18,20,21). Beard ve Brugh (10), Newcastle hastalığında HI testinde kullanılmak üzere Nobuto şeritlerine 0.1 ml. kanı emdirmişler, bunu HI testinde kullanmışlar ve bu metodun faydalı ve avantajlı olduğunu bildirmişlerdir. Yine Brugh ve Beard (13), NHV ve Avian İnfluenza Virus antikorlarının HI testi ile belirlenmesinde kanı kurutulmuş kâğıtlara emdirerek, serum örnekleri ile birlikte teste tabi tutmuşlar, sonuçların memnuniyet verici bir şekilde birbirine benzer olduğunu tespit etmişlerdir. Dimitrova (14), HI testinde Nobuto'nun filtre kâğıdı tekniğini kullanmış, sonuçların yeterli ve tatmin edici olduğunu açıklamıştır. Estudillo ve ark. (16), Newcastle hastalığında aşılınmış tavukların kanını filtre kâğıtlarına emdirmiş ve aynı hayvanlardan alınan serum örnekleri ile birlikte karşılaştırmalı HI testinde iki grubun sonuçları arasında % 64'ün üzerinde korelasyon saptadıklarını bildirmişlerdir. Park ve ark. (20) da , NHV ve EDS'76 Virusuna

karşı oluşan antikor aktivitesini ölçmek için tüm kanı filtre kâğıtlarına emdirmişler, filtre kâğıtlarından elde edilen elüsyon sıvıları ve aynı hayvanların serum örneklerini birlikte karşılıklı olarak HI testine tabi tutmuşlar, sonuçları her iki hastalıkta da birbirine çok yakın olarak bulmuşlar ve bu metodun HI testinde her iki hastalıkta da başarı ile kullanılabileğini açıklamışlardır. Ulloa ve ark. (21), Newcastle hastalığına karşı aşılınmış civcivlerin HI testi için, kan numunelerini kromatografik kâğıtlara emdirmişler, bu duruma farklı işlemlerin etkisini incelemişler, sonuçta kan emdirilmiş kâğıtların polythene torbalara konup tercihen serin yerde saklanmalarını salık vermişlerdir. Jurazda ve ark. (18) da, HI testinde yine aynı örneklerinin aynı çıktığını, metodun yeterince duyarlı, basit ve ucuz olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, Newcastle hastalığına karşı aşılınmış tavuklarda Hemaglutinasyon-İnhibisyon (HI) testinin, hem serum ve hem de kâğıt şeritlere emdirilen kandan elde edilen elüsyon sıvı ile gerçekleştirilerek, sonuçların karşılaştırmasının yapılması, testin standardizasyonu ve elüsyon sıvılarının teste kullanılabilirliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada, Tarım, Orman ve Köyiřleri Bakanlığı Yönetmeliğine uygun olarak Newcastle infeksiyonuna karşı aşılınmış ve kan serumlarında bu hastalığa karşı antikor bulunan 245 adet tavuk serumundan yararlanılmıştır.

Numunelerin sayısı, hayvanların ırkı ve /veya yetiştirme yönü, numunelerin alındığı işletmeler Tablo-1'de gösterilmiştir.

Tablo-1. Çalışmada kullanılan ve pozitif sonuç veren tavukların sağlandığı kaynaklar, sayıları ile ırkları ve/veya yetiştirme yönleri

Pozitif sonuç veren tavukların sağlandığı kaynak	Sayı	Tavukların ırkı ve/veya yetiştirme yönü
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deneme Uygulama ve Araştırma Çiftliği	212	Ross -Brown, Yumurtacı
Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zooteknik Bölümü	20	Leghorn, yumurtacı
Ar -Tavuk	10	Hybro, Damızlık
Bakteriyoloji Bilim Dalı	3	Broiler
Toplam	245	

Denemede, yapılan ön çalışmayla şekli saptanan, 2x2 cm. boyutlarında tutamak kısmı ve bunun ucunda 4 cm. uzunluğunda, 1cm. genişliğinde (4 cm²) emici şerit kısmı bulunan, yaklaşık 71 mg. ağırlığında pembe renkli ticari kurutma kâğıtları kullanılmıştır.

Newcastle hastalığına karşı aşılınmış tavukların kanları, V.cutanea ulnaris'leri steril bir iğne ile delinerek hazırlanan kurutma kâğıtlarının tutamaklarının ucundaki şerit kısımlara her taraflarını kaplayacak şekilde

emdirilmiştir. Diğer taraftan yine aynı tavukların kanları, kâğıt şeritlere emdirilmiştir. Diğer taraftan yine aynı tavukların kanları, kâğıt şeritlere emdirildikten sonra, silikonlu tüplere alınmıştır.

Kâğıt şeritlerdeki kurutulmuş kanın elüsyonu işlemi için Beard ve Brugh (10) ile Park ve ark. ları (20) tarafından bildirilen yöntemlerden yararlanılmıştır. Bu amaçla, 20 tavuk kullanılmıştır. Her tavuktan 6'şar şerite kan emdirilmiş ve her tavuk için bir silikonlu tüpe kan alınmıştır. 1/32 oranında sulandırma için, içinde 1.24 ml. PBS bulunan tüplere, kan emdirilen şerit şeklindeki kısımlar, makasla 8 eşit parça halinde kesilerek konmuş ve aşağıdaki tarzda ön çalışma işlemine tabi tutularak en uygun elüsyon süre ve ısısı tayin edilmiştir.

20 tane tüp (şeritli)	5 saat	4° C de,
" " " "	" "	22° C de,
" " " "	" "	37° C de,
" " " "	18 saat	4° C de,
" " " "	" "	22° C de,
" " " "	" "	37° C de,

elüsyon işlemine tabi tutulmuştur. Böylece en uygun elüsyon süre ve ısısı tespit edildikten sonra şeritler her HI testinden önce elüsyon işlemine tabi tutulmuşlardır.

Alsever solüsyonu, yıkanmış tavuk eritrositi elde etmek için, tavuklardan kan alınması işleminde kullanılmıştır (5).

Kâğıt şeritlerin elüsyonu işleminde, ayrıca HA ve HI testlerinde sulandırma sıvısı olarak PBS'den yararlanılmıştır (5).

HI testinde , Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü'nden sağlanan NHV'nin LaSota suşu, antijen olarak kullanılmıştır. Antijenin HA titresini her denemede yeniden belirlenmiştir. HA ve HI testlerinde 3 defa yıkanmış ve % 1 oranında PBS ile sulandırılmış tavuk eritrositleri kullanılmıştır.

Kan emdirilmiş şeritlerin ve ayrıca serumların en uygun muhafaza süresinin tespiti için 30 tavuk kullanılmıştır. Her tavuktan 4'er şerite kan emdirilmiş ve ayrıca her tavuk için bir silikonlu tüpe kan alınmıştır. Her tavuğa ait 4 şeritten biri, ilk değerlendirme için kan emdirme ve kurutma işleminden sonra 22°C de 18 saat elüsyon işlemine tabi tutulmuş, bu şeritlerle ve aynı hayvanlara ait serum numuneleri de ilk değerlendirme için 18 saat 4° C de bekletildikten sonra karşılıklı olarak HI testi gerçekleştirilmiştir. Diğer 3 şerit ise , 5,10,15 gün 4°C de muhafaza edildikten sonra elüsyon işleminden geçirilip, yine aynı hayvanlara ait ve ilk değerlendirmeden sonra 5,10,15 gün 4° C de muhafaza edilen serumlarla, aynı anda karşılaştırmalı olarak HI testine tabi tutulmuşlardır. Mikro Hemaglutinasyon-İnhibisyon (HI) Testi Anonim (3) ve Arda'nın (4) bildirdiği yöntemle yapılmış ve virus 8 HAÜ'de sabit tutulmuştur. (Virusun titresini Mikro Hemaglutinasyon (HA) Testi ile belirlenmiştir) Aynı tavuğa ait serum ve kâğıt şeritlere emdirilmiş kandan elde edilen elüsyon sıvısı örnekleri, birlikte olarak aynı mikropate'lerde teste tabi tutulmuşlardır. Böylece aynı tavuğa ait serum örnekleri ve elüsyon sıvısı örneklerinin HI titreleri karşılıklı olarak mukayese edilmiş ve sonuçlar 2 log tabanına göre değerlendirilmiştir.

Bulgular

Denemede kullanılan 245 tavuğun serum ve şerit elüsyon sıvıları arasındaki HI titre farklarının dağılımı Tablo-2'de gösterilmiştir

Tablo -2 . Serum ile şeritlerin HI titreleri arasındaki farkların dağılımı

Serum ile şerit titreleri arasındaki farklar	Sayı (Şerit elüsyon sıvısı)	Yüzde (%)
Titresi aynı olanlar	77	31.43
1 titre düşük olanlar	63	25.71
2 " " "	67	27.34
3 " " "	24	9.80
4 " " "	10	4.08
5 " " "	2	0.82
6 " " "	2	0.82
TOPLAM	245	100.00

Tablo -2'den de anlaşılacağı üzere, titresi serumla aynı olan şeritlerin sayısı 77(% 31.43), serumdan 1 titre düşük olan şeritlerin sayısı 63(%25.71), 2 titre düşük olan şeritlerin sayısı 67(% 27.34) olarak tespit edilmiştir. Serumdan 3 titre düşük olan şeritlerin sayısı 10(% 4.08) olarak saptanmıştır. Diğer taraftan serumdan 5 titre düşük olan şeritlerin sayısı 2(% 0.82), 6 titre düşük olan şeritlerin sayısı da yine 2 (% 0.82) olarak belirlenmiştir.

Yine tablodan anlaşılacağı üzere, titresi serumla aynı olan ve 1 titre düşük olan şeritlerin toplamının 140 (% 57.14), yine titresi serumla aynı olan, 1 titre düşük olan ve 2 titre düşük olan şeritlerin toplamının 207 (%84.48) olduğu görülmektedir.

Diğer taraftan incelenen 245 serumun ortalama HI titresi ; 11.16,245 şeritin ortalama HI titresi ise; 9.81 olarak saptanmıştır.

Muhafaza süresinin tespitine yönelik çalışmada ise; kâğıt şeritlerdeki titrelerin, 5,10,15 gün muhafaza edilen 16 numunede , aynı hayvanlara ait ilk değerlendirilen şeritlerle aynı olduğu belirlenmiştir. 5,10,15 gün muhafaza edilen 4 numunede ise, HI testinde titrenin, ilk değerlendirilen şeritlere göre 1,4 numunede ise, 5,10,15 gün muhafazadan sonra, ilk değerlendirilen şeritlere göre 2 düştüğü saptanmıştır. Geriye kalan 6 numunedeki değerler değişkenlik göstermiştir.

Kan alınıp elde edildikten sonra, 4° C de 18 saat bekletilip, tespit edilen başlangıçtaki serum titrelerinin ise, 15 numunede ilk değerlendirmeden 5,10,15 gün sonra yapılan HI testindeki serum titreleri ile aynı olduğu tespit edilmiştir. 4 numunede ilk değerlendirmeden, 5,10,15 gün sonra titrenin 1,3 numunede ise, yine ilk değerlendirmeden 5,10,15 gün sonra 2 düştüğü saptanmıştır. Geriye kalan 8 numunedeki değerler değişkenlik göstermiştir.

Tartışma ve Sonuç

Denemede aynı tavuklara ait serum ve kan emdirilen kağıt şeritlerden elde edilen elüsyon sıvısı örnekleri ile karşılaştırmalı olarak yapılan HI testinde, iki örnek grubunun sonuçları arasında % 84.48 oranında uygunluk bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar, araştırmacıların bu konuda yaptıkları çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir (13,16,18,20).

Bazı araştırmacılar (13,14,16,20), yaptıkları çalışmalarda serum ile şerit HI titrelerinin birbirlerine yakın olduğunu, diğer bazı araştırmacılar da (18) inceledikleri serum ve şerit numunelerinin çoğunda HI titrelerinin aynı olduğunu belirtmişlerdir. Ancak araştırmacılar (13,14,16,18,20), bu durum ile ilgili olarak gruplar bazında sayısal bir genelleme yapmamışlardır.

Bu çalışmada, kan emdirilmiş şeritler ve ayrıca serumlar için uygun bir muhafaza süresi tespit edilememiş olup, kan emdirilen kağıt şeritlerin kurutulup, hiç bekletilmeden 22°C de 18 saatlik elüsyondan sonra HI testinin gerçekleştirilmesi ile en iyi sonuçlar alınmaktadır. Yine serumların bu çalışmada, 4°C de 18 saat bekletilip test edilmesi de en iyi sonucu vermektedir.

Serumla, kağıt şeritler arasındaki farklılıkların meydana gelmesi; optimal koşullar çok dikkatlice saptansa ve uygulansa bile şeritlere emdirilen kanlarda bulunan antikorların tam olarak elüe olmaması ve buna bağlı olarak da reaksiyona iştirak eden antikor miktarının azlığından, kullanılan filtre kağıtlarının emme ve elüe etme yeteneklerinin farklı olmasından, hayvanların ırkları ve bireysel farklılıklarından değerlendirilme hatalarından kaynaklanabileceği kanısına varılmıştır. Bu yöntemin, ancak, optimal kriterleri çok iyi saptandıktan sonra ve konu üzerinde tecrübeli kişiler tarafından uygulanmak kaydıyla, kanın alınması ve çizilmesi, serumun çıkarılması, muhafazası, gönderilmesi v.s. gibi işlemlerin zorluklar yaratacağı koşullarda, gerçekleştirilmesi yerinde olur.

Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen bulgular; tavuklarda Newcastle hastalığına karşı aşılardan sonra oluşan immunitenin ölçülmesinde, standardize edilen ticari kurutma veya filtre kağıtlarının HI testinde kullanılmasının mümkün olabileceğini göstermiştir.

Kaynaklar

1. Akat,K.ve Mayılmayıl,A. (1971): *Newcastle Hastalığı*. Bornova Vet.Araş.Enst.Derg., 20:217-253.
2. Akay,Ö. ve Arda,M. (1979): *New castle Hastalığı*. Üçüncü Ulusal Tavukçuluk Kongresi.13-14 Aralık,Ankara.
- 3.Anonim. (1989): *Manual of recommended diagnostic techniques and requirements for biological products for lists A and B diseases*. Office International Des Epizooties, Vol: 1,Paris.
- 4.Arda,M. (1976): *Hollanda'da Newcastle hastalığı üzerinde çalışmalar ve HItestinin yeni yöntemle göre değerlendirilmesi*. Vet.Hek.Dern.Derg., 46 (1-2-3): 19-28.

5. Arda, M. (1985): *Genel Bakteriyoloji. Üçüncü Baskı, A.Ü.Vet.Fak. Yayn.: 402, Ankara Üniv. Basımevi, Ankara.*
6. Arda, M. (1986): *Tavukların Önemli Hastalıkları ve Korunma Yolları. Afyon Yem San. A.Ş., Eğitim Yayn. No.1, Ankara.*
7. Bains, B.S. (1979): *Newcastle disease. In: Hoffmann, F.: A manual of poultry Diseases. La Roche Co. Limited Company, Basel, pp. 133-138.*
8. Başkaya, H. ve Minbay, A. (1981): *Kümes Hayvan Hastalıkları. A.Ü.Vet.Fak. Yayn.: 379, Ders Kitabı, 277, Ankara Üniv. Basımevi, Ankara.*
9. Beard, C.W. and Brugh, J.M. (1975): *Immunity to Newcastle disease. AM.J. Vet. Res., 36 (4): 509-512.*
10. Beard, C.W. and Brugh, J.M. (1977): *Use of the Nobuto blood-sampling paper strip for Newcastle disease serology. Avian Dis., 21(4): 630-636.*
11. Beard, C.W. and Hanson, R.P. (1984): *Newcastle Disease. In: Hofstad, M.S., Barnes, H.J., Calnek, B.W., Reid, W.M. and Yoder, H.W. Jr.: Diseases of Poultry. 8th ed., pp. 452-470, Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa.*
12. Beard, C.W., Hopkins, S.R. and Hammond, J. (1975): *Preparation of Newcastle disease virus hemagglutination-inhibition test antigen. Avian Dis., 19 (4): 692-699.*
13. Brugh, M. and Beard, C.W. (1980): *Collection and processing of blood samples dried on paper for microassay of Newcastle disease virus and avian influenza virus antibodies. Am.J. Vet. Res., 41 (9): 1495-1498.*
14. Dimitrova, E. (1984): *Use of Nobuto's filter paper technique for antibody assay in Newcastle disease. Vet. Med. Nau., 21(1): 17-21.*
15. Ergene, N., Çöteliöglü, Ü., Ası, Y., Gürel, A. ve İyisan, S. (1988): *Tavuklarda Newcastle hastalığında kan parametrelerinin değişimi. İ.Ü. Vet. Fak. Derg., 14 (1) :91-106.*
16. Estudillo, J.B., Amaro, M.M. y Martinez, B.L. (1986): *Evaluacion del metodo de recoleccion, procesamiento y costo de muestras de sangre en papel filtro para la inhibicion de la hemoaglutinacion en microplaca contra la enfermedad de Newcastle. Vet. Mex., 17(2): 92-96.*
17. Gürsoy, N. (1987): *Tavukçulukta Temel Bilgiler ve Önemli Hastalıklar. Tur Ofset., İstanbul.*
18. Jurazda, V., Schmidtova, B. and Rybova, L. (1990): *Use of filter paper for blood specimen collection in poultry and detection of antibodies to Newcastle disease virus. Vet. Med., 35(6): 357-363.*
19. Lancaster, J.E (1981): *Newcastle disease. Pathogenesis and diagnosis. J. Wrld. Poult. Sci. Ass., 37(1): 26-33.*
20. Park, K.S., Kwon, J.H. and Kim, D.H. (1987): *Detection of antibodies to Newcastle disease virus and egg drop syndrome -76 virus by whole blood dried on filter paper. Res. Rept. RDA. Lives. Vet. Kor. Rep., 29(2): 54-58.*
21. Ullos, J., Rodriguez, M., Cubillos, A. y Ernst, S. (1987): *Influencia de diferentes procedimientos de manejo de sangre absorbida en papel en titulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinacion. Arch. Med. Vet. Chi., 19(1): 37-43.*