

Sunuş

Hayvancılık sektörü bakımından büyük bir potansiyele sahip olan ülkemizde bazı hayvan hastalıklarının mevcudiyeti önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hastalıklarla mücadelede veteriner teşhis ve analiz laboratuvarlarında hızlı ve güvenilir teşhis yapılması erken tedbir alınması açısından son derece önemlidir.

Bu kapsamda veteriner teşhis ve analiz laboratuvarlarının alt yapıları bütçe imkanları doğrultusunda sürekli iyileştirilmeye çalışılmaktadır. Çalışmalar sonucunda, Avrupa Birliği entegrasyonu içerisinde ulusal referans laboratuvar oluşturulmuş ve Bakanlığımız Teşhis ve Analiz Laboratuvarlarının akreditasyonları gerçekleştirilmiştir.

Son yıllarda dünyada ve ülkemizde yeni hastalıkların görülmeye başlaması ve teknolojik gelişmelere paralel olarak hastalıkların teşhisinde yeni metotlar kullanılmaya başlanmıştır. Gerek ülkemizde kullanılan mevcut metotların gerekse uluslararası kabul görmüş yeni teşhis metotlarının tekrar gözden geçirilerek standart operasyon prosedürlerin güncellenmesi amacıyla Bakanlığımız yetkilileri, Veteriner Fakültesi Öğretim Üyeleri ve Enstitü Uzmanlarının koordineli olarak çalışacakları altı adet komisyon oluşturulmuştur. Oluşturulan komite üyelerinin özverili çalışmaları sonucunda teşhis metodu standart operasyon prosedürlerine son hali verilmiş ve tüm komisyonların çalışmaları bir araya getirilerek “Teşhiste Metot Birliği Kitabı” oluşturulmuştur. Tüm Kamu ve Özel Veteriner Teşhis ve Analiz Laboratuvarları bu kitapta yer alan bilimsel komitenin onayını almış teşhis ve analiz metotlarını kullanacak ve bu suretle teşhiste metot birliği sağlanacaktır.

Gerek Bakanlığımız Laboratuvarlarında ve gerekse Bakanlığımızdan ruhsatlı Veteriner Teşhis ve Analiz Laboratuvarlarında yayımlanmış olan bu metotlar uygulanacak olup, analiz sonuçları ulusal referans laboratuvarlar tarafından doğrulandıktan sonra geçerli olacaktır.

Bilimsel komite üyeleri belli zamanlarda bir araya gelip, gelişmeleri takip ederek bünyelerinde çalışmalarına devam edecek ve yeni geliştirilen metotların mevcut kitaba ilavesiyle kitabın güncellenmesi temin edilecektir. Yeni geliştirilen veya ilk defa kullanılacak bir metodun Standart Operasyon Prosedürü oluşturulup bilimsel komitenin onayından geçtikten sonra kullanılmaya başlanacaktır.

AB müktesebatına uyumlaştırma çalışmalarının aktif olarak yürütüldüğü bu günlerde, Genel Müdürlüğümüz, Veteriner Fakültesi Öğretim Üyeleri ve Enstitü Uzmanlarının gayretli çalışmaları sonucu hazırlanan Teşhiste Metot Birliği kitabının ülkemize yararlı olacağını umuyor ve bu konuda emeği geçenlere teşekkür ediyorum.

Dr. M. Mehdi EKER

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanı

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanı
Sayın Dr. M. Mehdi EKER'in himayeleri ile

YÖNETİM KOMİTESİ

Vedat MİRMAHMUTOĞULLARI
Dr. Nihat PAKDİL
Prof. Dr. İrfan EROL
Habib CAN
Dr. Nahit YAZICIOĞLU

GÖREV ALANLAR VE KATKIDA BULUNANLAR (*)

Dr. Funda ALTINÖZ	İrem GÜLAÇTI
Dr. Erhan AKÇAY	Mehmet Fahrettin HOCANOĞLU
Ayşe ATEŞOĞLU	Dr. Uğur KÜÇÜKAYAN
Zeynel ARSLAN	Prof. Dr. Osman KUTSAL
Yusuf AKPINAR	Doç. Dr. Taner KARAOĞLU
Hasan AYDIN	Dr. Gülnur KALAYCI
Prof. Dr. Mehmet AKAN	Kamile KESLER
Hüseyin ATİK	M. Levent KAYNAR
Özlem BAĞCI	Tülay KURT
Halil BAŞARAN	M. Murat MADEN
Dr. Ayşen BEYAZIT	Prof. Dr. Serpil NALBANTOĞLU
Prof. Dr. Emine BAYDAN	Asuman SOYSAL NARİŞAHİN
Dr. Aysel Ünsal BACA	Dr. Taraneh ÖNCEL
Dr. Yasemin COŞKUN	Ümit ÖZDEMİR
Mustafa COŞAR	Doç Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU
Hüseyin ÇAKIROĞLU	Dr. Buket ÖZYER
Emine ÇİFTÇİ	Dr. Çiğdem PİŞKİN
Dr. Fethiye ÇÖVEN	Ünal PARLAK
Dr. Ahmet DENİZ	Alper SEZGİN
Prof. Dr. K. Serdar DİKER	Dr. Beyhan SAREYYÜPOĞLU
Dr. İffet DİNÇ	Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU
Asiye DAKMAN	Dr. M. Melih SELVER
Dr. Seza ESKİİZMİRLİLER	Yasin ŞEN
A.Turan ERDOĞDU	Dr. Serra TUNALIGİL
Dr. Arife ERTÜRK	Dr. Yavuz ULUSOY
Dr. Mehmet EKİK	Dr. H. Hüseyin ÜNAL
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ	Prof. Dr. Sevil ATALAY VURAL
Prof. Dr. Bahadır GÖNENÇ	Prof. Dr. Hakan YARDIMCI
Elçin GÜNAYDIN	Dr. Öznur YAZICIOĞLU
Yasin GÜÇLÜ	Dr. Funda YÜZBAŞIGİL
Dr. Ziynet GÜNEN	Dr. Ayşin BAŞSATAN YORUMAZ
Burak GÜNGÖR	Dr. N. Fadime YALÇIN
Dr. Yasemin GÜREL	

(*) Soyadına göre alfabetik dizin

Redaksiyon Komitesi Listesi

Parazitoloji Komisyonu	: Dr. Funda ALTINÖZ Özlem BAĞCI
Bakteriyoloji Komisyonu	: Dr. Seza ESKİİZMİRLİLER Dr. Serra TUNALIGİL
Patoloji Komisyonu	: Dr. Öznur YAZICIOĞLU Dr. Ziyne GÜNEN
Farmakoloji ve Toksikoloji Komisyonu	: Dr. Yasemin COŞKUN Dr. H. Hüseyin ÜNAL
Viroloji Komisyonu	: Doç. Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU Dr. Arife ERTÜRK
Kanatlı Hastalıkları	: Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU Dr. Fethiye ÇÖVEN

Editör Listesi

Parazitoloji Komisyonu	: Prof. Dr. Serpil NALBANTOĞLU
Bakteriyoloji Komisyonu	: Prof. Dr. K. Serdar DİKER
Patoloji Komisyonu	: Prof. Dr. Sevil ATALAY VURAL
Farmakoloji ve Toksikoloji Komisyonu	: Prof. Dr. Emine BAYDAN
Viroloji Komisyonu	: Doç. Dr. Taner KARAOĞLU
Kanatlı Hastalıkları	: Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU

İÇİNDEKİLER

KANATLI HAYVAN HASTALIKLARI	9
Viral Hastalıkların Teşhisinde Kullanılan Metotlar	11
AVIAN INFLUENZA (AI) VİRUSU İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU	12
AVIAN INFLUENZA (AI) VİRAL ANTİJEN TESPİTİNE DAYALI HIZLI TEST METODU	19
AVIAN INFLUENZA (AI) VİRUSUNUN TEŞHİSİNDE HEMAGLUTİNASYON (HA) TEST METODU	25
AVIAN INFLUENZA (AI) VIRUS H5 ve H7 PROTEİNLERİNİN ONE STEP RT-PCR İLE TESPİTİ	30
AVIAN INFLUENZA (AI) VIRUS MATRIX (M) PROTEİNİNİN REAL TIME RT-PCR İLE TESPİTİ	36
AVIAN INFLUENZA (AI) VIRUS N1 PROTEİNİNİN REAL TIME RT-PCR İLE TESPİTİ	42
AVIAN INFLUENZA (AI) VIRUS H5 PROTEİNİNİN REAL TIME RT-PCR İLE TESPİTİ	47
AVIAN INFLUENZA (AI) VIRUS H7 PROTEİNİNİN REAL TIME RT-PCR İLE TESPİTİ	53
AVIAN INFLUENZA A (AI) VİRUSUNUN TEŞHİSİNDE AGAR JEL IMMUNODIFFUSYON (AGID) TESTİ	59
AVIAN INFLUENZA (AI) VİRUSUNA KARŞI OLUŞMUŞ ANTİKORLARIN ENZYM LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) TESTİ İLE TESPİTİ	65
AVIAN INFLUENZA (AI) VİRUSUNUN TEŞHİSİNDE HEMAGLUTİNASYON İNHİBİSYON (HI) TEST METODU	70

NEWCASTLE DISEASE VIRUS (NDV) İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU	75
NEWCASTLE HASTALIĞI VİRUSUNUN (NDV) TEŞHİSİNDE HEMAGLUTİNASYON (HA) TEST METODU	81
AVIAN PARAMYXOVIRUS TİP 1 (APMV-1) SUŞLARININ POLYMERASE (L) GENİ TESPİTİ İÇİN REAL TIME RT-PCR	86
AVIAN PARAMYXOVIRUS TİP-1 (APMV-1) SUŞLARININ MATRIX (M) PROTEİNİNİN TESPİTİ İÇİN REAL TIME RT-PCR	92
NEWCASTLE HASTALIĞI VİRUSUNUN (NDV) FUSION (F) PROTEİNİNİN REAL-TIME PCR TESTİ İLE TESPİTİ	98
NEWCASTLE HASTALIĞI VIRUS (NDV) PATOTİPLERİNİN REAL-TIME PCR TESTİ İLE BELİRLENMESİ	104
NEWCASTLE DISEASE VIRUS (NDV) ANTİKORLARININ TESPİTİ İÇİN ELISA TEST METODU	111
NEWCASTLE DISEASE VIRUS (NDV) TEŞHİSİNDE HEMAGLUTİNASYON İNHİBİSYON (HI) TEST METODU	116
AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUSU (IBV) İZOLASYONU	121
AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS (IBV) TESPİTİNDE HEMAGLUTİNASYON TEST METODU	127
AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS (IBV) SUŞLARININ NESTED REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION (NESTED RT-PCR) İLE TESPİTİ	132

AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS (IBV) SUŞLARININ REALTIME REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION (RRT-PCR) İLE TESPİTİ	137
INFECTIOUS BRONCHITIS (IB) VİRUSUNA KARŞI OLUŞMUŞ ANTİKORLARIN ENZYM LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) TESTİ İLE TESPİTİ	142
AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VİRUSUNA (IBV) KARŞI OLUŞMUŞ ANTİKORLARIN TESPİTİNDE HEMAGLUTİNASYON İNHİBİSYON (HI) TEST METODU	147
TAVUK EMBRİYO PRİMER HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE ŞÜPHELİ MATERYALDEN İNFEKSİYÖZ LARİNGOTRACHEİTİS (ILT, INFECTIOUS LARYNGOTRACHEİTİS) VİRÜSÜNÜN İZOLASYONU	152
AVIAN INFECTIOUS LARYNGOTRACHEİTİS (ILT, İNFEKSİYÖZ LARİNGOTRACHEİTİS HASTALIĞI)'IN PCR İLE TEŞHİSİ	157
KANATLILARDA AVIAN METAPNEUMOVIRUS İNFEKSİYONLARININ TEŞHİSİNDE RT-PCR TESTİ	161
TAVUKLARDA AVIAN METAPNEUMOVİRUS (aMPV) İNFEKSİYONLARININ ELISA TESTİ İLE SEROLOJİK TEŞHİSİ	165
TAVUKLARDA INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS (IBDV, İNFEKSİYÖZ BURSAL HASTALIK VİRUSU)'UN RT-PCR TESTİ İLE MOLEKÜLER TANISI	169
INFECTIOUS BURSAL DISEASE (IBD, İNFEKSİYÖZ BURSAL HASTALIK, GUMBORO)'IN AGAR JEL İMMUNODİFÜZYON (AGID) TESTİ İLE TEŞHİSİ	174
TAVUKLARDA INFECTIOUS BURSAL DISEASE (IBD, İNFEKSİYÖZ BURSAL HASTALIK)'NİN ELISA TESTİ İLE SEROLOJİK TEŞHİSİ	179

TAVUK EMBRİYO PRİMER HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE ŞÜPHELİ MATERYALDEN MAREK'S DISEASE VIRUS (MDV) İZOLASYONU	183
KANATLILARDA MAREK HASTALIĞI (MAREK'S DISEASE)'NİN PCR İLE TEŞHİSİ	188
MAREK HASTALIĞI (MAREK'S DISEASE)'NİN AGAR JEL PRESPİTASYON (AGP) TESTİ İLE TEŞHİSİ	192
KANATLI ÇİÇEĞİ (FOWLPOX)'NİN POL İMERAZ ZİNC İR REAKSİYONU (PCR) İLE TEŞHİSİ	196
Bakteriyel Hastalıkların Teşhisinde Kullanılan Metotlar	201
KANATLI İÇ ORGANLARINDAN SALMONELLA GALLINARUM İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU	202
KANATLI PARATİFO İNFEKSİYONLARININ TEŞHİSİ	208
SALMONELLA PULLORUM / GALLINARUM LAM AGLÜTİNASYON TESTİ	219
KANATLI KOLERASI (FOWL CHOLERA) ETKEN İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU	222
PASTEURELLA MULTOCIDA'NIN AGAR JEL İMMUNODİFFÜZYON TEST İLE SOMATİK SEROTİPLENDİRİLMESİ	230
İNFEKSİYÖZ KORİZA (INFECTIOUS CORYZA)'NİN İZOLASYON ve İDENTİFİKASYONU	233
İNFEKSİYÖZ KORİZA (INFECTIOUS CORYZA)'NİN PCR İLE TEŞHİSİ	236
İNFEKSİYÖZ KORİZA (INFECTIOUS CORYZA)'NİN HEMAGLUTİNASYON-İNHİBİSYON (HI) TESTİ İLE TEŞHİSİ	241

AVIAN CAMPYLOBACTERIOSIS (KANATLI KAMPİLOBAKTERİYOZİSİ) İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU PROSEDÜRÜ	246
KANATLILARDA MİKOPLAZMA İNFEKSİYONLARI (AVIAN MYCOPLASMOSIS)'NA NEDEN OLAN ETKENLERİN İZOLASYON ve İDENTİFİKASYONU	257
MYCOPLASMA GALLISEPTICUM VE MYCOPLASMA SYNOVIAE'NİN PCR İLE TEŞHİSİ	263
KANATLILARDA MİKOPLAZMA İNFEKSİYONLARININ (AVIAN MYCOPLASMOSIS) SERUM PLEYT AGLUTİNASYON TESTİ İLE TEŞHİSİ	269
KANATLI MİKOPLAZMA İNFEKSİYONLARININ (AVIAN MYCOPLASMOSIS) ELISA TESTİ İLE TEŞHİSİ	273
KANATLI MİKOPLAZMA İNFEKSİYONLARININ (AVIAN MYCOPLASMOSIS) HEMAGLUTİNASYON İNHİBİSYON TESTİ İLE TEŞHİSİ	279
KANATLI TÜBERKÜLOZ (AVIAN TUBERCULOSIS) ETKENLERİNİN İZOLASYONU	285
KANATLILARDA AVIAN CHLAMYDİOSIS'İN TESPİTİ	291



KANATLI HAYVAN HASTALIKLARI

Viral Hastalıkların Teşhisinde Kullanılan Metotlar



AVIAN INFLUENZA (AI) VİRUSU İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU

1. AMAÇ

Avian Influenza Virusu (AIV)'nun izolasyonu ve identifikasyonu işlemlerinin yapılması.

2. UYGULAMA ALANI

Bu prosedür, AIV izolasyonu ve identifikasyonu ile ilgili her türlü analiz/muayene/kontrolü yapan Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarında geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalıklar ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

AI: Avian Influenza, kanatlıların çok bulaşıcı, akut seyirli, solunum sindirim ve sinir sistemlerini etkileyen ve zoonoz karakterde olan viral bir hastalıdır.

PBS : Phosphate Buffered Saline

SPF (Specific Pathogen Free) Sürü: Önemli kanatlı hastalıklarının etkenlerini ve bu etkenlere karşı oluşmuş antikorları taşımayan sürü.

İnokulum: Virus izolasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere organ ve doku örneklerinin parçalanmasıyla, ekim için hazırlanmış olan materyal.

CAB: Korio-allantoik boşluk

CAS: Korio-allantoik sıvı

ETY: Embriyolu tavuk yumurtası

HA: Hemaglütinasyon

HI: Hemaglutinasyon–İnhibisyon

BGS-3: Biyogüvenlik Seviyesi 3

OIE: Office International des Epizooties = Dünya Hayvan Sağlık Örgütü

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu prosedür, Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarına Avian Influenza Hastalığı şüphesi ile gelen kanatlı hayvanlardan alınan beyin, iç organ örnekleri, dışkı, trakeal ve kloakal sıvap vb. materyallerden viral etkenin izolasyonu ve identifikasyonu için yapılan tüm işlemlerin akış sistemini anlatır.

Avian Influenza Hastalığı ve Newcastle Hastalığının, kanatlılarda oluşturduğu belirtiler bakımından birbirine benzediği, anamnez ve nekropsi bulgularına göre ayırt edilemediği için bu iki hastalık karıştırılır ve ayırıcı tanı için ileri tetkikler gerekir. Bu yüzden şüpheli kanatlıların nekropsi işlemleri, etkenin Avian Influenza Virusu olma ihtimali göz önünde bulundurularak en üst düzeyde biyogüvenlik tedbirleri altında ve her iki hastalık için ortak yol izlenerek yapılır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal ve transport

- ☐ Ölü kanatlılardan alınan örnekler; trakeal, oro-farengeal, kloakal sıvaplar ve organ örnekleridir. Organ örnekleri hazırlanırken solunum sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, sindirim sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, beyin ise ayrı olarak işlenir.
- ☐ Canlı kanatlılardan alınan örnekler, trakeal, oro-farengeal ve kloakal sıvaplardır. Küçük ve narin kanatlılarda sıvapla örneği almak hayvana zarar verebileceğinden taze dışkı virus izolasyonu için bir alternatif olabilir.

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Biyogüvenlik seviyesi en üst düzeyde hazırlanmış odalar
- ☐ Biyogüvenlik Kabinleri (Class II tip)
- ☐ Santrifüj
- ☐ Kuluçka makinesi
- ☐ Mekanik parçalayıcı cihaz ve tüpleri / ultra turrax / blender
- ☐ Elektrikli/şarjlı pipettor
- ☐ Yumurta kontrol lambası
- ☐ Steril keskin cerrahi makaslar, dişli ve dişsiz pensler
- ☐ Santrifüj tüpleri (15 ml'lik)

- ☐ Embriyolu yumurta için ekim materyali (yumurta kabuğu delicisi)
- ☐ Steril enjektör (1 veya 2 cc. lik, 0.1 cc. taksimatlı)
- ☐ Tek kullanımlık steril malzeme (pipetler, marazi madde kapları, tüp vb.)

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ Steril PBS (pH 7.0-7.4)
- ☐ Yıkanmış tavuk eritrositi %1 (v/v)
- ☐ Antibiyotik solüsyonu: Penicillin (2000 ünite/ml)-Streptomycin (2 mg/ml), Gentamycin (50 mg/ml) ve Mycostatin (1000 ünite/ml). Dışkı ve kloakal sıvaplar için bu oranlar 5 X hazırlanır.
- ☐ %70'lik Ethanol / Tentürdiyot
- ☐ Yapıştırıcı; uhu, tırnak cilası, eritilmiş parafin vb.

Ayrıca;

- ☐ 9-11 günlük SPF embriyolu tavuk yumurtası.

7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

Numunenin Hazırlanması

Avian Influenza ve/veya Newcastle Hastalığı şüpheli kanatlılarda nekropsi işlemi, **Avian Influenza ve Newcastle Hastalığı Şüpheli Kanatlılarda Nekropsi** prosedürüne göre yapılarak etken izolasyonu için gerekli olan sıvap ve organ örnekleri alınır. Avian Influenza virus izolasyonu ve identifikasyonu işlemleri mümkün ise BGS-3 düzeyinde hazırlanmış odalarda, eğer bu mümkün değilse biyogüvenlik seviyesi en üst düzeyde hazırlanmış odalarda ve Class II tip biyogüvenlik kabinlerinde yapılmalıdır.

7.5 Muayene/Analizin Yapılması

7.5.1 Hızlı Test

- ☐ Canlı veya ölü kanatlılardan, ikişer adet alınan trakeal, oro-farengeal ve/veya kloakal sıvap örneklerinden bir adedi hızlı testte kullanılmak üzere işleme alınır. Virus varlığını hızlı bir şekilde tespitini sağlayan bu test **Avian Influenza Viral Antijen Tespitine Dayalı Hızlı Test Metodu**'na göre uygulanır. Hızlı testte AI pozitif çıkan hayvanlara ait örnekler, pozitifliğin teyidini sağlamak ve virus tiplendirmesi amacıyla negatif çıkan hayvanlara ait örnekler gibi aşağıda anlatıldığı şekilde işleme alınır.

7.5.2. Virus İzolasyonu

İnokulum Hazırlama

- ☐ Organ parçalarından hazırlanacak inokulumun mekanik parçalayıcı cihaz kullanarak parçalanması en idealdir. Eğer mekanik parçalayıcı cihaz yoksa, organ parçaları ultra turrax, blender veya steril makas yardımıyla iyice parçalanır.
- ☐ Parçalanmış doku % 10-20 (w/v) oranında olacak şekilde hazırlanmış antibiyotik solüsyonu içerisine konur ve iyice karışması sağlanır.
- ☐ Karışım, 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki sıvı alınır.
- ☐ Trakeal, kloakal sıvıplar ve dışkı materyalinden inokulum hazırlanırken, bu materyaller de antibiyotik solüsyonu içine alınır.
- ☐ Dışkı ve kloakal sıvıplar için kullanılacak antibiyotik solüsyonu, antibiyotik miktarı yukarıda verilen oranların 5 katı artırılarak hazırlanır.
- ☐ Süspansiyonlar oda sıcaklığında 60 dakika ya da buzdolabında bir gece bekletilir ve bu süre sonunda işleme alınır. Hemen işleme alınmayacaksa derin dondurucuda muhafaza edilir.
- ☐ Antibiyotik solüsyonunda bekleme süresini tamamlayan süspansiyonlar 3000 rpm'de 10 dakika tekrar santrifüj edilir, üstteki sıvı alınarak inokulum olarak kullanılır.

Embriyolu Yumurtaların Hazırlanması ve İnokulasyonu

SPF Tavuk Yumurtalarının Ön-İnkübasyonu

- ☐ Avian Influenza virusu ETY'da yüksek titrede üremektedir ve bu nedenle izole etmek için tercih edilen metot SPF embriyolu tavuk yumurtasına inokulasyondur. Ön-inkübasyona konacak SPF tavuk yumurtaları 10-15°C'de min. 18 saat max. 10 gün saklanmış olmalıdır.
- ☐ İnkubatöre yerleştirilen yumurtalar, potasyum permanganat + formol ile fumige edilir. İnkubatörde 37.5 + 0.5°C ve %50-70 nispi nem (RN)'de ön-inkübasyona tabi tutulur.
- ☐ Ön-inkübasyon süresi 9-11 gündür (İnkubatöre konma günü = gün 0).
- ☐ 9-11 gün inkube edilmiş yumurtalar, yumurta kontrol lambası ile karanlık bir ortamda fertilité ve canlılık muayenesi yapılır ve aşağıda anlatıldığı şekilde ayırt edilir;

Ölü embriyolu yumurtalar: Görülebilir damar yok, açık sarı yumurta sıvısında yüzen embriyo gri-siyah kütle görünümünde,

Fertil olmayan yumurtalar: Embriyonun olmaması, yalnızca yumurta sarısının ayırt edilebilmesi şeklinde gözlenir.

İnokulasyon yerinin belirlenmesi:

- ☐ Fertil olanlarda embriyonun yeri ve yumurtanın hava boşluğu sınırı kurşun kalem ile çizilir. İnokulasyon yeri, embriyonun karşı tarafında, kan damarlarının az olduğu bir noktada, hava boşluğu çizgisinin 2 mm kadar üzerinde işaretlenir.

- Yumurtalar, hava keseleri üste gelecek şekilde viyollere yerleştirilir ve üzerlerine inokule edilecek materyalin kod numarası yazılır. Her numune için 3-5 yumurta kullanılır (ekim yapılacak SPF ETY sayısı; eldeki toplam yumurta sayısı ve çalışılacak örnek sayısı göz önünde bulundurularak bir örnek için en az 3 yumurta olacak şekilde hesaplanır).

SPF Embriyolu Tavuk Yumurtasına Ekim

- Biyogüvenlik Kabini (Class II) içerisinde, inokulasyon noktasını da içine alacak şekilde yumurtaların üst kısımları %70 Ethanol yada seyreltilmiş tentürdiyot ile ıslatılmış pamuk yardımıyla silinerek dezenfekte edilir.
- İnokulasyonun yapılacağı bölgede daha önce işaretlenmiş noktadan steril delici ile delik açılır.
- Steril enjektör içerisine alınan inokulum sıvısı, 90°'lik eğim ile, 0.1-0.2 ml miktarında korioallantoik boşluğa enjekte edilir.
- Açılan delik, bir damla sıvı yapıştırıcı yada eritilmiş parafin ile kapatılır,
- İnokulasyondan sonraki 24 saatlik gözlem süresinin sonunda ölen embriyolu yumurtalar, kaydedilerek değerlendirmeye alınmaz ve atılır.
- Yumurtaların 35-37°C'de 4-7 gün inkubasyonuna devam edilir. Bu süre içinde 24 saat aralıklarla yumurtaların canlılık muayenesi yapılır. Ölü veya ölmekte olan embriyoları içeren yumurtalar ve inkubasyon periyodunun sonunda canlı kalan tüm yumurtalar buzdolabında 1 gece bekletilir. Bu sürede ölmeleri ve kan damarlarının çekilmesi sağlanır.

Korio Allantoik Sıvının (CAS) Toplanması

- Biyogüvenlik kabini içerisinde, steril malzemeler (eğri uçlu makas, pens, pipetler, tüpler vb.) hazırlanır.
- CAS'ları toplanacak yumurtalar, öncelikle üst kısımları %70 Ethanol yada seyreltilmiş tentürdiyot ile ıslatılmış pamuk yardımıyla silinerek dezenfekte edilir.
- Hava kesesini belirleyen çizginin 1-2 mm üzerinden makas yardımı ile kesilerek yumurta kabuğu kaldırılır
- Hava boşluğunu sınırlayan yumurta zarı, yumurta sarısına zarar verilmeden açılır.
- Elektrikli pipet ve pipet yardımıyla korio-allantoik sıvı (CAS), yumurta sarısına zarar verilmeden toplanır.
- Toplanan sıvı eritosit ve hücre birikintilerinin uzaklaştırılması amacıyla 3000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilir.
- Ayrıca, Avian Influenza ve Newcastle hastalığı virusları çok sınırlı sayıda hücre kültüründe üremekle birlikte izolasyon çalışmalarında primer hücre kültürlerinden Cıvıv Embriyo Fibroblast (CEF) hücre kültürü ve devamlı hücre hattı olan Madin Darby Canine Kidney (MDCK) hücre hattı da kullanılır.

7.5. 3. Virus İdentifikasyonu

- Santrifüj edilen korio-allantoik sıvılar **Avian Influenza Virusunun Teşhisinde HA Test Metodu**'na göre HA aktivitesi varlığı yönünden test edilir. HA aktivitesinin varlığı, yüksek ihtimalle Influenza A virusu ile enfeksiyonu gösterir. İzole edilen bu virusun identifikasyonu amacıyla aynı CAS'lara **Avian Influenza Virusunun Teşhisinde HI Test Metodu**'na göre işlemlere devam edilir ve tüm yapılan işlemler ve sonuçlar kayıt edilir.
- Hemaglutinasyon tespit edilemeyen materyallere ait inokulumların, negatif olarak raporlanmadan önce gerekirse ETY'da tekrar pasajları yapılır.
- Avian Influenza A Virusunun varlığı, **Avian Influenza Virusunun Teşhisinde Agar Jel Immunodiffusion (AGID) Testi**'ne göre test yapılarak nükleokapsit veya matrix antijenlerinin ortaya konulmasıyla da doğrulanır. Bu iki antijen bütün influenza A virusları için ortaktır. Bu testte kullanılacak antijen infekte olmuş allantoik sıvının konsantre edilmesiyle veya korio-allantoik membranın ekstraksiyonu ile elde edilir. Hazırlanan antijen bilinen pozitif ve negatif serumlarla test edilir.
- Ayrıca alınan sıvı örneklerinden ve SPF ETY'na ekimler sonucu elde edilen allantoik sıvılardan Real Time RT-PCR testi ile hızlı bir şekilde **Avian Influenza Virus A Matrix, H5, H7, N1, H5N1 Proteinlerinin Tespiti**' ne göre sonuca ulaşılır. Real Time PCR testi ile elde edilen sonuçların, embriyolu SPF yumurtaya ekim ve HA-HI testi teşhis yöntemleri ile doğrulamaları yapılır.

Intravenöz Patojenite Index Testi (IVPI)

Avian Influenza Virusunun izole edilmesi halinde bu hastalığın sürüden en hızlı bir şekilde eradikasyonu yapılmalıdır. Eradikasyon için uygun stratejinin belirlenmesi açısından, izole edilen suşun virulensinin tespit edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle izole edilen viruslar **Intravenöz Patojenite Index Testi (IVPI)**'ne göre patojenite testlerine tabi tutulur ya da H5/H7 proteinlerinin bölünme bölgelerinin dizin analizi yapılır.

7.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

İzole edilen virusun HI testinde standart H5/H7 antiserumları ile inhibe edilmesi ya da moleküler testlerde H5/H7 primerleri ile pozitif sonuç alınması Influenza A virusunun varlığını gösterir.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

8.1. İç Dokümanlar

- ☐ Avian Influenza ve Newcastle Hastalığı Şüpheli Kanatlılarda Nekropsi Prosedürü
- ☐ Avian Influenza Viral Antijen Tespitine Dayalı Hızlı Test Metodu
- ☐ Avian Influenza Virusunun Teşhisinde HA Test Metodu
- ☐ Avian Influenza Virusunun Teşhisinde HI Test Metodu
- ☐ Avian Influenza Virusunun Teşhisinde Agar Jel Presipitasyon (AGP) Testi
- ☐ Avian Influenza Virus A Matrix, H5, H7, N1, H5N1 Proteinlerinin Tespiti
- ☐ Avian Influenza Virusunun Teşhisinde İntravenöz Patojenite İndeksi Testi (IVPI)

8.2. Dış Kaynaklı Dokümanlar

- ☐ Easterday,B.C., Hinshaw, V. S., Halvorson,D.A. Influenza. Diseases of Poultry, Bölüm 22, 583-605 / 10. Baskı / 1997
- ☐ Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.4. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN INFLUENZA (AI) VİRAL ANTİJEN TESPİTİNE DAYALI HIZLI TEST METODU

1. AMAÇ

Avian Influenza (AI)'dan şüpheli kanatlılardan alınan trakeal, orofarengeal, kloakal sıvaplarda ve korio-allantoik sıvıda Influenza A viral antijeninin varlığının bir tarama testi olan hızlı test ile saptanması amaçlanmaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu, Influenza A viral antijeninin varlığının bir tarama testi olan hızlı test ile yapan tüm bölüm/laboratuvarlarda geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalıklar ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklavlandıktan sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

AI: Avian Influenza, kanatlıların çok bulaşıcı, akut seyirli, solunum, sindirim ve sinir sistemlerini etkileyen ve zoonoz karakterde olan viral bir hastalığıdır.

Immunokromotografik Yöntem: Influenza A monoklonal antikor ile kaplı test çubuğunda aranan Influenza A antijeninin bağlanması ve bu komplekse altın ile işaretlenmiş Influenza A monoklonal antikor bağlanması sonucu oluşan kompleksin bu bölgede açığa çıkan renk değişimi ile varlığının tespit edilmesi yöntemidir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu test metodu, AI viral antijeninin varlığının immunokromotografik yöntemle kalitatif olarak kısa sürede saptanması için kullanılan tarama testinin uygulanışını anlatır. Test uygulanacak örnekler;

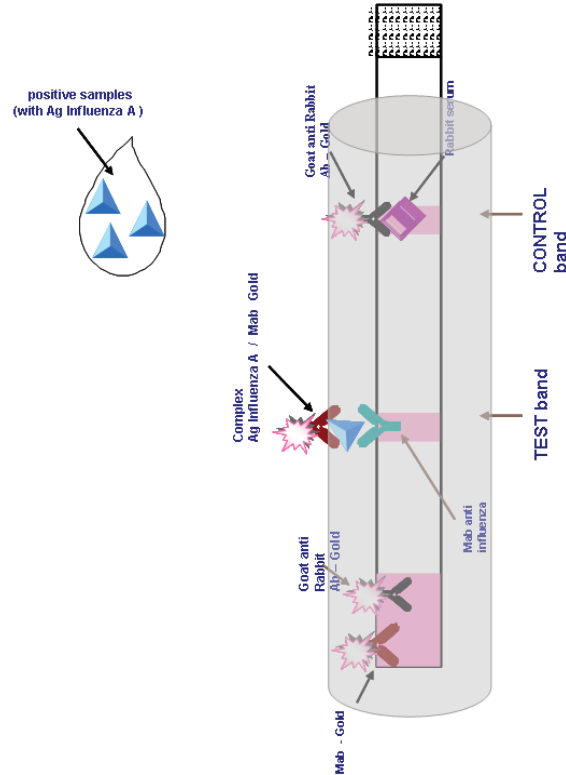
- Trakeal, orofarengeal, kloakal sıvı örnekleri,
- Korio-allantoik sıvı örnekleri (CAS),

Testte kullanılan test çubuklarının test hattında Test Bandı (T) ve Kontrol Bandı (C) olmak üzere iki çizgi bulunmaktadır (**Şekil 1**). Kontrol çizgisi, eğer test prosedürü doğru bir şekilde gerçekleştirildiyse ve test reaktifleri çalışıyorsa, her zaman pembe/mor bant şeklinde ortaya çıkar. Eğer numunede yeterli AI viral antijeni varsa Test Bandı pembe/mor bant şeklinde gözlenir. Numunede AI viral antijeni bulunmaması durumunda yalnızca Kontrol Bandı pembe/mor bant şeklinde gözlenir, Test Bandı oluşmaz.

Test stribinde Influenza tip A virusuna spesifik 2 antikor kullanılır.

Monoklonal antikor (Mab) – Gold

Goat anti rabbit antikor - Gold



Şekil 1. Testin çalışma mekanizması

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal ve transport

- Sıvı yardımıyla alınan trakeal, orofarengeal, kloakal örnekler ve korio-allantoik sıvı



Şekil 2. Sıvap yardımıyla alınan trakeal örnek,



Şekil 3. Sıvap yardımıyla alınan orofarengeal örnek,



Şekil 4. Sıvap yardımıyla alınan kloakal örnek

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Sıvaplar
- ☐ Test tüpleri ve kapakları
- ☐ 1 adet test tüpü sporu (5'lik)
- ☐ Plastik pipet
- ☐ Test Kiti Kullanım Kılavuzu

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ Test çubukları (monoklonal antikor kaplı test stripleri)

Test Kiti, Kullanım Kılavuzunda belirtilen koşullarda saklanmalıdır.

7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

- ☐ Örnek sayısına göre test tüplerine kitte belirtilen miktarda ekstraksiyon solüsyonu konur.
- ☐ Bir sıvap yardımıyla trakeal ve/veya oro-farengeal örnekler ağız boşluğu dilin arkası ve trakeanın içinden alınır. Alınan örnek mukus ve kan içermemelidir.
- ☐ Kloakal örnekler, görünür kanlı bölge veya dışkının bulunmadığı bölgeden alınır. (sıvap örnekleri hemen kullanılmayacaksa buzdolabında 24 saat saklanabilir)
- ☐ Her bir sıvap örneği ekstraksiyon solüsyonu içeren test tüpleri içerisine konur.
- ☐ Sıvap, tüp içerisinde 5-10 kez dairesel hareketle döndürüldükten sonra üzerinde hiç sıvı kalmayacak şekilde tüp çeperine bastırılarak çıkarılır (eğer örnek kloakal sıvap ise ve tüp içerisinde dışkı partikülleri bulunuyorsa supernatant plastik pipetle alınarak başka bir test tüpüne aktarılır)
- ☐ Örnek korio-allantoik sıvı ise direk olarak test tüpü içerisine konur.
- ☐ Test çubuğu kutusundan, tutma yerinden tutarak çıkartılır ve direkt olarak örnek dolu tüpün içerisine daldırılır. Test çubuğu, Kit Kullanım Kılavuzunda belirtilen süre ve sıcaklıkta örnek dolu tüp içerisinde bekletilir.
- ☐ Süre sonunda test çubuğu sonuç okunmak üzere test tüpünden çıkarılır.
- ☐ Test çubuğu belirtilen süreden daha fazla test tüpü içerisinde kalırsa Yanlış Pozitif sonuç verebilir.

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

- ☐ Sonucu okumak için Test bandı (T) ve Kontrol bandının (C) olduğu merkez kısmına (test hattına) bakılır.
- ☐ Kontrol bandı test çubuğunun üst kısmında pembe/mor bant şeklinde gözlenir.
- ☐ Kontrol bandının aşağısında yer alan Test bandında pembe/mor renk oluşumuna bakılır.

Negatif Influenza A virus:

Üstte kontrol çizgisinde tek bir pembe/mor bandın oluşması, test çizgisinde pembe/mor bandın gözlemlenmemesi negatif sonuç olarak değerlendirilir (Şekil 5).

Pozitif Influenza A virus:

Üstte kontrol çizgisi ve alttaki test çizgisinin ikisinde de pembe/mor bandın oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilir (**Şekil 6**).

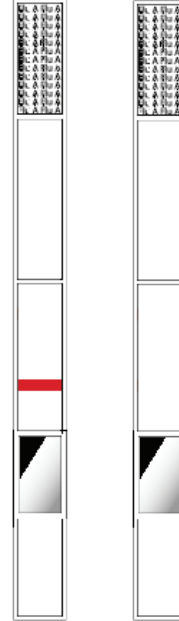
- ☐ Tüm bu çalışmalar kayıt edilir.
- ☐ Sonuç okunduktan sonra işi biten test çubuğu tehlikeli atıklar kabına atılmalıdır.
- ☐ Üstte bulunan kontrol çizgisinde pembe/mor bant oluşmuşsa test geçerlidir. Eğer kontrol çizgisinde renk gözlenmiyorsa, test tekrar edilmelidir. (**Şekil 7**)



Şekil 5. Negatif Sonuç



Şekil 6. Pozitif Sonuç



Şekil 7. Geçersiz Sonuç



Şekil 8. Pozitif Sonuç Negatif Sonuç Pozitif Sonuç Negatif Sonuç

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.4. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.
- ☐ Avian Influenza Virus Type A Antigen Test Kit Kullanım Talimatı
- ☐ Flu Detect™ Influenza Type A Antigen Test Kit Kullanım Talimatı
- ☐ FASTest AIV Influenza Type A Antigen Test Kit Kullanım Talimatı
- ☐ Anigen Rapid AIV Ag/H5 AIV Ag Test Kit Kullanım Talimatı

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN INFLUENZA (AI) VİRUSUNUN TEŞHİSİNDE HEMAGLUTİNASYON (HA) TEST METODU

1. AMAÇ

Avian Influenza virusunun (AIV) Hemaglutinasyon ve Hemaglutinasyon İnhibisyon (HA-HI) test metodu ile teşhisinin yapılması amaçlanmaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu, AI virusunun teşhisini HA-HI test ile yapan Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarlarında geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

Sertifikalı Referans Standart (SRS): Referans olarak alınan, ölçü, miktar, titre gibi özellikleri bilinen, uluslararası bir kuruluş tarafından izlenebilirliği olan, sertifikalandırılmış kimyasal/ biyolojik madde gibi ürünlerdir.

AI: Avian Influenza, kanatlıların çok bulaşıcı, akut seyirli, solunum sindirim ve sinir sistemlerini etkileyen ve zoonoz karakterde olan viral bir hastalıdır.

SPF (Specific Pathogen Free) Sürü: Önemli kanatlı hastalıklarının etkenlerini ve bu etkenlere karşı oluşmuş antikorları taşımayan sürü.

HA: Hemaglutinasyon

HI : Hemaglutinasyon-İnhibisyon

HAU: Hemaglutinasyon Ünitesi

OIE: Office International des Epizooties = Dünya Hayvan Sağlık Örgütü

CAS: Korio-allantoik sıvı

PBS: Phosphate Buffered Saline

v/v : Volum/volum

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu test metodu, AIV varlığı yönünden şüpheli materyalden SPF embriyolu tavuk yumurtasına inokulasyon yöntemi ile elde edilen infektif korio-allantoik sıvının, hemaglutinasyon aktivite özelliğinin varlığı veya yokluğunun saptanmasını anlatır.

Avian Influenza Virusunun varlığı veya yokluğunun saptanması; Hemaglutinasyon aktivite özelliği gösteren CAS ve testte kullanılan Sertifikalı Referans Standart (SRS) antiserumların hemaglutinasyonu inhibe etme özelliğinden yararlanılarak saptanır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

- ☐ Test Materyali; İnfektif korio-allantoik sıvı
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS);
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS) Antijen (AIV-H5)
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS) Antijen (AIV-H7)
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS) Antiserum (AIV-H5)
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS) Antiserum (AIV-H7)

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ 96 gözlü U/V tabanlı mikroyet
- ☐ 25-50 ml kapasiteli Otomatik Mikropipetler ve uçları
- ☐ Küvetler

7.3. Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanması

Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.2-7.4 Hazırlanması:

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g (Susuz) veya 2.95 g (12 Sulu)

Steril distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilir ve pH 7.2-7.4'e ayarlanır. Testin uygulanması esnasında tampon solüsyon olarak ve aynı zamanda test için gerekli olan eritrosit süspansiyonunun hazırlanması için kullanılır. Buzdolabında (5°C±3°C) raf ömrü, şişenin ağzı açılmadıkça hazırlanmasından sonra 2 yıldır.

%1'lik Tavuk Eritrosit Süspansiyonu (v/v) Hazırlanması:

- ☐ 10 ml'lik enjektöre 5 ml kan için 5 ml antikoagulan (eşit hacimde) çekilir,
- ☐ Kan alma hayvanı olarak sağlıklı tavuklar kullanılır. Tavuğun kalbinden veya kanat altı venasından kan alındıktan sonra enjektör yavaşça döndürülerek kanın antikoagulan ile iyice karışması sağlanır.
- ☐ Kan enjektörden santrifüj tüpüne enjektörün iğne kısmı çıkarılmış halde yavaşça aktarılır,
- ☐ Antikoagulanlı kan 1000-1500 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edilir ve ayrılan süpernatant dikkatlice pipetle çekilir.
- ☐ Tüpün dip kısmında kalan eritrositin üzeri PBS ile doldurulur. Daha sonra yavaşça alt üst edilerek kanın PBS ile iyice karışması sağlanır, 5 dakika santrifüj edilir ve üstteki sıvı atılır. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır.
- ☐ Son yıkamadan sonra üstte kalan berrak sıvı dikkatlice alınıp atılır ve dipte kalan eritrosit çökeltisinden 1 ml alınarak 99 ml PBS içerisine katılır. Böylece %1'lik eritrosit süspansiyonu hazırlanmış olur.
- ☐ Hazırlanan eritrosit süspansiyonunun çalışıp çalışmadığının kontrolü için U/V tabanlı mikroyetkin kontrol için çalışılacak sıranın gözlerine 25 ml PBS ve üzerine 25 ml % 1'lik tavuk eritrosit süspansiyonu konulur.
- ☐ Pleytin kenarlarına hafifçe vurularak PBS ile tavuk eritrosit süspansiyonunun iyice karışması sağlanır ve eritrositlerin çökmesi için yaklaşık 22°C±3°C de 40 dakika / 5°C±3°C 'de 60 dakika beklenir.
- ☐ Çalışılan gözdeki eritrositlerin belirgin bir düğme formasyonu oluşturup, pleyt hafifçe eğimli tutulduğunda gözyaşı akıntısı tarzında şekil oluşturması, hazırlanan eritrosit süspansiyonun HA-HI testinde kullanılabileceğini gösterir.

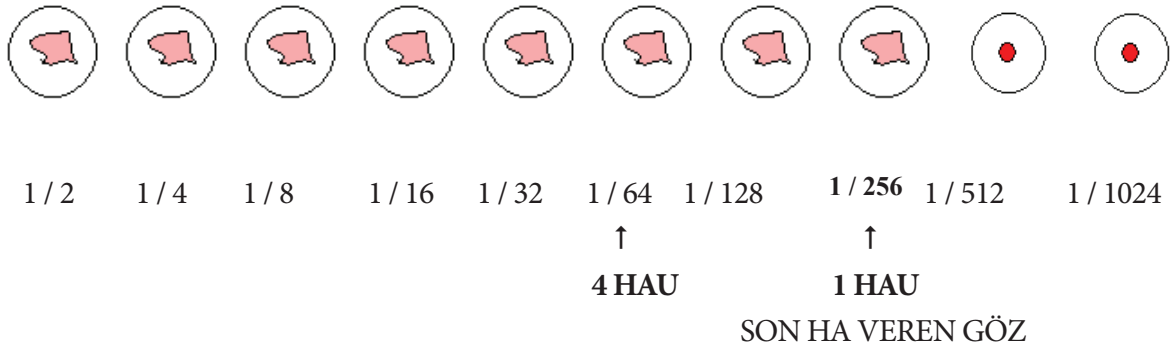
7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

Şüpheli materyallerden izole edilen hemaglutinasyon aktivitesine sahip viral etkenin (infektif korio-allantoik sıvı), 4 HAU'ne ayarlanması;

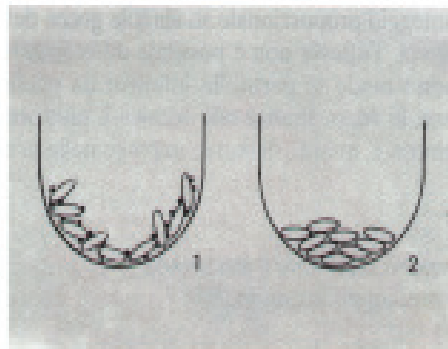
Hemaglutinasyon (HA) Testi

- 1) 96 gözlü V/U tabanlı mikroyetkin çalışılacak gözlerine 25 µl PBS konulur,
- 2) İlk göze 25 µl infektif allantoik sıvı ilave edilir ve iki katlı dilüsyonu yapılarak son göze kadar gidilir.

- 3) Dilüsyon yapılan tüm gözlere tekrar 25 µl PBS ilave edilir,
- 4) Aynı gözlere 25 µl % 1'lik yıkanmış tavuk eritrositi konulur,
- 5) Negatif kontrol (kan kontrol) için ayrılan sıradaki gözlere 25 ml PBS ve üzerine 25 ml % 1'lik tavuk eritrosit süspansiyonu ilave edilir,
- 6) Pleytin kenarlarına hafifçe vurularak iyice karışması sağlanır ve reaksiyonun şekillenmesi için yaklaşık $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ de 40 dakika / $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ de 60 dakika ya da kontrol gözündeki eritrositler belirgin bir düğme formasyonu oluşturana kadar beklenir.
- 7) Bekleme süresi sonunda pleyt gözlemlenerek dantela tarzında kalan yani Hemaglutinasyon şekillenen gözlerin varlığı saptanır. HA pozitif reaksiyonu tanımlama, HA (+) virus izolatına ait sıranın dantela tarzında kalan son gözü %100 HA veren göz olarak kabul edilir. Bu son göz 1 HA Ünitesini temsil eder (Şema 1) ve (Şema 2).



Şema 1 : HA (+) Test Sonucu Şematik Görüntü (4 HAU Hesaplanması)



1. HA (+) 2. Eritrosit Kontrolü

Şema 2: Hemaglutinasyon Oluşma Mekanizması

Sonuçların kalitatif değerlendirilmesi;

Hemaglutinasyon şekillenen (dantela tarzında kalan) gözler = **Pozitif**

Hemaglutinasyon şekillenmeyen (düğme formasyonu oluşan) gözler = **Negatif** olarak ifade edilir.

4 HAU ayarlanması;

- 1 HAU' si belirlenmiş tiplendirmesi yapılacak HA (+) virus izolatu (infektif CAS) ve pozitif kontrol olan SRS Antijen (AIV-H5), SRS Antijen (AIV-H7), 4 HAU'ne (**Şema 1**)'de gösterildiği ve aşağıda anlatıldığı gibi ayarlanır.

Örn: 1 HAU = 1 / 256 olan bir antijen/izolattan 4 HAU hazırlanmak için ;

1. 256 : 4 = 64, 63 ml PBS + 1ml HA (+) virus suspansiyonu ilave edilerek dilusyon hazırlanır.
2. 4 HAU'ne ayarlanan HA (+) virus izolatu ve SRS (AIV-H5), SRS Antijen (AIV-H7)' in kontrolü için, aynı pleytte her örnek için paralel iki sıra olacak şekilde HA testi yapılır.
3. HA test sonucu 4 HAU olan antijen/izolat, HI testinde kullanılır. HA sonucu 4 HAU değil ise, bulunan test sonucuna göre tekrar 4 HAU ayarlanır, tekrar kontrol edildikten sonra HI testine devam edilir.

7.5. Sonuçların değerlendirilmesi

Negatif kontrol (kontrol): kan Bu sıradaki gözlerin düğme şeklinde dibe çökmesi ve pleyt eğimli tutulduğunda gözyaşı akıntısı tarzında şekil oluşturması,

Pozitif kontrol (SRS Antijen [APMV-1(NDV)]): Bu sıradaki gözlerde eritrositin antijen ile bağlanıp dantela tarzında kalması, testin geçerliliğini kanıtlar.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- Easterday,B.C., Hinshaw, V. S., Halvorson,D.A. Influenza. Diseases of Poultry, Bölüm 22, 583-605 / 10. Baskı / 1997
- Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.4. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN INFLUENZA (AI) VIRUS H5 ve H7 PROTEİNLERİNİN ONE STEP RT-PCR İLE TESPİTİ

1. AMAÇ

H5 ve H7 avian influenza (AI) suşlarının tespitinin yapılması.

2. UYGULAMA ALANI

Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarlarında Avian Influenza A hastalığının teşhisinde kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalıklar ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

AI: Avian Influenza kanatlıların çok bulaşıcı, viremi ile seyreden akut seyirli ve zoonoz karakterde olan bir hastalıdır.

CAS: Korio-allantoik sıvı

rRT-PCR: Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

RNA: Ribonükleik Asit

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Avian Influenza Hastalığı şüphesi ile gelen kanatlı hayvanlardan alınan materyallerin embriyolu Specific Pathogen Free (SPF) tavuk yumurtasına ekimini, viral etken izolasyonunu takiben Real Time RT-PCR testi ile H5 ve H7 suşlarının tespiti yapılır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal ve transport

- ☐ Ölü kanatlılardan alınan örnekler; trakeal, oro-farengeal, kloakal sıvaplar ve organ örnekleridir. Organ örnekleri hazırlanırken solunum sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, sindirim sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, beyin ise ayrı olarak işlenir.
- ☐ Canlı kanatlılardan alınan örnekler, trakeal, oro-farengeal ve kloakal sıvaplardır. Küçük ve narin kanatlılarda sıvapla örneği almak hayvana zarar verebileceğinden taze dışkı virus izolasyonu için bir alternatif olabilir. Alınan sıvap örnekleri VTV (pH 7.2– 7.4) içerisinde, soğuk zincirde en seri şekilde çalışmanın yapılacağı laboratuvara gönderilir.

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Biyogüvenlik Kabini (Class II tip)
- ☐ Mikrosantrifüj
- ☐ LightCycler 2.0
- ☐ Derin Dondurucu ($-30 \pm 5^{\circ}\text{C}$, $-70 \pm 5^{\circ}\text{C}$)
- ☐ Buzdolabı
- ☐ 1.5 ml mikrosantrifüj tüpü
- ☐ Tek kanallı Mikropipetler; değişik volümde
- ☐ Otomatik pipet kontroller
- ☐ Tek kullanımlık steril pipetler
- ☐ Mikropipet uçları (bariyerli)
- ☐ Mikrosantrifüj tüpleri için uygun büyüklükte sehpa
- ☐ Steril cryovialler ve eppendorf tüpler
- ☐ Steril santrifüj tüpleri

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ RNA ekstraksiyon kiti
- ☐ OneStep RT-PCR Kiti
- ☐ RRT-PCR kiti
- ☐ Etkin dezenfektan

7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

Hemaglutinasyon aktivitesi görülen embriyolu tavuk yumurtasına yapılan ekimlerden toplanan korioallantoik sıvılar RRT-PCR ile test edilerek etken identifikasyonu yapılır.

RRT-PCR;

RNA ekstraksiyonu:

Total RNA ekstraksiyonu korioallantoik sıvı, organ homojenatı, trakeal sıvı, kloakal sıvı ya da dışkı örneği kullanılarak RNA ekstraksiyon kitinin protokolüne göre manual ya da robotik sistem kullanılarak yapılır. Pozitif kontrol olarak referans virusa ait korioallantoik sıvı, negatif kontrol olarak distile su kullanılarak kitin protokolüne göre RNA ekstraksiyonu yapılır. Ekstrakte edilen RNA materyali 24-48 saat içinde kullanılacaksa 1-8°C'de, kullanılmadan önce ve/veya kullanıldıktan sonra daha uzun süre saklanacaksa -40°C ile -90°C arasında porsiyonlanarak dondurulur.

One Step RT – PCR (Qiagen kit)

Aşağıdaki protokol OneStep RT-PCR kit (Qiagen, cat # 21012) kullanılarak yapılmaktadır.

Aynı tüp içerisinde cDNA sentezini takiben PCR testinin yapılacağı yerde reaksiyon volümü 50 µl olacak şekilde master mix hazırlanır.

PCR Bileşeni	Final Konsantrasyon	Bir reaksiyon için gerekli vol (µl)
RNase-free su	-	28.8 µl
PCR buffer 5X (Qiagen OneStep RT-PCR Kit)	1X	10 µl
dNTPs Mix her biri 10mM (Qiagen OneStep RT-PCR Kit)	Her biri 0.4 mM	2 µl
Forward primer: 50 pmol/ µl (50 µM)	1 µM	1 µl
Reverse primer: 50 pmol/ µl (50 µM)	1 µM	1 µl
RNase inhibitor 40U/ µl (Promega)	8U	0.2 µl
OneStep RT-PCR Enzim Mix (Qiagen Kit)		2 µl
Hedeflenen Miktar		45 µl
RNA		5 µl (klinik örnekten) 2.5 µl RNA+ 2.5 µl RNase free su (CAS)
Final Reaksiyon Volüm		50 µl

H5 PCR primerleri

□ H5KHA PCR

Yaklaşık 300bp ampikon üretir. Bu, direk olarak klinik örneklerden ekstrakte edilen H5 RNA'nın amplifikasyonunda oldukça hassas ve başarılıdır. Ancak bazı H5 olmayan klinik örnekler benzer büyüklükte bantlar oluşturabilir. Bu durumda örneğin H5 olup olmadığının anlaşılması için sekans analizi yapılmalıdır.

□ J3 / B2a PCR

Yaklaşık 300bp ampikon üretir. Bu H5KHA PCR'dan daha az hassastır, fakat yüksek titredeki klinik örneklerden H5 ampikonları üretebilir. H5 spesifikliğı ve genel sağlamlığı KHAH5 PCR formundan daha iyidir. Bu PCR tercihen CAS'dan ekstrakte edilen H5 AI RNA'nın amplifikasyonunda kullanılır.

□ S1 / B2a PCR

Bölünme bölgesi dizinini de kapsayan HA1 bölgesinin içinde olduğu yaklaşık 1200 bp ampikon üretir. Normalde CAS'dan ekstrakte edilen H5 AI RNA'nın amplifikasyonunda kullanılır. Aynı zamanda çok yüksek titreli klinik örneklerin amplifikasyonunda da kullanılabilir.

H5 primer dizinleri:

H5 – kha - 1: CCT CCA GAR TAT GCM TAY AAA ATT GTC

H5 – kha – 3: TAC CAA CCG TCT ACC ATK CCY TG

Not: Dejenere nükleotidler koyu olarak belirtilmiştir.

J3: GAT AAA TTC TAG CAT GCC ATT CC

B2a: TTT TGT CAA TGA TTG AGT TGA CCT TAT TGG

S1: AGC AGG GGT ATA ATC TCT CA

B2a: TTT TGT CAA TGA TTG AGT TGA CCT TAT TGG

H7 PCR primerleri

□ GK7.3 / GK7.4:

Bölünme noktasını kapsayan yaklaşık 200 -230 bp ampikon üretir. Bunlar klinik H7 örneklerden amplifiye olabilen en hassas primer çiftidir.

□ 397 / 391 ve H7.5 /391:

Bu iki primer çifti sırasıyla yaklaşık 600 ve 1100 bp ampikon üretir. Bunlar bölünme bölgesi sekansını da içeren HA1 bölgesini kapsar. Normalde yumurtada çoğalan H7 AI'dan ekstrakte edilen H7 RNA'da kullanılır, fakat aynı zamanda çok yüksek titredeki klinik örneklerden de amplifiye olabilir.

H7 primer dizinleri:

397: ACATACAGTGGGATAAGAACC

391: TCTCCTTGTGCATTTTGATGCC

GK7.3: ATGTCCGAGATATGTTAAGCA

GK7.4: TTTGTAATCTGCAGCAGTTC

Döngü koşulları & amplikon tespiti

İki primer çifti için aşağıdaki şekilde uygulanır;

H5KHA döngü koşulları:

30 dakika 50°C	}	1 döngü
15 dakika 94°C		
30 saniye 94°C	}	40 döngü
1 dakika 58°C		
2 dakika 68°C		

Final uzatma basamağı 7 dakika 68°C

Not: Bu H5KHA PCR ile muhtemel H5 olmayan amplikonlar açısından dikkatli olunmalıdır. Şüpheli durumlarda dizin analizi yapılmalıdır.

J3 / B2a döngü koşulları:

30 dakika 50°C	}	1 döngü
15 dakika 95°C		
45 saniye 94°C	}	35 döngü
45 saniye 50°C		
2 dakika 72°C		

Final uzatma basamağı 10 dakika 68°C

S1/B2a; 397/391; GK7.3 /GK7.4 &H7.5/391 döngü koşulları:

30 dakika 50°C	}	1 döngü
15 dakika 95°C		
45 saniye 94°C	}	35 döngü
45 saniye 50°C		
2 dakika 72°C		

Final uzatma basamağı 10 dakika 68°C

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

PCR ürünü % 2 – 2.5 agaroz jelde koşturulur ve ethidium bromide ile boyanarak UV ışık altında aranan DNA bantlarının varlığı incelenir.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ Easterday,B.C., Hinshaw, V. S., Halvorson,D.A. Influenza. Diseases of Poultry, Bölüm 22, 583-605 / 10. Baskı / 1997
- ☐ Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3. 4. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.
- ☐ Qiagen Kit Kullanım Kılavuzu
- ☐ Qiampr Viral RNA Mini kit Handbook
- ☐ Roche Applied Science LightCycler 2.0 Instrument Operator's Manual. Software version 4.05.
- ☐ Veterinary Laboratory Agency. PCR protocols for the detection of avian influenza virus (AIV) http://www.defra.gov.uk/vla/science/sci_ai_reflab_prot.htm

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN INFLUENZA (AI) VIRUS MATRIX (M) PROTEİNİNİN REAL TIME RT-PCR İLE TESPİTİ

1. AMAÇ

Klinik örneklerde ve infekte CAS'da Avian influenza (AI) virusunun varlığının hızlı bir şekilde tespitinin yapılması için Real-Time PCR testinin kullanılması.

2. UYGULAMA ALANI

Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarlarında Avian Influenza hastalığının teşhisinde kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual", esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

AI: Avian Influenza kanatlıların çok bulaşıcı, viremi ile seyreden akut seyirli ve zoonoz karakterde olan bir hastalıdır.

CAS: Korio-allantoik sıvı

rRT-PCR: Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

RNA: Ribonükleik Asit

cDNA: Komplementer DNA

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Avian Influenza şüphesi ile gelen kanatlı hayvanlardan alınan materyallerden AI virusunun Real Time RT-PCR testi ile tespiti için kullanılır. Avian Influenza virusunun tespiti için oldukça hızlı, hassas ve spesifik bir metottur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal ve transport

- ☐ **Test Materyali;** İnfektif korio-allantoik sıvı, trakeal, kloakal sıvı, organ homojenatı
- ☐ Ölü kanatlılardan alınan örnekler; trakeal, oro-farengeal, kloakal sıvı ve organ örnekleridir. Organ örnekleri hazırlanırken solunum sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, sindirim sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, beyin ise ayrı olarak işlenir.
- ☐ Canlı kanatlılardan alınan örnekler, trakeal, oro-farengeal ve kloakal sıvılardır. Küçük ve narin kanatlılarda sıvı ile örnek almak hayvana zarar verebileceğinden taze dışkı virus izolasyonu için bir alternatif olabilir. Alınan sıvı örnekleri VTV (pH 7.2–7.4) içerisinde, soğuk zincirde en seri şekilde çalışmanın yapılacağı laboratuvara gönderilir.

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Biyogüvenlik Kabini (Class II tip)
- ☐ Mikrosantrifüj (2ml tüpler için rotoru olan)
- ☐ Light Cycler 2.0
- ☐ Software
- ☐ Derin Dondurucu ($-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$, $-70 \pm 5^{\circ}\text{C}$)
- ☐ Buzdolabı
- ☐ Vortex karıştırıcı
- ☐ 1.5 ml mikrosantrifüj tüpü
- ☐ Tek kanallı Mikropipetler; değişik volümde
- ☐ Otomatik pipet kontroller
- ☐ Tek kullanımlık steril pipetler
- ☐ Mikropipet uçları (bariyerli)
- ☐ Mikrosantrifüj tüpleri için uygun büyüklükte sehpa
- ☐ Steril cryovialler ve eppendorf tüpler
- ☐ Steril santrifüj tüpleri

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ RNA ekstraksiyon kiti
- ☐ One Step RT-PCR Kiti
- ☐ RRT-PCR kiti
- ☐ Etkin dezenfektan

Matrix Proteinini için primerler ve prob:

Sep 1 AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG

Sep 2 TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG

SePRO FAM – TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA – TAMRA

Matrix Proteinini için Real Time PCR master mix

Bu protokol OneStep RT-PCR kit (Qiagen, cat # 210212) kullanılarak yapılmaktadır. Kit içerisinde bulunmayan reagentler diğer sağlayıcılardan tedarik edilebilir. Aşağıda verilen volümler 10x25 µl reaksiyon için yeterlidir, yani Master Mix 10 x 23 µl volüme bölünür ve her birine 2 µl ekstrakte edilen RNA eklenir.

PCR Bileşeni	Final Hacim
DEPC su (RNase- free)	137.5 µl
(x5) Qiagen OneStep RT PCR buffer	50 µl
Rox ref.boya (Stratagene stoktan DEPC su ile 1:500 ön dilüe edilmiş)	3.75 µl
Qiagen dNTP mix	10 µl
Sep 1 (50µM)	2 µl
Sep 2 (50µM)	2 µl
SePRO (30µM)	2.5 µl
25 mM magnesium chloride	12.5 µl
RNasin (40U/ µl)	1 µl
OneStep RT-PCR Enzim mix (Qiagen Kit)	10 µl
Toplam	231.25 µl

Real Time PCR M proteini standartları:

Bunlar titresi bilinen infekte allantoik sıvıdan ekstrakte edilen miktarı belirlenen RNA standartlarıdır.

7.3. Prosedür / Metot

PCR master mix'in hazırlanması ve yüklenmesi

- Master mix hazırlanması ve Real Time için yüklenmesi PCR temiz odada yapılmalıdır.
- Test edilecek örnekler için yeterli miktarda master mix hazırlanmalıdır.
- master mix iyice karıştırılıp hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için 30 saniye santrifüj edilmelidir.

- Real time kapillar tüplere / pleyt'e her bir reaksiyon için 23 µl master mix dağıtılmalıdır.
- Kapillar / pleyt kapakları hafifçe kapatılarak soğuk blok ya da buz üzerinde temiz odadan çıkarılmalı ve PCR yapılan alanda RNA örnekleri ve kontroller eklenmelidir.

H5 RNA kontrollerinin hazırlanması

RNA standartlarının hazırlanması

- Uygun bir metot kullanılarak RNA ekstraksiyonu yapılır
- RNA'nın 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 arası seri dilusyonları hazırlanır. Her dilusyon vortex ile iyice karıştırıldıktan sonra kısa bir santrifüj yapılır. Bunlar tüplere dağıtılarak -70°C 'de saklanır. RNA'nın hassas yapısından dolayı en fazla 3 kez dondurulup çözündürülebilir.

Örneklerin ve standartların ilavesi

Her bir kapillar / pleyt gözünde bulunan 23 µl master miks üzerine 2 µl ekstrakte edilmiş RNA örneği ilave edilir.

Bu aşamada örnekler arasında çapraz bulaşmadan kaçınmak için dikkat edilmelidir. Eldivenler sıklıkla değiştirilmeli RNA içeren pipet uçlarını yanlış kapillar / tüp / pleyt gözlerine değdirilmemelidir.

Real Time PCR standartlarının tüplerine 2 µl standart olarak hazırlanmış RNA örneklerinden ilave edilir. Negatif kontrol tüpüne (NTC) 2 µl H_2O ilave edilir.

RNA ilave edilen tüplerin kapakları kapatılır.

Real Time ekipmanına yerleştirilmeden önce tüplerin kapaklarının doğru şekilde ve sıkıca kapatılmış olmasına dikkat edilmelidir.

Test hemen başlatılmayacaksa tüpler test edilinceye kadar buzda bekletilmelidir.

Reverse transcription (RT) ve PCR

Real Time tüpleri uygun Real Time ekipmanına yerleştirilir.

Reaksiyon aşağıdaki döngü profili ile inkube edilir.

RT aşaması: 30 dakika 50°C
15 dakika 95°C

PCR aşaması;

95°C'de 10saniye	}	40 döngü
54°C'de 30 saniye		
60°C'de 20 saniye		

Not: Floresan data 60°C basamağın sonunda ROX ve FAM filtreleri kullanılarak toplanır.

Testin tamamlanması yaklaşık 2 saat sürer, bu süre kullanılan cihaza bağlı olarak değişebilir.

7.4. Sonuçların değerlendirilmesi

Influenza A virus M gen Taqman Real Time RT-PCR sonuçları 530 numaralı kanalda okunur. Test sonuçlarını analiz etmek için analiz düğmesine basılır ve kalitatif analiz seçilir. Analize ait floresan bilgileri analiz sırasında ve sonrasında da izlenebilir. Paralel çalışılan örneklerle test örnekleri karşılaştırılarak sonuçlar analiz edilir. Referens örnekten standartlar hazırlanmışsa standart curve analizi yapılarak PCR'ın etkinliği saptanır. LightCycler için optimum etkinlik 2.0 olmalıdır. Fakat gerçekte çoğu zaman bu değerden daha düşük bir değer elde edilir.

1. Örneklerle ait elde edilen sonuçlar pozitif ve negatif kontrolle karşılaştırılarak değerlendirilir.
2. Pozitif örneklerde yükselen bir eğri gözlenirken negatif kontrol ve negatif örneklerde dümdüz bir floresans çizgisi izlenmelidir.
3. Bir örneğin pozitif mi yoksa negatif mi olduğunu analiz ederken Ct değeri <30 ise pozitif, Ct değeri 30-35 arasında ise ve sigmoid logaritmik bir eğri ise zayıf pozitif, Ct değeri >35 ise ve amplifikasyon eğrisi linear bir yapıda ise negatif olarak kabul edilir.
4. Şüpheli bir durum varsa pozitif olduğu bilinen bir örnekten hazırlanan standart dilusyonları ile şüpheli örnek kullanılarak rRT-PCR yenilenir. Yükselen bir eğri oluşturan en düşük konsantrasyondaki pozitif örnek ile incelenen örnek karşılaştırılarak karar verilir.
5. Floresans data 60°C'de 530 kanalında FAM filtresi yardımıyla toplanır.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.4. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.
- ☐ Spackman E, Senne D A, Myers T J, Bulaga L L, Garber L P, Perdue M L, Lohman K, Daum L T, Suarez D L. 2002. Development of a real time reverse transcriptase PCR assay for Type A influenza virus and the avian H5 and h7 Haemagglutination subtypes. J. Clin. Microbiol. 40, 3256-3260
- ☐ Chang-Won Lee, Suarez D L. 2004. Application of real time RT_PCR for the quantification and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus. J.Virol. Methods. 119, 151-158.
- ☐ Veterinary Laboratory Agency. PCR protocols for the detection of avian influenza virus (AIV) http://www.defra.gov.uk/vla/science/sci_ai_reflab_prot.htm
- ☐ Roche Applied Science LightCycler 2.0 Instrument Operator's Manual. Software version 4.05.
- ☐ Qiaamp Viral RNA Mini kit Handbook

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN INFLUENZA (AI) VIRUS N1 PROTEİNİNİN REAL TIME RT-PCR İLE TESPİTİ

1. AMAÇ

Avian influenza (AI) Virus N1 proteininin Real-Time PCR ile tespitinin yapılması.

2. UYGULAMA ALANI

Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarlarında Avian Influenza (AI) Virusunun N1 geninin tespitinde kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalıklar ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

AI: Avian Influenza kanatlıların çok bulaşıcı, viremi ile seyreden akut seyirli ve zoonoz karakterde olan bir hastalıdır.

CAS: Korio-allantoik sıvı

rRT-PCR: Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

RNA: Ribonükleik Asit

cDNA: Komplementer DNA

N: Neuraminidase

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Avian Influenza Hastalığı şüphesi ile gelen kanatlı hayvanlardan alınan materyallerden AI virusunun N1 proteininin Real Time RT-PCR testi ile tespiti için kullanılır. AI virusu N1 proteininin tespiti için oldukça hızlı, hassas ve spesifik bir metottur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal ve transport

- ☐ **Test Materyali;** İnfektif korio-allantoik sıvı, trakeal, kloakal sıvı, organ homojenatı
- ☐ Ölü kanatlılardan alınan örnekler; trakeal, oro-farengeal, kloakal sıvı ve organ örnekleridir. Organ örnekleri hazırlanırken solunum sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, sindirim sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, beyin ise ayrı olarak işlenir.
- ☐ Canlı kanatlılardan alınan örnekler, trakeal, oro-farengeal ve kloakal sıvıdır. Küçük ve narin kanatlılarda sıvı ile örnek almak hayvana zarar verebileceğinden taze dışkı virus izolasyonu için bir alternatif olabilir. Alınan sıvı örnekleri VTV (pH 7.2–7.4) içerisinde, soğuk zincirde en seri şekilde çalışmanın yapılacağı laboratuvara gönderilir.

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Biyogüvenlik Kabini (Class II tip)
- ☐ Mikrosantrifüj
- ☐ LightCycler 2.0
- ☐ Software
- ☐ Vortex karıştırıcı
- ☐ Derin Dondurucu ($-20\pm5^{\circ}\text{C}$, $-70\pm5^{\circ}\text{C}$)
- ☐ Buzdolabı
- ☐ 1.5 ml mikrosantrifüj tüpü
- ☐ Tek kanallı Mikropipetler; değişik volümde
- ☐ Otomatik pipet kontroller
- ☐ Tek kullanımlık steril pipetler
- ☐ Mikropipet uçları (bariyerli)
- ☐ Mikrosantrifüj tüpleri için uygun büyüklükte sehpa
- ☐ Steril cryovialler ve eppendorf tüpler
- ☐ Steril santrifüj tüpleri

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ RNA ekstraksiyon kiti
- ☐ OneStep RT-PCR Kiti
- ☐ RRT-PCR kiti

□ Etkin dezenfektan

N1 Proteini için primerler ve hydrolysis (“TaqMan”) MGB probu;

N1F2 (forward primer) : 5’ – GTT TGA GTC TGT TGC TTG GTC – 3’

N1R1 (reverse primer) : 5’ – TGA TAG TGT CTG TTA TTA TGC C 3’

N1 prob: 5’ – VIC – TTG TAT TTC AAT ACA GCC AC – MGB 3’

N1 Geni Real Time PCR master mix

Bu protokolde OneStep RT-PCR kit (Qiagen, cat # 210212) kullanılarak yapılmaktadır. Kit içerisinde bulunmayan reagentler diğer sağlayıcılardan tedarik edilebilir. Aşağıda verilen volümler 10 x 25 µl reaksiyon için;

PCR Bileşeni	Final Hacmi
DEPC su (RNase- free)	139 µl
(x5) Qiagen OneStep RT PCR buffer	50 µl
Rox ref.boya (Stratagene stoktan DEPC su ile 1:500 ön dilüe edilmiş)	3.75 µl
Qiagen dNTP mix	10 µl
N1F2 (50µM)	2 µl
N1R1 (50µM)	2 µl
N1 prob (30µM)	1.25 µl
25 mM magnesium chloride	12.5 µl
RNAsin (40U/ µl)	1 µl
OneStep RT-PCR Enzim mix (Qiagen Kit)	10 µl
Toplam	231.5 µl

N1 Kontrolleri:

Negatif kontrol

En az iki “no template kontrol” (NTC) olmalıdır. Bu amaçla iki tüpe RNA yerine 2 µl RNase free su eklenmelidir.

Pozitif kontrol

Miktarı belirlenmiş N1 olarak teyit edilmiş bir AI virüsü.

7.4. Prosedür / Metot

PCR master mix’in hazırlanması ve yüklenmesi

- Master mix hazırlanması ve real time için yüklenmesi PCR temiz odada yapılmalıdır.

- Test edilecek örnekler için yeterli miktarda master mix hazırlanmalıdır.
- master mix iyice karıştırılıp hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için 30 saniye santrifüj edilmelidir.
- Real time kapillar tüplere / pleyt'e her bir reaksiyon için 23 µl master mix dağıtılmalıdır.
- Kapillar / pleyt kapakları hafifçe kapatılarak soğuk blok ya da buz üzerinde temiz odadan çıkarılmalı ve PCR yapılan alanda RNA örnekleri ve kontroller eklenmelidir.

Örneklerin ve standartların ilavesi

Her bir kapillar / pleyt gözünde bulunan 23 µl master miks üzerine 2 µl ekstrakte edilmiş RNA örneği ilave edilir.

Bu aşamada örnekler arasında çapraz bulaşmadan kaçınmak için dikkat edilmelidir. Eldivenler sıklıkla değiştirilmeli RNA içeren pipet uçlarını yanlış kapillar / tüp / pleyt gözlerine değdirilmemelidir.

Real Time PCR kontrol tüplerine 2 µl kontrol örneklerinden ilave edilir.

RNA ilave edilen tüplerin kapakları kapatılır.

Real Time ekipmanına yerleştirilmeden önce tüplerin kapaklarının doğru şekilde ve sıkıca kapatılmış olmasına dikkat edilmelidir.

Test hemen başlatılmayacaksa tüpler test edilinceye kadar buzda bekletilmelidir.

Reverse transcription (RT) ve PCR

Real Time tüpleri uygun Real Time ekipmanına yerleştirilir.

Reaksiyon aşağıdaki döngü profili ile inkübe edilir.

RT aşaması: 30 dakika 50°C

15 dakika 95°C

PCR aşaması	15 saniye 95°C	} 40 döngü
	30 saniye 55°C	
	40 saniye 72°C	

Not: Floresan data 55°C annealing basamağının sonunda ROX ve HEX filtreleri kullanılarak toplanır.

Testin tamamlanması yaklaşık 2 saat sürer, bu süre kullanılan cihaza bağlı olarak değişebilir.

7.5. Sonuçların değerlendirilmesi

Sonuçlara kanal 530'da Quantification analizi yapılarak bakılmalıdır. Analiz düğmesine basılarak kalitatif analiz seçilir. Analize ait floresan bilgileri analiz sırasında ve sonrasında da izlenebilir. Paralel çalışılan örneklerle test örnekleri karşılaştırılarak sonuçlar analiz edilir. Referens örnekten standartlar hazırlanmışsa standart curve analizi yapılarak PCR'in etkinliği saptanır. LightCycler için optimum etkinlik 2.0 olmalıdır. Fakat gerçekte çoğu zaman bu değerden daha düşük bir değer elde edilir.

1. Örneklerle ait elde edilen sonuçlar pozitif ve negatif kontrolle karşılaştırılarak değerlendirilir.
2. Pozitif örneklerde yükselen bir eğri gözlenirken negatif kontrol ve negatif örneklerde dümdüz bir floresans çizgisi izlenmelidir.
3. Bir örneğin pozitif mi yoksa negatif mi olduğunu analiz ederken Ct değeri <30 ise pozitif, Ct değeri 30-35 arasında ise zayıf pozitif, Ct değeri >35 ise ve amplifikasyon eğrisi linear bir yapıda ise negatif olarak kabul edilir.
4. Şüpheli bir durum varsa pozitif olduğu bilinen bir örnekten hazırlanan standart dilusyonları ile şüpheli örnek kullanılarak rRT-PCR yenilenir. Yükselen bir eğri oluşturan en düşük konsantrasyondaki pozitif örnek ile incelenen örnek karşılaştırılarak karar verilir.
5. Floresans data 54°C de 530 kanalında Fam filtresi yardımıyla toplanır.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.4. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.
- ☐ Veterinary Laboratory Agency. PCR protocols for the detection of avian influenza virus (AIV) http://www.defra.gov.uk/vla/science/sci_ai_reflab_prot.htm
- ☐ Roche Applied Science LightCycler 2.0 Instrument Operator's Manual. Software version 4.05.
- ☐ Qiagen One Step RT-PCR kit Handbook
- ☐ Qiam Viral RNA Mini kit Handbook

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN INFLUENZA (AI) VIRUS H5 PROTEİNİNİN REAL TIME RT-PCR İLE TESPİTİ

1. AMAÇ

Avian influenza (AI) H5 virusunun Avrupa-Asya izolatlarının Real-Time PCR ile tespiti yapılması.

2. UYGULAMA ALANI

Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarlarında Avian Influenza A H5 virus suşlarının tespitinde kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

AI: Avian Influenza kanatlıların çok bulaşıcı, viremi ile seyreden akut seyirli ve zoonoz karakterde olan bir hastalıdır.

CAS: Korio-allantoik sıvı

rRT-PCR: Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

RNA: Ribonükleik Asit

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Avian Influenza Hastalığı şüphesi ile gelen kanatlı hayvanlardan alınan Avrupa-Asya orijinli H5 Avian Influenza virus suşlarının Real-Time RT-PCR testi ile tespiti için kullanılır. AI H5 suşunun tespiti için oldukça hızlı, hassas ve spesifik bir metottur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

- ☐ **Test Materyali;** İnfektif korio-allantoik sıvı, trakeal, kloakal sıvı, organ homojenatı
- ☐ Ölü kanatlılardan alınan örnekler; trakeal, oro-farengeal, kloakal sıvı ve organ örnekleridir. Organ örnekleri hazırlanırken solunum sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, sindirim sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, beyin ise ayrı olarak işlenir.
- ☐ Canlı kanatlılardan alınan örnekler, trakeal, oro-farengeal ve kloakal sıvılardır. Küçük ve narin kanatlılarda sıvı ile örneği almak hayvana zarar verebileceğinden taze dışkı virus izolasyonu için bir alternatif olabilir. Alınan sıvı örnekleri VTV (pH 7.2–7.4) içerisinde, soğuk zincirde en seri şekilde çalışmanın yapılacağı laboratuvara gönderilir.

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Biyogüvenlik Kabini (Class II tip)
- ☐ Mikrosantrifüj
- ☐ Light Cycler 2.0
- ☐ Software
- ☐ Vortex karıştırıcı
- ☐ Derin Dondurucu ($-20\pm5^{\circ}\text{C}$, $-70\pm5^{\circ}\text{C}$)
- ☐ Buzdolabı
- ☐ 1.5 ml mikrosantrifüj tüpü
- ☐ Tek kanallı Mikropipetler; değişik volümde
- ☐ Otomatik pipet kontroller
- ☐ Tek kullanımlık steril pipetler
- ☐ Mikropipet uçları (bariyerli)
- ☐ Mikrosantrifüj tüpleri için uygun büyüklükte sehpa
- ☐ Steril cryovialler ve eppendorf tüpler
- ☐ Steril santrifüj tüpleri

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ RNA ekstraksiyon kiti
- ☐ One Step RT-PCR Kiti
- ☐ RRT-PCR kiti
- ☐ Etkin dezenfektan
- ☐ **primerler ve prob** (dejenere nukleotidler koyu renk gösterilmiştir)

H5LH1: ACA TAT GAC TAC CCA CAR TAT TCA G

H5RH1: AGA CCA GCT AYC ATG ATT GC

H5PRO: FAM – TCW ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA – TAMRA

H5 Real Time PCR master mix

Bu protokol OneStep RT-PCR kit (Qiagen, cat # 210212) kullanılarak yapılmaktadır. Kit içerisinde bulunmayan reagentler diğer sağlayıcılardan tedarik edilebilir. Aşağıda verilen volümler 10x25 µl reaksiyon için yeterlidir, yani Master Mix 10x23 µl volume bölünür ve her birine 2 µl ekstrakte edilen RNA eklenir.

PCR Bileşeni	Final Hacim
DEPC su (RNase- free)	137.5 µl
(x5) Qiagen OneStep RT PCR buffer	50 µl
Rox ref.boya (Stratagene stoktan DEPC su ile 1:500 ön dilüe edilmiş)	3.75 µl
Qiagen dNTP mix	10 µl
H5LH1 (50µM)	2 µl
H5RH1 (50µM)	2 µl
H5PRO (30µM)	2.5 µl
25 mM magnesium chloride	12.5 µl
RNAsin (40U/µl)	1 µl
OneStep RT-PCR Enzim mix (Qiagen Kit)	10 µl
Toplam	231.25 µl

H5 Kontrolleri:

Negatif kontrol

En az iki “no template kontrol” (NTC) olmalıdır. Bu amaçla iki tüpe RNA yerine 2 µl RNase free su eklenmelidir.

Pozitif kontrol

Miktarı belirlenmiş H5 örneği örn. inaktive edilmiş, liyofilize H5N1 A/chicken/Scotland/59 ekstraksiyon kontrolü olarak kullanılabilir.

7.4. Prosedür / Metot

PCR master mix'in hazırlanması ve yüklenmesi

- Master mix hazırlanması ve real time için yüklenmesi PCR temiz odada yapılmalıdır.
- Test edilecek örnekler için yeterli miktarda master mix hazırlanmalıdır.

- master mix iyice karıştırılıp hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için 30 saniye santrifüj edilmelidir.
- Real time kapillar tüplere / pleyt'e her bir reaksiyon için 23 µl master mix dağıtılmalıdır.
- Kapillar / pleyt kapakları hafifçe kapatılarak soğuk blok ya da buz üzerinde temiz odadan çıkarılmalı ve PCR yapılan alanda RNA örnekleri ve kontroller eklenmelidir.

H5 RNA kontrollerinin hazırlanması

- H5 pozitif kontrol olarak kullanılacak örneğin RNA'sı kit kullanım kılavuzunda belirtildiği şekilde ekstrakte edilir.
- Her H5 Real Time testinde aynı pozitif kontrol örneğinden iki adet kullanılmalıdır.

Örneklerin ve standartların ilavesi

Her bir kapillar / pleyt gözündeki bulunan 23 µl master miks üzerine 2 µl ekstrakte edilmiş RNA örneği ilave edilir.

Bu aşamada örnekler arasında çapraz bulaşmadan kaçınmak için dikkat edilmelidir. Eldivenler sıklıkla değiştirilmeli RNA içeren pipet uçlarını yanlış kapillar / tüp / pleyt gözlerine değdirilmemelidir.

Real Time PCR kontrol tüplerine 2 µl kontrol örneklerinden ilave edilir.

RNA ilave edilen tüplerin kapakları kapatılır.

Real Time ekipmanına yerleştirilmeden önce tüplerin kapaklarının doğru şekilde ve sıkıca kapatılmış olmasına dikkat edilmelidir.

Test hemen başlatılmıyacaksa tüpler test edilinceye kadar buzda bekletilmelidir.

Reverse transcription (RT) işlemi ve PCR

Real-Time tüpleri uygun Real Time ekipmanına yerleştirilir.

Reaksiyon aşağıdaki döngü profili ile inkube edilir.

cDNA sentezi:	50°C'de	30 dk.	1 döngü
PCR aktivasyonu:	95°C'de	15 dk.	1 döngü
Amplifikasyon:	95°C'de 10 saniye	} 40 döngü	
	54°C'de 30 saniye		
	72°C'de 10 saniye		
Cooling:	40°C'de	30 saniye	1 döngü

Not: Floresan data 54°C'de annealing basamağının sonunda ROX ve FAM filtreleri kullanılarak toplanır.

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

Avrupa-Asya orijinli Avian Influenza A virus H5 Taqman Real Time RT-PCR sonuçları 530 numaralı kanalda okunur. Analize ait floresan bilgileri analiz sırasında ve sonrasında da izlenebilir. Paralel çalışılan örneklerle test örnekleri karşılaştırılarak sonuçlar analiz edilir. Referens örnekten standartlar hazırlanmışsa standart curve analizi yapılarak PCR'ın etkinliği) saptanır. LightCycler için optimum etkinlik 2.0 olmalıdır. Fakat gerçekte çoğu zaman bu değerden daha düşük bir değer elde edilir.

1. Örneklere ait elde edilen sonuçlar pozitif ve negatif kontrolle karşılaştırılarak değerlendirilir.
2. Pozitif örneklerde yükselen bir eğri gözlenirken negatif kontrol ve negatif örneklerde linear bir floresans çizgisi izlenmelidir.
3. Bir örneğin pozitif mi yoksa negatif mi olduğunu analiz ederken Ct değeri <30 ise pozitif, Ct değeri 30-35 arasında ise zayıf pozitif, Ct değeri >35 ise ve amplifikasyon eğrisi linear bir yapıda ise negatif olarak kabul edilir.
4. Şüpheli bir durum varsa pozitif olduğu bilinen bir örnekten hazırlanan standart dilusyonları ile şüpheli örnek kullanılarak rRT-PCR yenilenir. Yükselen bir eğri oluşturan en düşük konsantrasyondaki pozitif örnek ile incelenen örnek karşılaştırılarak karar verilir.
5. Floresans data 54°C'de 530 kanalında FAM filtresi yardımıyla toplanır.

Sonuçları etkileyebilecek faktörler;

- 1- Yetersiz RNA ekstraksiyonu
- 2- RNase kontaminasyonuna dikkat edilmesi
- 3- Kullanılan kitlerin son kullanma tarihlerinin takibi
- 4-Kullanılan kitlere ait üretici firma tavsiyelerine dikkat edilmesi
- 5-Kullanılan su özellikleri
- 6-Plastik ve sarf malzemelerin DNase RNase ve Protease yönünden temiz olması
- 7- Stoklamaların uygun ısı derecelerinde yapılması
- 8- Kontaminasyon önlemlerine dikkat edilmesi
- 9- Probların ışıktan etkilenmesi

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ Laboratory Biosafety Manual - Third Edition (<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>)
- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.4. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.
- ☐ Spackman E, Senne D A, Myers T J, Bulaga L L, Garber L P, Perdue M L, Lohman K, Daum L T, Suarez D L. 2002. Development of a real time reverse transcriptase PCR assay for Type A influenza virus and the avian H5 and H7 Haemagglutination subtypes. J. Clin. Microbiol. 40, 3256-3260
- ☐ Veterinary Laboratory Agency. PCR protocols for the detection of avian influenza virus (AIV) http://www.defra.gov.uk/vla/science/sci_ai_reflab_prot.htm
- ☐ Slomka, M. J., Pavlidis, T., Banks, J., Shell, W., McNally, A., Essen, S., Brown, I. H., 2007. Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005–2006. Avian Dis. 51, 373-377.
- ☐ Roche Applied Science LightCycler 2.0 Instrument Operator's Manual. Software version 4.05.
- ☐ Qiaamp Viral RNA Mini kit Handbook
- ☐ Qiagen OneStep RT-PCR kit Handbook

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN INFLUENZA (AI) VIRUS H7 PROTEİNİNİN REAL TIME RT-PCR İLE TESPİTİ

1. AMAÇ

Avian influenza (AI) H7 virusunun Avrupa-Asya izolatlarının Real-Time PCR ile tespiti yapılıması.

2. UYGULAMA ALANI

Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarlarında Avian Influenza (AI) H7 suşlarının teşhisinde kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

AI: Avian Influenza kanatlıların çok bulaşıcı, viremi ile seyreden akut seyirli ve zoonoz karakterde olan bir hastalığıdır.

CAS: Korio-allantoik sıvı

rRT-PCR: Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

RNA: Ribonükleik Asit

cDNA: Komplementer DNA

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Avian Influenza Hastalığı şüphesi ile gelen kanatlı hayvanlardan alınan materyallerden AI H7 virus suşunun Real Time RT-PCR testi ile tespiti için kullanılır. AI H7 virus suşunun tespiti için oldukça hızlı, hassas ve spesifik bir metottur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal ve transport

- ☐ **Test Materyali;** İnfektif korio-allantoik sıvı, trakeal, kloakal sıvı, organ homojenatı
- ☐ Ölü kanatlılardan alınan örnekler; trakeal, oro-farengeal, kloakal sıvı ve organ örnekleridir. Organ örnekleri hazırlanırken solunum sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, sindirim sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, beyin ise ayrı olarak işlenir.
- ☐ Canlı kanatlılardan alınan örnekler, trakeal, oro-farengeal ve kloakal sıvılardır. Küçük ve narin kanatlılarda sıvı ile örneği almak hayvana zarar verebileceğinden taze dışkı virus izolasyonu için bir alternatif olabilir. Alınan sıvı örnekleri VTV (pH 7.2–7.4) içerisinde, soğuk zincirde en seri şekilde çalışmanın yapılacağı laboratuvara gönderilir.

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Biyogüvenlik Kabini (Class II tip)
- ☐ Mikrosantrifüj
- ☐ LightCycler 2.0
- ☐ Software
- ☐ Vortex karıştırıcı
- ☐ Derin Dondurucu ($-30\pm5^{\circ}\text{C}$, $-70\pm5^{\circ}\text{C}$)
- ☐ Buzdolabı
- ☐ 1.5 ml mikrosantrifüj tüpü
- ☐ Tek kanallı Mikropipetler; değişik volümde
- ☐ Otomatik pipet kontroller
- ☐ Tek kullanımlık steril pipetler
- ☐ Mikropipet uçları (bariyerli)
- ☐ Mikrosantrifüj tüpleri için uygun büyüklükte sehpa
- ☐ Steril cryovialler ve eppendorf tüpler
- ☐ Steril santrifüj tüpleri

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ RNA ekstraksiyon kiti
- ☐ One Step RT-PCR Kiti
- ☐ RRT-PCR kiti
- ☐ Etkin dezenfektan
- ☐ **HA2 H7 Proteini için primerler ve prob;**

- **LH6H7:** 5' – GGC CAG TAT TAG AAA CAA CAC CTA TGA – 3'
- **RH4H7:** 5' – GCC CCG AAG CTA AAC CAA AGT AT – 3'
- **H7pro 11:** 5' – FAM- CCG CTG CTT AGT TTG ACT GGG TCA ATC T – BHQ- 3'
- Bu probun 5'FAM ve 3' Black Hole Quencher (BHQ) ile işaretlidir.

HA2 H7 Real Time PCR master mix

Bu protokolde OneStep RT-PCR kit (Qiagen, cat # 210212) kullanılarak yapılmaktadır. Kit içerisinde bulunmayan reagentler diğer sağlayıcılardan tedarik edilebilir. Aşağıda verilen volümler 10 x reaksiyon için;

PCR Bileşenleri	Final Hacim
DEPC su (RNase- free)	139 µl
(x5) Qiagen OneStep RT PCR buffer	50 µl
Rox ref.boya (Stratagene stoktan DEPC su ile 1:500 ön dilüe edilmiş)	3.75 µl
Qiagen dNTP mix	10 µl
LH6H7 (50µM)	2 µl
RH4H7 (50µM)	2 µl
H7pro 11 (30µM)	1.25 µl
25 mM magnesium chloride	12.5 µl
RNAsin (40U/ µl)	1 µl
OneStep RT-PCR Enzim mix (Qiagen Kit)	10 µl
Toplam	231.5 µl

H7 Kontrolleri:

Negatif kontrol:

En az iki “no template kontrol” (NTC) olmalıdır. Bu amaçla iki tüpe RNA yerine 2 µl RNase free su eklenmelidir.

H7 ekstraksiyon kontrolü (pozitif):

İnaktive edilmiş ve miktarı belirlenmiş H7 örneği. Bu örnek RNA ekstraksiyon kontrolü olarak kullanılır. Bu örneğin Ct değeri önceden belirlenmiş olmalı ve RNA ekstraksiyonunda oluşabilecek bir problemin tespiti açısından tercihen “düşük pozitif” titrelili olmalıdır. “Yüksek pozitif” titrelili örnekler aynı zamanda diğer örnekler için kontaminasyon riski oluşturabilir.

H7 RNA dilusyon serisi:

Herhangibir Avrupa-Asya H7 virusunun bulunduğu CAS'dan X10 katlı seri dilusyon hazırlanır

(en az 4 dilusyon). Bu dilusyon serisi “standartlar” olarak kaydedilir ve H7 Real Time PCR testinin etkinliğini belirlemek için kullanılır. Testte düşük pozitif (RNA izolasyonundan önce AIV H7 örneğinden ~10 EID₅₀/ml ve 100 EID₅₀/ml kullanılması H7 Real Time PCR pozitif/negatif cutoff değerlerinin belirlenmesi için)

7.4. Prosedür / Metot

PCR master mix'in hazırlanması ve yüklenmesi

- Master mix hazırlanması ve real time için yüklenmesi PCR temiz odada yapılmalıdır.
- Test edilecek örnekler için yeterli miktarda master mix hazırlanmalıdır.
- master mix iyice karıştırılıp hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için 30 saniye santrifüj edilmelidir.
- Real time kapillar tüplere / pleyt'e her bir reaksiyon için 23 µl master mix dağıtılmalıdır.
- Kapillar / pleyt kapakları hafifçe kapatılarak soğuk blok ya da buz üzerinde temiz odadan çıkarılmalı ve PCR yapılan alanda RNA örnekleri ve kontroller eklenmelidir.

H7 RNA kontrollerinin hazırlanması

- H7 pozitif kontrol olarak kullanılacak örneğin RNA'sı kit kullanım kılavuzunda belirtildiği şekilde ekstrakte edilir.
- Her H7 Real Time testinde aynı pozitif kontrol örneğinden iki adet kullanılmalıdır.

Örneklerin ve standartların ilavesi

Her bir kapillar / pleyt gözünde bulunan 23 µl master miks üzerine 2 µl ekstrakte edilmiş RNA örneği ilave edilir.

Bu aşamada örnekler arasında çapraz bulaşmadan kaçınmak için dikkat edilmelidir. Eldivenler sıklıkla değiştirilmeli RNA içeren pipet uçlarını yanlış kapillar / tüp / pleyt gözlerine değdirilmemelidir.

Real Time PCR kontrol tüplerine 2 µl kontrol örneklerinden ilave edilir.

RNA ilave edilen tüplerin kapakları kapatılır.

Real Time ekipmanına yerleştirilmeden önce tüplerin kapaklarının doğru şekilde ve sıkıca kapatılmış olmasına dikkat edilmelidir.

Test hemen başlatılmayacaksa tüpler test edilinceye kadar buzda bekletilmelidir.

Reverse transcription (RT) ve PCR

Real Time tüpleri uygun Real Time ekipmanına yerleştirilir.

Reaksiyon aşağıdaki döngü profili ile inkube edilir.

RT aşaması: 30 dakika 50°C
15 dakika 95°C

PCR aşaması: 10 saniye 95°C
30 saniye 54°C
10 saniye 72°C } 40 döngü

Not: Floresan data 54°C'de annealing basamağının sonunda ROX ve FAM filtreleri kullanılarak toplanır.

Testin tamamlanması yaklaşık 2 saat sürer, bu süre kullanılan cihaza bağlı olarak değişebilir.

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

Influenza A virus H7 Taqman Real Time RT-PCR sonuçları 530 numaralı kanalda okunur. Analiz düğmesine basılarak kalitatif analiz seçilir. Analize ait floresan bilgileri analiz sırasında ve sonrasında da izlenebilir. Paralel çalışılan örneklerle test örnekleri karşılaştırılarak sonuçlar analiz edilir. Referens örnekten standartlar hazırlanmışsa standart curve analizi yapılarak PCR'in etkinliği saptanır. LightCycler için optimum etkinlik 2.0 olmalıdır. Fakat gerçekte çoğu zaman bu değerden daha düşük bir değer elde edilir.

1. Örneklerle ait elde edilen sonuçlar pozitif ve negatif kontrolle karşılaştırılarak değerlendirilir.
2. Pozitif örneklerde yükselen bir eğri gözlenirken negatif kontrol ve negatif örneklerde dümdüz bir floresans çizgisi izlenmelidir.
3. Bir örneğin pozitif mi yoksa negatif mi olduğunu analiz ederken Ct değeri <30 ise pozitif, Ct değeri 30-35 arasında ise zayıf pozitif, Ct değeri >35 ise ve amplifikasyon eğrisi linear bir yapıda ise negatif olarak kabul edilir.
4. Şüpheli bir durum varsa pozitif olduğu bilinen bir örnekten hazırlanan standart dilusyonları ile şüpheli örnek kullanılarak rRT-PCR yenilenir. Yükselen bir eğri oluşturan en düşük konsantrasyondaki pozitif örnek ile incelenen örnek karşılaştırılarak karar verilir.
5. Floresans data 54°C'de 530 kanalında FAM filtresi yardımıyla toplanır.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.4. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.
- Spackman E, Sene D A, Myers T J, Bulaga L L, Garber L P, Perdue M L, Lohman K, Daum L T, Suarez D L. 2002. Development of a real time reverse transcriptase PCR assay for Type A influenza virus and the avian H5 and H7 Haemagglutination subtypes. J. Clin. Microbiol. 40, 3256-3260
- Veterinary Laboratory Agency. PCR protocols for the detection of avian influenza virus (AIV) http://www.defra.gov.uk/vla/science/sci_ai_reflab_prot.htm
- Roche Applied Science LightCycler 2.0 Instrument Operator's Manual. Software version 4.05.
- Qiagen One Step RT-PCR kit Handbook
- Qiaamp Viral RNA Mini kit Handbook

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN INFLUENZA A (AI) VİRUSUNUN TEŞHİSİNDE AGAR JEL IMMUNODIFFUSYON (AGID) TESTİ

1. AMAÇ

Kanatlılarda, Avian Influenza Virus (AIV) şüpheli infeksiyonlardan izole edilen viral etkenlerin identifikasyonu ve AI virusuna karşı oluşmuş antikorların tespiti amacı ile kullanılır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu, Avian Influenza şüpheli virus izolatlarının identifikasyonunu ve viral etkenlere karşı oluşan antikorların tespitini Agar Jel Immunodiffusion testi ile yapan tüm Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarında geçerlidir

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların infeksiyonuna yol açma riski nedeni ile infeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

AI: Avian Influenza, kanatlıların çok bulaşıcı, akut seyirli, solunum sindirim ve sinir sistemlerini etkileyen ve zoonoz karakterde olan viral bir hastalıdır.

AGID: Agar Jel Immunodiffusion.

Antikor (Ab): Antikor, çok hücreli hayvansal organizmaların bağışıklık sistemi tarafından; kendi organizmalarına ait olmayan organik yapılara karşı geliştirilen glikoprotein yapısındaki moleküllerdir.

Antijen (Ag): Antijen, vücuda yabancı maddeler girdiği anda bağışıklık sistemince antikor oluşturulmasına neden olan moleküllerdir.

SPF (Specific Pathogen Free) Sürü: Önemli kanatlı hastalıklarının etkenlerini ve bu etkenlere karşı oluşmuş antikorları taşımayan sürü.

PBS: Phosphate Buffered Saline

CAM: Korio-Allantoik Membran

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Agar Jel Immunodiffusion testi, antijen ve antikor moleküllerinin birbirine doğru yayılabildiği jel gibi yarı katı ortamlarda yapılır. Böyle bir ortamda birbirine doğru yayılan antijen ve antikor optimal oranda bulundukları bölgelerde karşılaştıklarında antijen-antikor kompleksi oluşturarak presipitasyon bandı halinde jel içerisinde görünür hal alır.

AGID Test Metodu temel olarak iki şekilde kullanılır;

- ☐ Kan serumunda viral etkenlere karşı oluşan presipitan antikorların varlığını tespit etmek ya da yapılan aşılamalara karşı oluşmuş immun yanıtın seviyesini belirlemek amacıyla kan serumlarının bilinen standart antijenlerle test edilmesi.
- ☐ Virolojik teşhis metodu olarak, hasta ve/veya hastalıktan şüpheli hayvanlardan alınan doku örneklerinden elde edilen homojenatın, izolasyon amacıyla uygun ortamlarda üretilmesi sonucu elde edilen materyal ile bilinen standart pozitif antiserumlar ile test edilmesi.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal ve transport

- ☐ Avian Influenza şüpheli virus izolatu (infekte korio-allantoik sıvı - CAS)
- ☐ Şüpheli serumlar
- ☐ Standart Antijen
- ☐ Standart pozitif ve negatif kontrol serumları

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Değişik ölçülerde petriler,
- ☐ Otomatik pipet ve pipet uçları,
- ☐ Vidalı kapaklı şişeler,
- ☐ delici, ince uçlu kürdan

7.3. Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanması

PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.0-7.2)

Hazırlanması:

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g

Na_2HPO_4 1.15 g (Susuz) veya
2.95 g (12 Sulu)

Steril distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilir ve pH 7.2'ye ayarlandıktan sonra +4°C'de 3 ay süre ile saklanabilir.

Noble Agar Hazırlanması:

- ☐ Testte genellikle 100 ml PBS içerisinde 1 gr Noble agar / Agaroza ve 7.2 gr NaCl eritilerek hazırlanan agar kullanılır.
- ☐ Hazırlanan agar 100 °C' de eritilir ve otoklavda buhar açık şekilde 15 dak. steril edilir veya mikrodalga fırında orta derecede 3-4 dakika iyice erimesi sağlanır.
- ☐ Agar kullanımdan 24 saat önce petrilere dökülerek hazırlanır (9 cm'lik petrilere 20 ml agar döküldüğünde 3 mm yüksekliğinde agar elde edilir). Agar dökülmüş petrilere +4 °C'de 7 güne kadar saklanabilir.

7.4. Numunenin Hazırlanması ve Testin Yapılması

Şüpheli Serumların Hazırlanması

- ☐ 2 ml'lik tüpler içerisinde laboratuvara getirilen kanlar oda ısısında bekletilir.
- ☐ Bu bekleme sürecinde kanın pıhtılaşarak serumunun ayrılması sağlanır (bu süreci kısaltıp kanın hemoliz olmasını engellemek ve kan pıhtılaşmasında serumun rahatça ayrılabilmesini sağlamak için kan pıhtısı ile tüp çeperi arasındaki bağlantı kesilecek şekilde çizilerek oda ısısında bekletilir).
- ☐ Daha sonra serum kan pıhtısından ayrılarak temiz bir tüpe alınır.
- ☐ Non-spesifik reaksiyonları önlemek amacıyla analiz edilecek tüm şüpheli serumlar 56°C'de 30 dak. inaktive edilir.
- ☐ İnaktive edilmiş olan serumlar hemen test edilmeyecekse + 4°C'de saklanır.

Şüpheli Materyalin Hazırlanması

- ☐ Avian Influenza Virus (AIV) enfeksiyonlarından şüphelenilen hayvanlardan alınan organ örneklerinden etken izolasyonu için hücre kültürü veya SPF embriyolu tavuk yumurtasına ekimler yapılır.
- ☐ Yapılan ekimler sonucu elde edilen şüpheli materyalle infekte olmuş allantoik sıvının (antijen) direkt ya da konsantre edilmesiyle veya korio-allantoik membranın ekstraksiyonu ile teste kullanılır.

7.5. Testin Uygulanması

- ☐ Boru şeklinde bir delici yardımıyla çapı 5-7 mm ve çukurlar arası mesafe 2-5 mm olan ortada bir ve kenarlarda altı daire bulunan şablon kullanılarak agar da çukurlar açılır.

- ☐ Çukurlardaki agar bir kürdan ile çukurun duvarlarını zedelemekten dikkatlice çıkarılır.
- ☐ Her çukura eşit miktarda, yaklaşık 0.050 ml test materyali konulur.
- ☐ **Şüpheli serumlar test edilecekse;** Ortaya standart antijen, etraftaki çukurlara şüpheli serumlar ve uygun çukurlara standart pozitif ve negatif kontrol serumları konulur.
- ☐ **Şüpheli materyal test edilecekse;** Ortaya standart pozitif serum, etraftaki çukurlara ise CAM veya hücre kültüründen hazırlanan inokulum ve uygun çukurlara standart pozitif ve negatif kontrol serumları konulur.
- ☐ Tüm bu çalışmalar kayıt edilir.
- ☐ Petriler 22°C-37°C arasında, rutubetli bir ortamda 24–48 saat süre ile inkübe edilir,
- ☐ Presipitin bantları yaklaşık 24–48 saat sonra görülebilir hale gelirler. Ancak bu süre, antikor ve antijenin konsantrasyonlarına bağlı olarak değişebilir.
- ☐ Oluşan presipitin bantlarının değerlendirmesi en iyi şekilde, arkadan ışık verilip koyu bir zemine karşı gözlenerek yapılır.

7.6. Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

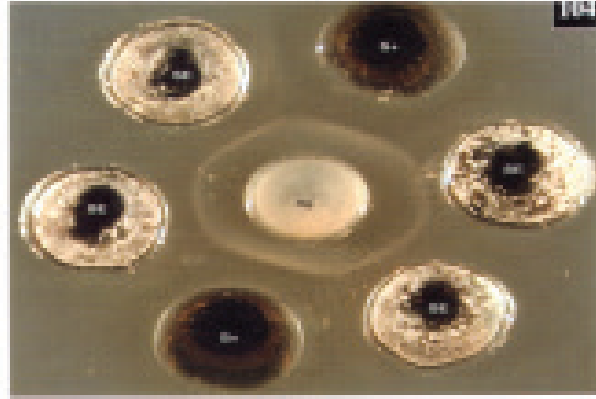
- ☐ Standart antijen/pozitif kontrol serumu ile arasında presipitin bantı oluşan çukurlardaki şüpheli serum/materyal = **Pozitif** (**Şekil 1**) ve (**Şekil 2**),
- ☐ Standart antijen/pozitif kontrol serumu ile arasında presipitin bantı oluşmamış olan çukurlardaki şüpheli serum /materyal = **Negatif** olarak ifade edilir.

Bu sonuçlara göre;

- ☐ Avian Influenza Virusuna karşı oluşmuş olan antikor varlığı/yokluğu tespit edilir.
- ☐ Sahadan izole edilmiş virus izolatlarının identifikasyonu yapılır.
- ☐ Petride uygun çukurlara konulmuş olan standart pozitif serum ile standart antijen arasında oluşan presipitin bantlarının varlığı,
- ☐ Negatif kontrol serum ile standart antijen arasında presipitin bandının oluşmamasına göre değerlendirilir.



Şekil 1. Ortadaki çukurdaki standart antijen ile arasında presipitin bantı oluşan kenarlardaki çukurlardaki şüpheli serumlar **Pozitif** olarak değerlendirilir.



Şekil 2. Ortadaki çukurdaki Standart pozitif serum ile arasında presipitin bantı oluşan kenarlardaki çukurlardaki şüpheli materyal **Pozitif** olarak değerlendirilir.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.4. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN INFLUENZA (AI) VİRUSUNA KARŞI OLUŞMUŞ ANTİKORLARIN ENZYM LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) TESTİ İLE TESPİTİ

1. AMAÇ

Bu test metodu, kanatlılarda Avian Influenza virusuna (AIV) karşı oluşan antikorların ELISA test metodu ile tespiti için yapılmıştır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu, Avian Influenza'dan şüpheli kanatlılarda bu etkene karşı oluşan antikorların tespitini ELISA testi ile yapan Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarında geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

1. Kiti ve tüm reagentları 2-8°C'de muhafaza ediniz.
2. Tüm reagentlar kullanılmadan önce 18-25°C'lik oda sıcaklığına getirilmelidir.
3. Tüm açıklamalar dikkatlice okunup izlenmelidir.
4. Kullanılmamış pleyt gözleri kapatılarak kapalı bir plastik torba içinde 2-8°C'de saklanmalıdır.
5. Farklı serilerdeki (farklı zamanlarda üretilen) kitlerin malzemeleri ve kılavuz kitapçıkları karıştırılmamalıdır.
6. Reagentlarla çalışırken dikkatli olunmalıdır. Son kullanma tarihi geçmiş kit kullanılmamalıdır.
7. Her örnek için ayrı pipet ucu kullanılmalıdır.
8. Her pleyte hem negatif hem de pozitif kontrol kullanılmalıdır.

9. Substrat solüsyonu göz, solunum sistemi ve deri üzerinde tahriş edici etkisi vardır. Deri ve gözlerle temasından kaçınılmalıdır.
10. Stop solüsyonu kuvvetli bir asit olup, yanıklara sebep olabilen H_2SO_4 içerir. Dikkatli çalışılmalıdır.
11. Ağızla pipetleme yapılmamalıdır.
12. Bu kit sadece in-vitro teşhis amacıyla kullanılır.
13. Kit prosedürü takip edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

AI: Avian Influenza, kanatlıların çok bulaşıcı, akut seyirli, solunum sindirim ve sinir sistemlerini etkileyen ve zoonoz karakterde olan viral bir hastalığıdır.

ELISA: Enzym Linked Immunosorbent Assay

Antikor (Ab): Antikor, çok hücreli hayvansal organizmaların bağışıklık sistemi tarafından; kendi organizmalarına ait olmayan organik yapılara karşı geliştirilen glikoprotein yapısındaki moleküllerdir.

Antijen (Ag): Antijen, vücuda yabancı maddeler girdiği anda bağışıklık sistemince antikor oluşturulmasına neden olan moleküllerdir.

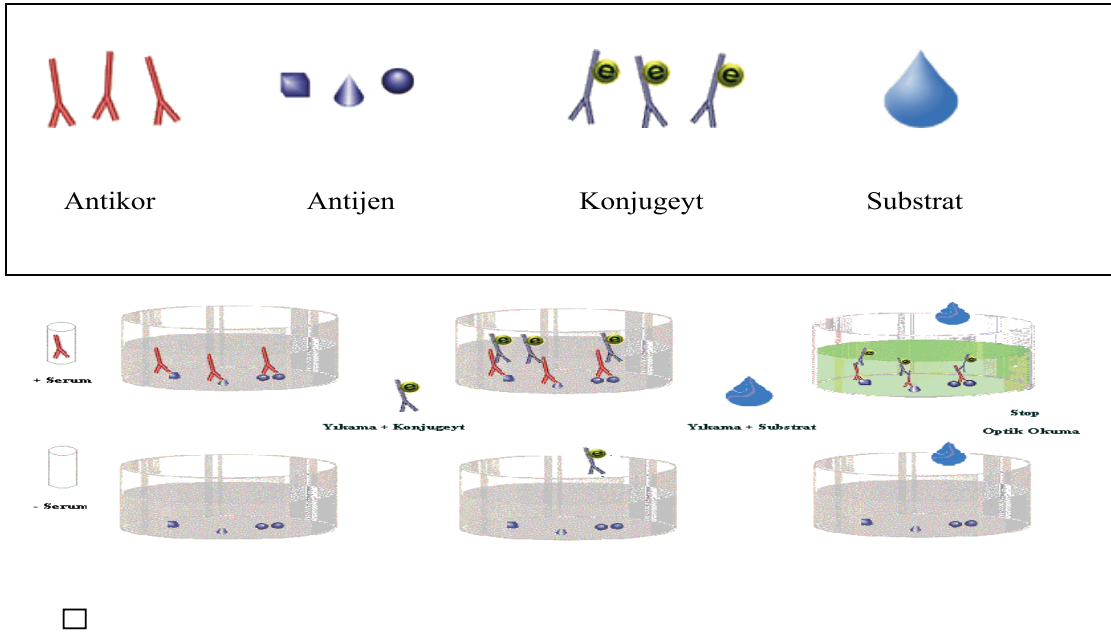
Konjugat: Bir enzim ile işaretlenmiş ikinci ajan, enzim ile işaretlenmiş antiglobülin.

Substrat: Biyokimyada enzimlerin tepkimelerinde işlenen maddelere verilen addır. ELISA da konjugeye bağlı olan enzime özgü alt tabakaya substrat denir. Sisteme (Ag-Ab kompleksi) bağlanmış konjugata bağlı enzim uygun kromojen substratı parçaladığında ortaya çıkan renk, yapılacak kolorimetrik yöntemlerle ölçülerek bağlanmış olan enzim dolayısıyla bağlanmış olan antikor hakkında fikir verecektir.

OD: Optik dansite

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu test metodu, kanatlılarda Avian Influenza virusuna (AIV) karşı oluşan antikorların varlığının ELISA testi ile tespitini anlatır. ELISA, katı bir faza bağlı olarak Antijen-Antikor (Ag-Ab) kompleksinin oluşabilmesi ve enzim ile işaretlenmiş konjugat olarak isimlendirilen ikinci ajan ve uygun bir substrat ile reaksiyon sonucunda renkli son ürün şeklinde Ag-Ab kompleksinin varlığın saptanması için uygulanan test metodudur (**Tablo 2**).



Tablo 2: ELISA Test Metodu'nun Şematik Anlatımı

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

- Test edilecek kanatlı kan serumları

7.2. Kullanılan Ekipman

- 96 gözlü U tabanlı mikropolet
- Otomatik mikropipetler (tek kanallı ve 8–12 kanallı)
- Mikropipet uçları
- ELISA okuyucusu
- Vortex

7.3. Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanması

- ELISA Kiti

ELISA testi yapılırken kullanılacak kit bileşenleri kimyasal ve biyolojik maddelerden oluşur. Bunların bir kısmı kit içerisinde kullanıma hazır halde bulunmaktadır, diğer bir kısmı ise kullanımdan önce hazırlanması gerekir. Kullanımdan önce hazırlanması gereken reagentlerin dilusyonları kit protokolüne uygun olarak hazırlanır. Hazırlanan reagentler kitte belirtilen süre ve sıcaklıkta saklanır.

Teste başlamadan önce bütün gerekli reagentler oda sıcaklığına (21–27°C) gelene kadar bekletilir.

7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

Numunenin Hazırlanması

Testte kullanılacak örnek miktarı, test reagentlerinin kullanım konsantrasyonları ve inkubasyon süreleri, tercih edilen ticari ELISA kitinin protokolüne uygun olarak ayarlanır.

Genel olarak ELISA testinin temel basamakları aşağıda açıklanmıştır. Teste başlamadan önce antijen kaplı ELISA pleytine konulacak kontrol ve test serumlarının pleyt üzerindeki konumu kayıt edilir.

Muayene/Analizin Yapılması

1. **Negatif** ve **Pozitif** kontrol serumlarından kitin protokolüne uygun hacimde ve dilusyonda 2'şer veya 3'er göze (örneğin; A1-A2 negatif kontrol, H11-H12 pozitif kontrol veya A1-A2-A3 pozitif,negatif,pozitif kontrol H10-H11-H12 negatif, pozitif, negatif kontrol olacak şekilde) konulur.
2. **Referans** kontrol serumu 1 veya 2 göze konur. Referans kit kontrol serumları kitin protokolüne uygun hacimde ve dilusyonda kullanılır.
3. ELISA pleytinin kontroller dışındaki her bir gözüne kitin protokolüne uygun hacimde **diluent** konur ve üzerine önceden hazırlanmış olan **dilue serumlardan** belirli hacimde ilave edilerek test serumları kitte belirtilen final sulandırma oranında hazırlanmış olur.
4. Üzeri kapatılmış olan pleyt kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürede **inkube edilir**.
5. Süre sonunda **içerik dökülür** ve ELISA pleytinin her bir gözü test protokolünde önerilen konsantrasyonda hazırlanmış olan yıkama solusyonu ile **3-5 kez yıkanır**.
6. Son yıkamadan sonra pleyt ters çevrilip kurutma kağıdına vurularak kalan solüsyonun iyice emdirilmesi sağlanır.
7. Belirtilen hacimde **Konjugat Solüsyonu** tüm gözlere ilave edilir.
8. Üzeri kapatılmış olan pleyt kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürede **inkube edilir**.
9. **Yıkama prosedürü** 5. ve 6. basamakta anlatıldığı gibi tekrarlanır.
10. Her göze protokole uygun miktarda **Substrat Solusyonu** konur ve kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürede **inkube edilir**.
11. Reaksiyonu durdurmak için her göze belirtilen hacimde **Stop Solusyonu** ilave edilir.
12. Test protokolünde verilen dalga boyunda ELISA okuyucu ile OD değerleri saptanır ve bilgisayar çıktısı alınır. Kit protokolünde verildiği şekilde sonuçlar yorumlanır.

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Test edilen örnekler, pozitif, negatif ve referans kontrol gözleri için okunan OD değerleri ile kit protokolünde ve kitin kalite kontrol sertifikasında verilen OD değerleri karşılaştırılır, geçerli sınırlar içerisinde ise test edilen örnekler pozitif ve negatif şeklinde ifade edilerek kalitatif ve/veya kantitatif olarak değerlendirilir.

Testte kullanılan pozitif, negatif ve referans kontrollerin beklenen standart seviyelerde çıkması halinde test geçerli olarak kabul edilir. Kit protokolünde ve kitin kalite kontrol sertifikasında verilen OD değerleri ile ölçülen OD değerleri karşılaştırılarak testin geçerliliği kontrol edilir.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.4. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.
- ☐ BioChek Test Kiti Kullanım Talimatı
- ☐ Synbioticks Test Kiti Kullanım Talimatı
- ☐ Idexx Kiti Kullanım Talimatı
- ☐ Guildhay Kiti Kullanım Talimatı

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN INFLUENZA (AI) VİRUSUNUN TEŞHİSİNDE HEMAGLUTİNASYON İNHİBİSYON (HI) TEST METODU

1. AMAÇ

Avian Influenza virusunun (AIV) Hemaglutinasyon ve Hemaglutinasyon İnhibisyon (HA-HI) test metodu ile teşhisinin yapılması amaçlanmaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu, AI virusunun teşhisini HA-HI test ile yapan Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarlarında geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

Sertifikalı Referans Standart (SRS): Referans olarak alınan, ölçü, miktar, titre gibi özellikleri bilinen, uluslararası bir kuruluş tarafından izlenebilirliği olan, sertifikalandırılmış kimyasal/ biyolojik madde gibi ürünlerdir.

AI: Avian Influenza, kanatlıların çok bulaşıcı, akut seyirli, solunum sindirim ve sinir sistemlerini etkileyen ve zoonoz karakterde olan viral bir hastalıdır.

HA: Hemaglutinasyon

HI : Hemaglutinasyon-İnhibisyon

HAU: Hemaglutinasyon Ünitesi

OIE: Office International des Epizooties = Dünya Hayvan Sağlık Örgütü

CAS: Korio-allantoik sıvı

PBS: Phosphate Buffered Saline

v/v : Volüm/volüm

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu test metodu, viral kanatlı hastalıkları yönünden şüpheli materyallerden izole edilen hemaglutinasyon aktivite özelliği gösteren viral etkenin (infektif korio-allantoik sıvının), testte kullanılan Sertifikalı Referans Standart (SRS) antiserumların hemaglutinasyonu inhibe etme özelliğinden yararlanılarak Avian Influenza Virusunun varlığı veya yokluğunun saptanmasını anlatır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

- ☐ Test Materyali; 4 HAU' ne ayarlanmış viral etken (İnfektif korio-allantoik sıvı)
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS);
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS) Antijen (AIV-H5)
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS) Antijen (AIV-H7)
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS) Antiserum (AIV-H5)
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS) Antiserum (AIV-H7)

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ 96 gözlü U/V tabanlı mikropleyt
- ☐ 25-50 ml kapasiteli Otomatik Mikropipetler ve uçları
- ☐ Küvetler

7.3. Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanması

Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.2-7.4 Hazırlanması:

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g (Susuz) veya 2.95 g (12 Sulu)

Steril distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilir ve pH 7.2-7.4'e ayarlanır. Testin uygulanması esnasında tampon solüsyon olarak ve aynı zamanda test için gerekli olan eritrosit süspansiyonunun hazırlanması için kullanılır. Buzdolabında (5°C ±3°C) raf ömrü,

şişenin ağzı açılmadıkça hazırlanmasından sonra 2 yıldır.

%1'lik Tavuk Eritrosit Süspansiyonu (v/v) Hazırlanması:

- ☐ 10 ml' lik enjektöre 5 ml kan için 5 ml antikoagulan (eşit hacimde) çekilir,
- ☐ Kan alma hayvanı olarak sağlıklı tavuklar kullanılır. Tavuğun kalbinden veya kanat altı venasından kan alındıktan sonra enjektör yavaşça döndürülerek kanın antikoagulan ile iyice karışması sağlanır.
- ☐ Kan enjektörden santrifüj tüpüne enjektörün iğne kısmı çıkarılmış halde yavaşça aktarılır,
- ☐ Antikoagulanlı kan 1000-1500 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edilir ve ayrılan süpernatant dikkatlice pipetle çekilir.
- ☐ Tüpün dip kısmında kalan eritrositin üzeri PBS ile doldurulur. Daha sonra yavaşça alt üst edilerek kanın PBS ile iyice karışması sağlanır, 5 dakika santrifüj edilir ve üstteki sıvı atılır. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır.
- ☐ Son yıkamadan sonra üstte kalan berrak sıvı dikkatlice alınıp atılır ve dipte kalan eritrosit çökeltisinden 1 ml alınarak 99 ml PBS içerisine katılır. Böylece %1'lik eritrosit süspansiyonu hazırlanmış olur.
- ☐ Hazırlanan eritrosit süspansiyonunun çalışıp çalışmadığının kontrolü için U/V tabanlı mikropleytin kontrol için çalışılacak sıranın gözlerine 25 ml PBS ve üzerine 25 ml %1'lik tavuk eritrosit süspansiyonu konulur.
- ☐ Pleytin kenarlarına hafifçe vurularak PBS ile tavuk eritrosit süspansiyonunun iyice karışması sağlanır ve eritrositlerin çökmesi için yaklaşık $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ de 40 dakika $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 60 dakika beklenir.
- ☐ Çalışılan gözdeki eritrositlerin belirgin bir düğme formasyonu oluşturup, pleyt hafifçe eğimli tutulduğunda gözyaşı akıntısı tarzında şekil oluşturması, hazırlanan eritrosit süspansiyonun HA-HI testinde kullanılabileceğini gösterir.

7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

Numunenin Hazırlanması

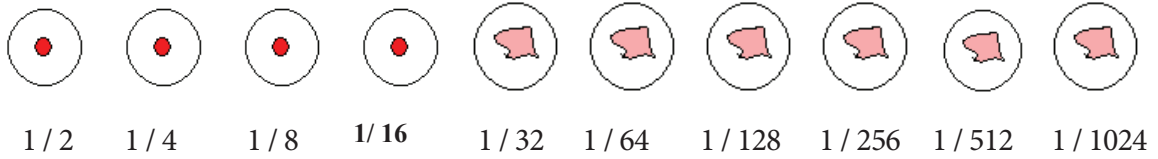
Şüpheli materyallerden izole edilen hemaglutinasyon aktivitesine sahip viral etkenin (infektif korio-allantoik sıvı), 4 HAU' ne ayarlanır. HA test sonucu 4 HAU olan antijen/izolat, HI testinde kullanılır. HA sonucu 4 HAU değil ise, bulunan test sonucuna göre tekrar 4 HAU ayarlanır, tekrar kontrol edildikten sonra HI testine devam edilir.

7.5. Muayene/Analizin Yapılması

Hemaglutinasyon İnhibisyon (HI) Testi

- 1) 96 gözlü V veya U tabanlı mikropleytin çalışılacak tüm gözlerine 25 µl PBS konulur,
- 2) Tiplendirmesi yapılacak virus izolatının çalışılacağı sıralardan 1. sıranın ilk gözüne 25 µl SRS Antiserum (AIV-H5), 2. sıranın ilk gözüne ise 25 µl SRS Antiserum (AIV-H7) konulur,

- 3) SRS Antiserumların iki katlı seri dilusyonları yapılır ve bu sıradaki her bir göze 4 HAU virus süspansiyonundan,
- 4) Pozitif kontrol için ayrılan iki sıradan SRS Antiserum (AIV-H5)'un dilusyonu yapılan sıranın her bir gözüne 4 HAU SRS Antijen (AIV-H5)' den,
- 5) SRS Antiserum (AIV-H7)'un dilusyonu yapılan sıranın her bir gözüne ise 4 HAU SRS Antijen (AIV-H7)' den 25 µl konulur,
- 6) Pleytin kenarlarına hafifçe vurularak iyice karışması sağlanır ve daha sonra yaklaşık 22°C ±3° C'de 15-30 dakika 5°C ±3°C'de 60 dakika beklenir.
- 7) Bekleme süresi bitiminde tüm gözlere %1' lik tavuk eritrositinden 25 µl eklenir ve hafifçe karıştırıldıktan sonra eritrositlerin çökmesi için 22°C±3°C de 40 dakika 5°C ±3°C'de 60 dakika negatif kontrol gözündeki bariz bir düğme formasyonu görülünceye kadar beklenir,
- 8) Bu son bekleme süresi bitiminde ise pleyt gözlemlenerek düğme formasyonu oluşan yani Hemaglutinasyonun inhibe olduğu, HI (+) gözlerin varlığı saptanır (**Şema 1**).
- 9) Virus izolatının, SRS Antiserum (AIV-H5) veya SRS Antiserum (AIV-H7) den biri ile tam olarak inhibisyon göstermesi o antiserum ile HI (+) olduğunu gösterir. Bu sonuçlara göre virus izolatının teşhisi ile ilgili değerlendirme yapılır.



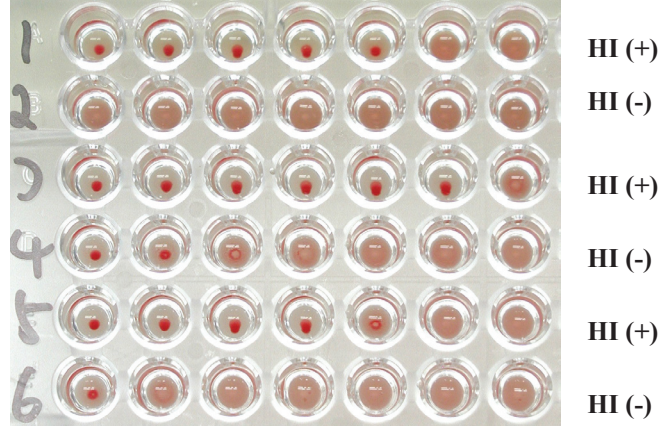
Şema 1 : HI (+) Test Sonucu Şematik Görüntü

Sonuçların kalitatif değerlendirilmesi;

Inhibisyon (düğme formasyonu) olan gözler = **Pozitif**

Inhibisyon (düğme formasyonu) olmayan, dantela tarzında kalan gözler = **Negatif** olarak ifade edilir (**Şema 2**).

HI Test Sonucu



Şema 2 : HI (+) ve HI (-) pleyt görünümü

7.6. Sonuçların değerlendirilmesi

Hemaglutinasyon İnhibisyon (HI) Testi

Negatif kontrol (kan kontrol): Bu sıradaki gözlerde eritrositin antijen ile bağlanıp dantela tarzında kalması,

Pozitif kontrol [(SRS Antiserum (AIV-H5) ve SRS Antijen (AIV-H5))]: Bu sıradaki gözlerin düğme formasyonu verip pleyt eğimli tutulduğunda gözyaşı akıntısı vermesi testin geçerliliğini kanıtlar.

Pozitif kontrol [(SRS Antiserum (AIV-H7) ve SRS Antijen (AIV-H7))]: Bu sıradaki gözlerin düğme formasyonu verip, pleyt eğimli tutulduğunda gözyaşı akıntısı tarzında şekil oluşturması testin geçerliliğini kanıtlar

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- Easterday,B.C., Hinshaw, V. S., Halvorson,D.A. Influenza. Diseases of Poultry, Bölüm 22, 583-605 / 10. Baskı / 1997
- Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.4. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

NEWCASTLE DISEASE VIRUS (NDV) İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU

1. AMAÇ

Newcastle Disease Virus (NDV) izolasyonu ve identifikasyonu işlemlerinin yapılması.

2. UYGULAMA ALANI

Bu prosedür, NDV izolasyonu ve identifikasyonu ile ilgili her türlü analiz/muayene/kontrolü yapan Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarında geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

ND: Newcastle Disease, kanatlıların solunum, sindirim ve sinir sistemlerini etkileyen, oldukça bulaşıcı ve öldürücü karakterde olan viral bir hastalıktır.

PBS : Phosphate Buffered Saline

SPF (Specific Pathogen Free) Sürü: Önemli kanatlı hastalıklarının etkenlerini ve bu etkenlere karşı oluşmuş antikorları taşımayan sürü.

İnokulum: Virus izolasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere organ ve doku örneklerinin parçalanmasıyla, ekim için hazırlanmış olan materyal.

CAB: Korio-allantoik boşluk

CAS: Korio-allantoik sıvı

ETY: Embriyolu tavuk yumurtası

HA: Hemaglutinasyon

HI: Hemaglutinasyon–İnhibisyon

BGS-3: Biyogüvenlik Seviyesi 3

OIE: Office International des Epizooties = Dünya Hayvan Sağlık Örgütü

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu prosedür, Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarına Newcastle Hastalığı şüphesi ile gelen kanatlı hayvanlardan alınan beyin, iç organ örnekleri, dışkı, trakeal ve kloakal sıvı vb. materyallerden viral etkenin izolasyonu ve identifikasyonu için yapılan tüm işlemlerin akış sistemini anlatır.

Avian Influenza Hastalığı ve Newcastle Hastalığının, kanatlılarda oluşturduğu belirtiler bakımından birbirine benzediği, anamnez ve nekropsi bulgularına göre ayırt edilemediği için bu iki hastalık karıştırılır ve ayırıcı tanı için ileri tetkikler gerekir. Bu yüzden şüpheli kanatlıların nekropsi işlemleri, etkenin Avian Influenza Virusu olma ihtimali göz önünde bulundurularak en üst düzeyde biyogüvenlik tedbirleri altında ve her iki hastalık için ortak yol izlenerek yapılır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal ve transport

- ☐ Ölü kanatlılardan alınan örnekler; trakeal, oro-farengeal, kloakal sıvıplar ve organ örnekleridir. Organ örnekleri hazırlanırken solunum sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, sindirim sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, beyin ise ayrı olarak işlenir.
- ☐ Canlı kanatlılardan alınan örnekler, trakeal, oro-farengeal ve kloakal sıvıplardır. Küçük ve narin kanatlılarda sıvıpla örneği almak hayvana zarar verebileceğinden taze dışkı virus izolasyonu için bir alternatif olabilir.

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Biyogüvenlik seviyesi en üst düzeyde hazırlanmış odalar
- ☐ Biyogüvenlik Kabinleri (Class II tip)
- ☐ Santrifüj
- ☐ Kuluçka makinesi
- ☐ Mekanik parçalayıcı cihaz ve tüpleri / ultra turrax / blender
- ☐ Elektrikli/şarjlı pipetor
- ☐ Yumurta kontrol lambası
- ☐ Steril keskin cerrahi makaslar, dişli ve dişsiz pensler
- ☐ Santrifüj tüpleri (15 ml' lik)
- ☐ Embriyolu yumurta için ekim materyali (Yumurta kabuğu delicisi)

- ☐ Steril enjektör (1 veya 2 cc. lik, 0.1 cc. taksimatlı)
- ☐ Tek kullanımlık steril malzeme (pipetler, marazi madde kapları, tüp vb.)

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ Steril PBS (pH 7.0-7.4)
- ☐ Yıkanmış tavuk eritrositi %1 (v/v)
- ☐ Antibiyotik solüsyonu: Penicillin (2000 ünit/ml)-Streptomycin (2 mg/ml), Gentamycin (50 mg/ml) ve Mycostatin (1000 ünite/ml). Dışkı ve kloakal svaplar için bu oranlar 5x hazırlanır.
- ☐ %70'lik Ethanol / Tentürdiyot
- ☐ Yapıştırıcı; uhu, tırnak cilası, eritilmiş parafin vb.
Ayrıca;
- ☐ 9-11 günlük SPF embriyolu tavuk yumurtası.

7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

Numunenin Hazırlanması

Avian Influenza ve/veya Newcastle Hastalığı şüpheli kanatlılarda nekropsi işlemi, **Avian Influenza ve Newcastle Hastalığı Şüpheli Kanatlılarda Nekropsi** prosedürüne göre yapılarak etken izolasyonu için gerekli olan svap ve organ örnekleri alınır. AI virus izolasyonu ve identifikasyonu işlemleri mümkün ise BGS-3 düzeyinde hazırlanmış odalarda, eğer bu mümkün değilse biyogüvenlik seviyesi en üst düzeyde hazırlanmış odalarda ve Class II tip biyogüvenlik kabinlerinde yapılmalıdır.

Muayene/Analizin Yapılması

Hızlı Test

- ☐ Canlı veya ölü kanatlılardan, ikişer adet alınan trakeal, oro-farengeal ve/veya kloakal svap örneklerinden bir adedi hızlı testte kullanılmak üzere işleme alınır. Virus varlığını hızlı bir şekilde tespitini sağlayan bu test **Avian Influenza Viral Antijen Tespitine Dayalı Hızlı Test Metodu'** na göre uygulanır. Hızlı testte AI pozitif çıkan hayvanlara ait örnekler, pozitifliğin teyidini sağlamak ve virus tiplendirmesi amacıyla negatif çıkan hayvanlara ait örnekler gibi aşağıda anlatıldığı şekilde işleme alınır.

Virus İzolasyonu

İnokulum Hazırlama

- ☐ Organ parçalarından hazırlanacak inokulumun mekanik parçalayıcı cihaz kullanarak parçalanması en idealdir. Eğer mekanik parçalayıcı cihaz yoksa, organ parçaları ultra turrax, blender veya steril makas yardımıyla iyice parçalanır.
- ☐ Parçalanmış doku %10-20 (w/v) oranında olacak şekilde hazırlanmış antibiyotik solüsyonu içerisine konur ve iyice karışması sağlanır.
- ☐ Karışım, 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki sıvı alınır.

- ☐ Trakeal, kloakal sıvıplar ve dışkı materyalinden inokulum hazırlanırken, bu materyaller de antibiyotik solüsyonu içine alınır.
- ☐ Dışkı ve kloakal sıvıplar için kullanılacak antibiyotik solüsyonu, antibiyotik miktarı yukarıda verilen oranların 5 katı artırılarak hazırlanır.
- ☐ Süspansiyonlar oda sıcaklığında 60 dakika ya da buzdolabında bir gece bekletilir ve bu süre sonunda işleme alınır. Hemen işleme alınmayacaksa derin dondurucuda muhafaza edilir.
- ☐ Antibiyotik solüsyonunda bekleme süresini tamamlayan süspansiyonlar 3000 rpm'de 10 dakika tekrar santrifüj edilir, üstteki sıvı alınarak inokulum olarak kullanılır.

Embriyolu Yumurtaların Hazırlanması ve İnokulasyonu

SPF Tavuk Yumurtalarının Ön-İnkübasyonu

- ☐ Newcastle Hastalığı Virüsü ETY' da yüksek titrede üremektedir ve bu nedenle izole etmek için tercih edilen metot SPF embriyolu tavuk yumurtasına inokulasyondur. Ön-inkübasyona konacak SPF tavuk yumurtaları 10-15°C'de min. 18 saat max. 10 gün saklanmış olmalıdır.
- ☐ İnkubatöre yerleştirilen yumurtalar, potasyum permanganat + formol ile fumige edilir. İnkubatörde 37.5±0.5°C ve %50-70 nispi nem (RN)'de ön-inkübasyona tabi tutulur.
- ☐ Ön-inkübasyon süresi 9-11 gündür (İnkubatöre konma günü = gün 0).
- ☐ 9-11 gün inkube edilmiş yumurtalar, yumurta kontrol lambası ile karanlık bir ortamda fertilitite ve canlılık muayenesi yapılır ve aşağıda anlatıldığı şekilde ayırt edilir;

Ölü embriyolu yumurtalar: Görülebilir damar yok, açık sarı yumurta sıvısında yüzen embriyo gri-siyah kütle görünümünde,

Fertil olmayan yumurtalar: Embriyonun olmaması, yalnızca yumurta sarısının ayırt edilebilmesi şeklinde gözlenir.

İnokulasyon yerinin belirlenmesi:

- ☐ Fertil olanlarda embriyonun yeri ve yumurtanın hava boşluğu sınırı kurşun kalem ile çizilir. İnokulasyon yeri, embriyonun karşı tarafında, kan damarlarının az olduğu bir noktada, hava boşluğu çizgisinin 2 mm kadar üzerinde işaretlenir.
- ☐ Yumurtalar, hava keseleri üste gelecek şekilde viyollere yerleştirilir ve üzerlerine inokule edilecek materyalin kod numarası yazılır. Her numune için 3-5 yumurta kullanılır.

SPF Embriyolu Tavuk Yumurtasına Ekim

- ☐ Biyogüvenlik kabini içerisinde, inokulasyon noktasını da içine alacak şekilde yumurtaların üst kısımları %70 Ethanol yada seyreltilmiş tentürdiyot ile ıslatılmış pamuk yardımıyla silinerek dezenfekte edilir.
- ☐ İnokulasyonun yapılacağı bölgede daha önce işaretlenmiş noktadan steril delici ile delik açılır.
- ☐ Steril enjektör içerisine alınan inokulum sıvısı, 90°'lik eğim ile, 0.1-0.2 ml miktarında korioallantoik boşluğa enjekte edilir.

- ☐ Açılan delik, bir damla sıvı yapıştırıcı yada eritilmiş parafin ile kapatılır,
- ☐ İnokulasyondan sonraki 24 saatlik gözlem süresinin sonunda ölen embriyolu yumurtalar, kaydedilerek değerlendirmeye alınmaz ve atılır.
- ☐ Yumurtaların 35-37°C'de 4-7 gün inkubasyonuna devam edilir. Bu süre içinde 24 saat aralıklarla yumurtaların canlılık muayenesi yapılır. Ölü veya ölmekte olan embriyoları içeren yumurtalar ve inkubasyon periyodunun sonunda canlı kalan tüm yumurtalar buzdolabında 1 gece bekletilir. Bu sürede ölmeleri ve kan damarlarının çekilmesi sağlanır.

Korio Allantoik Sıvının (CAS) Toplanması

- ☐ Biyogüvenlik kabini içerisinde, steril malzemeler (eğri uçlu makas, pens, pipetler, tüpler vb.) hazırlanır.
- ☐ CAS'ları toplanacak yumurtalar, öncelikle üst kısımları %70 Ethanol yada seyreltilmiş tentürdiyot ile ıslatılmış pamuk yardımıyla silinerek dezenfekte edilir.
- ☐ Hava kesesini belirleyen çizginin 1-2 mm üzerinden makas yardımı ile kesilerek yumurta kabuğu kaldırılır
- ☐ Hava boşluğunu sınırlayan yumurta zarı, yumurta sarısına zarar verilmeden açılır.
- ☐ Elektrikli pipettor ve pipet yardımıyla korio-allantoik sıvı (CAS), yumurta sarısına zarar verilmeden toplanır.
- ☐ Toplanan sıvı eritosit ve hücre birikintilerinin uzaklaştırılması amacıyla 3000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilir.
- ☐ Ayrıca, Avian Influenza ve Newcastle hastalığı virusları çok sınırlı sayıda hücre kültüründe üremekle birlikte izolasyon çalışmalarında primer hücre kültürlerinden Cıvcıv Embriyo Fibroblast (CEF) hücre kültürü ve devamlı hücre hattı olan Madin Darby Canine Kidney (MDCK) hücre hattı da kullanılır.

Virus İdentifikasyonu

- ☐ Santrifüj edilen korio-allantoik sıvılar **Newcastle Hastalığı Virusunun Teşhisinde HA Test Metodu**'na göre HA aktivitesi varlığı yönünden test edilir. HA aktivitesinin varlığı, yüksek ihtimalle bir Avian Paramyxovirus ile enfeksiyonu gösterir. İzole edilen bu virusun identifikasyonu amacıyla aynı CAS'lara **Newcastle Hastalığı Teşhisinde HI Test Metodu**'na göre işlemlere devam edilir ve tüm yapılan işlemler ve sonuçlar kayıt edilir.
- ☐ Hemaglutinasyon tespit edilemeyen materyallere ait inokulumların, negatif olarak raporlanmadan önce gerekirse ETY'da tekrar pasajları yapılır.
- ☐ Ayrıca alınan sıvı örneklerinden ve SPF ETY'na ekimler sonucu elde edilen allantoik sıvılardan Real-Time PCR testi ile hızlı bir sonuca ulaşılır. Real-Time PCR testi ile elde edilen sonuçların, embriyolu SPF yumurtaya ekim ve HA-HI testi ile doğrulamaları yapılır.

Virusun Virulensinin Belirlenmesi

Newcastle Hastalığı Virusunun izole edilmesi halinde bu hastalığın sürüden en hızlı bir şekilde eradikasyonu yapılmalıdır. Eradikasyon için uygun stratejinin belirlenmesi açısından, izole edilen suşun virulensinin tespit edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle izole edilen viruslar **Intravenöz Patojenite Index Testi (IVPI)**, **Intracerebral Patojenite Index Testi (ICPI)**'ne göre patojenite testlerine tabi tutulur yada virusun fusion (F) proteininin bölünme bölgesinin dizin analizi yapılır.

7.5. Sonuçların değerlendirilmesi

İzole edilen hemaglutinasyon aktivitesi pozitif etkenin standart APMV-1 (NDV) antiserumu ile inhibe edilmesi ya da moleküler testlerde NDV Matrix (M) / polymerase (L) ve fusion (F) proteinine spesifik primerler ile pozitif sonuç vermesi.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

8.1. İç Dokümanlar

- ☐ Avian Influenza ve Newcastle Hastalığı Şüpheli Kanatlılarda Nekropsi Prosedürü
- ☐ Avian Influenza Viral Antijen Tespitine Dayalı Hızlı Test Metodu
- ☐ Newcastle Hastalığı Virusunun Teşhisinde HA Test Metodu
- ☐ Newcastle Hastalığı Virusunun Teşhisinde HI Test Metodu
- ☐ Newcastle Hastalığı Virusunun Teşhisinde Intravenöz Patojenite Index Testi (IVPI)

8.2. Dış Kaynaklı Dokümanlar

- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.14. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf
- ☐ Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- ☐ Easterday, B.C., Hinshaw, V. S., Halvorson, D.A. Influenza. Diseases of Poultry, Bölüm 22, 583-605 / 10. Baskı / 1997
- ☐ Dennis J. Alexandar Newcastle Disease and other Avian Paramyxoviridae Infections. Diseases of Poultry, Bölüm 20, 541-569

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

NEWCASTLE HASTALIĞI VİRUSUNUN (NDV) TEŞHİSİNDE HEMAGLUTİNASYON (HA) TEST METODU

1. AMAÇ

Newcastle hastalığı virusunun (APMV-1/NDV) Hemaglutinasyon ve Hemaglutinasyon İnhibisyon (HA-HI) test metodu ile teşhisinin yapılması amaçlanmaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu, ND virusunun teşhisini HA-HI test ile yapan Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarlarında kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

Sertifikalı Referans Standart (SRS): Referans olarak alınan, ölçü, miktar, titre gibi özellikleri bilinen, uluslararası bir kuruluş tarafından izlenebilirliği olan, sertifikalandırılmış kimyasal/ biyolojik madde gibi ürünlerdir.

ND: Newcastle hastalığı, kanatlıların solunum, sindirim ve sinir sistemlerini etkileyen, oldukça bulaşıcı ve öldürücü karakterde olan viral bir hastalıktır.

APMV-1: Avian Paramyxovirus Tip1

HA: Hemaglutinasyon

HI : Hemaglutinasyon-İnhibisyon

HAU: Hemaglutinasyon Ünitesi

OIE: Office International des Epizooties = Dünya Hayvan Sağlık Örgütü

CAS: Korio-allantoik sıvı

PBS: Phosphate Buffered Saline

SPF: Specific Pathogen Free

v/v : Volüm/volüm

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu test metodu, Newcastle hastalığı virusunun varlığı yönünden şüpheli materyalden SPF embriyolu tavuk yumurtasına inokulasyon yöntemi ile elde edilen infektif korio-allantoik sıvının, hemaglutinasyon aktivite özelliğinin varlığı veya yokluğunun saptanmasını anlatır.

Newcastle hastalığı virusunun varlığı veya yokluğunun saptanması; Hemaglutinasyon aktivite özelliği gösteren CAS ve testte kullanılan Sertifikalı Referans Standart (SRS) antiserumların hemaglutinasyonu inhibe etme özelliğinden yararlanılarak saptanır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

- ☐ Test Materyali; İnfektif korio-allantoik sıvı
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS);
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS) Antijen [APMV-1(NDV)]
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS) Antiserum [APMV-1(NDV)]

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ 96 gözlü U/V tabanlı mikropleyt
- ☐ 25-50 ml kapasiteli Otomatik Mikropipetler ve uçları
- ☐ Küvetler

7.3. Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanması

Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.2-7.4 Hazırlanması:

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g (Susuz) veya 2.95 g (12 Sulu)

Steril distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilir ve pH 7.2-7.4' e ayarlanır. Testin uygulanması esnasında tampon solüsyon olarak ve aynı zamanda test için gerekli olan eritrosit süspansiyonunun hazırlanması için kullanılır. Buzdolabında (5°C ±3°C) raf ömrü, şişenin ağzı açılmadıkça hazırlanmasından sonra 2 yıldır.

%1'lik Tavuk Eritrosit Süspansiyonu (v/v) Hazırlanması:

- ☐ 10 ml' lik enjektöre 5 ml kan için 5 ml antikoagulan (eşit hacimde) çekilir,
- ☐ Kan alma hayvanı olarak sağlıklı tavuklar kullanılır. Tavuğun kalbinden veya kanat altı venasından kan alındıktan sonra enjektör yavaşça döndürülerek kanın antikoagulan ile iyice karışması sağlanır.
- ☐ Kan enjektörden santrifüj tüpüne enjektörün iğne kısmı çıkarılmış halde yavaşça aktarılır,
- ☐ Antikoagulanlı kan 1000-1500 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edilir ve ayrılan süpernatant dikkatlice pipetle çekilir.
- ☐ Tüpün dip kısmında kalan eritrositin üzeri PBS ile doldurulur. Daha sonra yavaşça alt üst edilerek kanın PBS ile iyice karışması sağlanır, 5 dakika santrifüj edilir ve üstteki sıvı atılır. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır.
- ☐ Son yıkamadan sonra üstte kalan berrak sıvı dikkatlice alınıp atılır ve dipte kalan eritrosit çökeltisinden 1 ml alınarak 99 ml PBS içerisine katılır. Böylece %1'lik eritrosit süspansiyonu hazırlanmış olur.
- ☐ Hazırlanan eritrosit süspansiyonunun çalışıp çalışmadığının kontrolü için U/V tabanlı mikroyektin kontrol için çalışılacak sıranın gözlerine 25 ml PBS ve üzerine 25 ml % 1'lik tavuk eritrosit süspansiyonu konulur.
- ☐ Pleytin kenarlarına hafifçe vurularak PBS ile tavuk eritrosit süspansiyonunun iyice karışması sağlanır ve eritrositlerin çökmesi için yaklaşık 22°C ±3°C'de 40 dakika 5°C ±3°C'de 60 dakika beklenir.
- ☐ Çalışılan gözdeki eritrositlerin belirgin bir düğme formasyonu oluşturup, pleyt hafifçe eğimli tutulduğunda gözyaşı akıntısı tarzında şekil oluşturması, hazırlanan eritrosit süspansiyonun HA-HI testinde kullanılabileceğini gösterir.

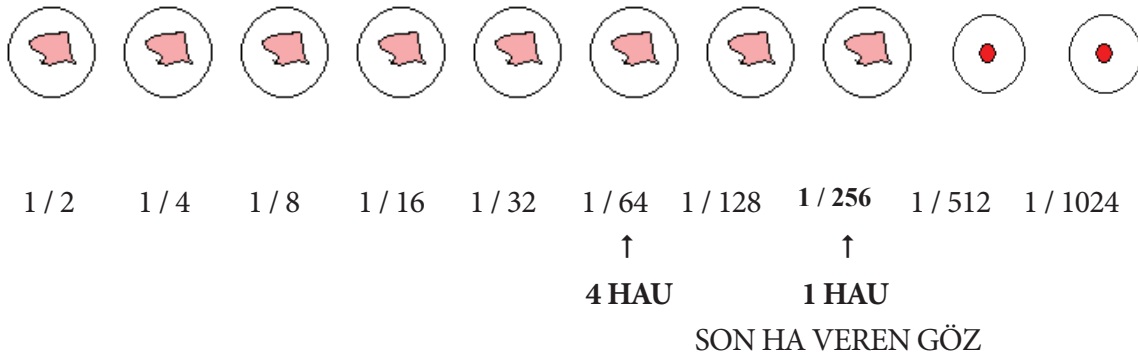
Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

Şüpheli materyallerden izole edilen hemaglutinasyon aktivitesine sahip viral etkenin (infektif korio-allantoik sıvı), 4 HAU'ne ayarlanması;

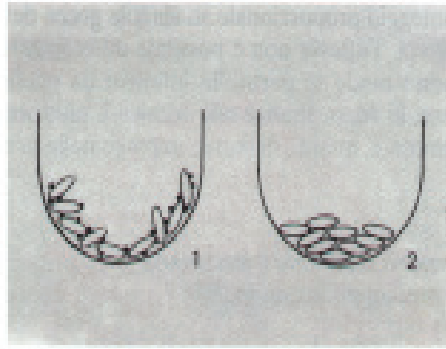
Hemaglutinasyon (HA) Testi

- 1) 96 gözlü V veya U tabanlı mikroyektin çalışılacak gözlerine 25 µl PBS konulur,
- 2) İlk göze 25 µl infektif allantoik sıvı ilave edilir ve iki katlı dilüsyonu yapılarak son göze kadar gidilir.
- 3) Dilüsyon yapılan tüm gözlere tekrar 25 µl PBS ilave edilir,

- 4) Aynı gözlere 25 µl % 1' lik yıkanmış tavuk eritrositi konulur,
- 5) Negatif kontrol (kan kontrol) için ayrılan sıradaki gözlere 25 ml PBS ve üzerine 25 ml % 1' lik tavuk eritrosit süspansiyonu ilave edilir,
- 6) Pleytin kenarlarına hafifçe vurularak iyice karışması sağlanır ve reaksiyonun şekillenmesi için yaklaşık $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ de 40 dakika / $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ' de 60 dakika ya da kontrol gözündeki eritrositler belirgin bir düğme formasyonu oluşturana kadar beklenir.
- 7) Bekleme süresi sonunda pleyt gözlemlenerek dantela tarzında kalan yani Hemaglutinasyon şekillenen gözlerin varlığı saptanır. HA pozitif reaksiyonu tanımlama, HA (+) virus izolatına ait sıranın dantela tarzında kalan son gözü %100 HA veren göz olarak kabul edilir. Bu son göz 1 HA Unitesini temsil eder (Şema 1) ve (Şema 2).



Şema 1 : HA (+) Test Sonucu Şematik Görüntü (4 HAU Hesaplanması)



1. HA (+) 2. Eritrosit Kontrolü

Şema 2: Hemaglutinasyon Oluşma Mekanizması

Sonuçların kalitatif değerlendirilmesi;

Hemaglutinasyon şekillenen (dantela tarzında kalan) gözler = **Pozitif**

Hemaglutinasyon şekillenmeyen (düğme formasyonu oluşan) gözler = **Negatif** olarak ifade edilir.

4 HAU ayarlanması;

- 1 HAU' si belirlenmiş tiplendirmesi yapılacak HA (+) virus izolatı (infektif CAS) ve pozitif kontrol olan SRS Antijen [APMV-1(NDV)], 4 HAU' ne (Şema 1)' de gösterildiği ve aşağıda anlatıldığı gibi ayarlanır.

Örn: 1 HAU = 1 / 256 olan bir antijen/izolattan 4 HAU hazırlanmak için ;

1. $256 : 4 = 64$, 63 ml PBS + 1ml HA (+) virus süspansiyonu ilave edilerek dilüsyon hazırlanır.
2. 4 HAU' ne ayarlanan HA (+) virus izolatu ve SRS Antijen [APMV-1(NDV)]' in kontrolü için, aynı pleytte her örnek için paralel iki sıra olacak şekilde HA testi yapılır.
3. HA test sonucu 4 HAU olan antijen/izolat, HI testinde kullanılır. HA sonucu 4 HAU değil ise, bulunan test sonucuna göre tekrar 4 HAU ayarlanır, tekrar kontrol edildikten sonra HI testine devam edilir.

7.4. Sonuçların değerlendirilmesi

Negatif kontrol (kan kontrol): Bu sıradaki gözlerin düğme şeklinde dibe çökmesi ve pleyt eğimli tutulduğunda gözyaşı akıntısı tarzında şekil oluşturması,

Pozitif kontrol (SRS Antijen [APMV-1(NDV)]): Bu sıradaki gözlerde eritrositin antijen ile bağlanıp dantela tarzında kalması, testin geçerliliğini kanıtlar.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- Alexander, D.J. & Senne D.A. (2008a). Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus Infections. *In: Diseases of Poultry*, 12.Baskı, Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. & Swayne D.E., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 75–116.
- Alexander, D.J. & Senne D.A. (2008b), Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviruses. *In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*, Dufour-Zavala L. (Editor in Chief) Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E., Reed W.M, Woolcock P.R., 4th ed., American Association of Avian Pathologists, Athens, GA, 135–141.
- Dennis J. Alexandar Newcastle Disease and other Avian Paramyxoviridae Infections. *Diseases of Poultry*, Bölüm 20, 541-569
- Laboratory Biosafety Manual - Third Edition (<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>)
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.14. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN PARAMYXOVIRUS TİP 1 (APMV-1) SUŞLARININ POLYMERASE (L) GENİ TESPİTİ İÇİN REAL TIME RT-PCR

1. AMAÇ

Avian Paramyxovirus Tip 1 (APMV-1) izolatlarının Real-Time PCR ile tespitinin yapılması.

2. UYGULAMA ALANI

Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarlarında Avian Paramyxovirus Tip -1 suşlarının teşhisinde kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

APMV-1: Avian Paramyxovirus Tip-1 kanatlılarda hafiften şiddetliye kadar değişen farklı formlarda hastalık oluşturan bir virus gurubudur.

ND: Newcastle Hastalığı

CAS: Korio-allantoik sıvı

rRT-PCR: Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

RNA: Ribonükleik Asit

VTV: Viral taşıma vasatı

L geni: Polymerase

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Newcastle hastalığı şüphesi ile gelen kanatlı hayvanlardan alınan materyallerden APMV-1 virus suşunun Real-Time RT-PCR testi ile tespiti için kullanılır. APMV-1 suşunun tespiti için oldukça hızlı, hassas ve spesifik bir metottur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal ve transport

- ☐ Ölü kanatlılardan alınan örnekler; trakeal, oro-farengeal, kloakal sıvaplar ve organ örnekleridir. Organ örnekleri hazırlanırken solunum sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, sindirim sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, beyin ise ayrı olarak işlenir.
- ☐ Canlı kanatlılardan alınan örnekler, trakeal, oro-farengeal ve kloakal sıvaplardır. Küçük ve narin kanatlılarda sıvapla örneği almak hayvana zarar verebileceğinden taze dışkı virus izolasyonu için bir alternatif olabilir. Alınan sıvap örnekleri VTV (pH 7.2–7.4) içerisinde, soğuk zincirde en seri şekilde çalışmanın yapılacağı laboratuvara gönderilir.

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Biyogüvenlik Kabini (Class II tip)
- ☐ Mikrosantrifüj
- ☐ LightCycler 2.0
- ☐ Software
- ☐ Vortex karıştırıcı
- ☐ Derin Dondurucu ($-30\pm5^{\circ}\text{C}$, $-70\pm5^{\circ}\text{C}$)
- ☐ Buzdolabı
- ☐ 1.5 ml mikrosantrifüj tüpü
- ☐ Tek kanallı Mikropipetler; değişik volümde
- ☐ Otomatik pipet kontroller
- ☐ Tek kullanımlık steril pipetler
- ☐ Mikropipet uçları (bariyerli)
- ☐ Mikrosantrifüj tüpleri için uygun büyüklükte sehpa
- ☐ Steril cryovialler ve eppendorf tüpler
- ☐ Steril santrifüj tüpleri

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ RNA ekstraksiyon kiti
- ☐ One Step RT-PCR Kiti
- ☐ RRT-PCR kiti
- ☐ Etkin dezenfektan

APMV-1 Proteini için primerler ve prob;

- **NDF** : GAGCTAATGAACATTCTTTC

- **NDR**: AATAGGCGGACCACATCTG

- **NDpro1** [FAM] TCATTCTTTATATAGAGGTATCTTCATCATA [BHQ1]

- **NDpro2** [FAM] TCATACACTATTATGGCGTCATTCTT [BHQ1]

* Bu probun 5'FAM ve 3' Black Hole Quencher (BHQ) ile işaretlidir.

NDV rRT - PCR Kontrolleri:

No template control

Sadece master mix içeren en az bir no template kontrol olmalıdır. “NTC” olarak kodlanır. Bu master mix'in kontaminasyonunun kontrolü içindir.

Negatif ekstraksiyon kontrol

En az bir negatif ekstraksiyon kontrolü olmalıdır. Bu kontrol örneğin çalışılması esnasında oluşabilecek çapraz bulaşmanın kontrolü içindir.

Pozitif ekstraksiyon kontrolleri

Bir adet avirulent APMV-1 (örn. Ulster) ve bir adet virulent bir APMV-1 (örn. AG68) olmak üzere en az iki pozitif ekstraksiyon kontrolü olmalıdır. Bunların Ct değerleri 28-32 arasında olacak şekilde ön dilüsyonları yapılmalıdır. Bu kontroller RNA ekstraksiyonunun etkinliğini görmek içindir.

Pozitif RNA kontrolleri

Önceden hazırlanmış ve Ct değeri 28-32 arasında ayarlanmış olan pozitif RNA örnekleri kullanılır. Cihazın programında “Standartlar” olarak kaydedilir. Bu kontroller master mix'in performansının görülmesi içindir.

7.4. Prosedür / Metot

Kontrollerinin hazırlanması

- ☐ Bir kez kullanılacak şekilde hazırlanmış ve saklanmış olan iki adet pozitif ekstraksiyon kontrolü testte kullanılmak üzere Ct değeri 30 dolayında olacak şekilde sulandırılır.
- ☐ Viral RNA'dan aşağıdaki şekilde iki adet pozitif RNA kontrolü hazırlanır.
 - Virulent ve avirulent APMV-1'den ekstrakte edilen RNA'ların 10 katlı seri dilüsyonlar hazırlanır ve rRT-PCR ile test edilir.
 - Her iki virusa ait RNA Ct değeri 28-32 arasında olacak şekilde 5µl/ml RNasin içeren AE elusyon buffer (Qiagen RNA elution buffer) ya da benzeri ile kullanılarak sulandırılır.
 - Her iki RNA dilüsyonundan 10 µl miktarında porsiyonlanarak üzerleri virulent ve avirulent olarak etiketlenir ve -70°C'de saklanır. Bunlar virulent ve avirulent RNA kontrolleridir.

- Her iki kontrol grubundan birer porsiyon alınarak önce kullanılmış olan seri ile birlikte test edilir. Üzerlerine seri no ve Ct değeri yazılarak stoklanır.
- **Bu Ct değeri beklenen sonuç değeridir ve bu yapılan testlerin geçerliliğini değerlendirmede kullanılır.**
- Sonuçlar uygun şekilde kaydedilir.

NDV Real-Time PCR Mastermix

PCR Bileşeni	Final Hacim
DEPC H ₂ O (RNase- free)	7 µl
(x5) Qiagen OneStep RT PCR buffer	5 µl
ROX ref.boya (Stratagene stoktan DEPC su ile 1:500 ön dilue edilmiş)	1 µl
dNTP mix (Her biri 10 µM)	1 µl
NDF (12.5µM)	1 µl
NDR (12.5µM)	1 µl
ND Pro1 (5µM –TE buffer içinde)	1 µl
ND Pro2 (5µM –TE buffer içinde)	1 µl
25 mM MgCl ₂	3 µl
RNAasin (40U/ µl) (1/10 sulandırılmış)	1 µl
OneStep RT-PCR Enzim mix (Qiagen Kit)	1 µl

- ☐ Mastermix hazırlanırken tüm reagentler tamamen erimiş ve iyice karışmış olmalı ve test sayısı için yeterli miktarda olmalıdır.
- ☐ Mastermix iyice karıştırıldıktan sonra her örnek için 23 µl olacak şekilde kapıllar / tüp / pleyt dağıtılmalıdır.
- ☐ Kapakları hafifçe kapatılmalıdır
- ☐ Örnekler temiz odadan alınıp ve PCR yapılan alanda üzerlerine RNA örnekleri ve kontroller ilave edilmelidir.

Örneklerin ve kontrollerin ilavesi

Her bir kapıllar / pleyt gözünde bulunan 23 µl mastermixs üzerine 2 µl ekstrakte edilmiş RNA örneği ilave edilir.

Bu aşamada örnekler arasında çapraz bulaşmadan kaçınmak için dikkat edilmelidir. Eldivenler sıklıkla değiştirilmeli RNA içeren pipet uçlarını yanlış kapıllar / tüp / pleyt gözlerine değdirilmemelidir.

- mastermix iyice karıştırılıp hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için 30 saniye santrifüj edilmelidir.

Test hemen başlatılmıyacaksa tüpler test edilinceye kadar buzda ya da +4°C'de bekletilmelidir.

Reverse transcription (RT) ve PCR

Real Time tüpleri uygun Real Time ekipmanına yerleştirilir.

Reaksiyon aşağıdaki döngü profili ile inkube edilir.

RT aşaması:	30 dakika 50°C	
	15 dakika 95°C	
PCR aşaması	10 saniye 95°C	} 40 döngü
	30 saniye 50°C	
	30 saniye 72°C	

Not: Floresan data 50°C'de annealing basamağının sonunda okunur.

Sonuçlar uygun bir dosyaya kaydedilir.

7.4. Sonuçların Değerlendirilmesi

Newcastle Diseases M gen Taqman Real Time RT-PCR sonuçları 530 numaralı kanalda okunur. Deney sonuçlarını analiz etmek için analiz düğmesine basılır ve kalitatif analiz seçilir. Analize ait floresan bilgileri analiz sırasında ve sonrasında da izlenebilir. Paralel çalışılan örneklerle test örnekleri karşılaştırılarak sonuçlar analiz edilir. Referens örnekten standartlar hazırlanmışsa standart curve analizi yapılarak PCR'in etkinliği (Efficiency) saptanır. LightCycler için optimum efficiency 2.0 olmalıdır. Fakat gerçekte çoğu zaman bu değerden daha düşük bir değer elde edilir.

Örneklere ait elde edilen sonuçlar pozitif ve negatif kontrole karşılaştırılarak değerlendirilir. Pozitif örneklerde yükselen bir eğri gözlenirken negatif kontrol ve negatif örneklerde dümdüz bir floresans çizgisi izlenmelidir. Bir örneğin pozitif mi yoksa negatif mi olduğunu analiz ederken Ct değeri <30 ise pozitif, Ct değeri 30-35 arasında ise ve sigmoid logaritmik bir eğri ise zayıf pozitif, Ct değeri >35 ise ve amplifikasyon eğrisi linear bir yapıda ise negatif olarak kabul edilir. Şüpheli bir durum varsa pozitif olduğu bilinen bir örnekten hazırlanan standart dilüsyonları ile şüpheli örnek kullanılarak rRT-PCR yenilenir. Yükselen bir eğri oluşturan en düşük konsantrasyondaki pozitif örnek ile incelenen örnek karşılaştırılarak karar verilir. Floresans data 60°C'de 530 kanalında FAM filtresi yardımıyla toplanır

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- Alexander, D.J. & Senne D.A. (2008a). Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus Infections. *In: Diseases of Poultry*, 12.Baskı, Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. & Swayne D.E., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 75–116.
- Alexander, D.J. & Senne D.A. (2008b), Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviruses. *In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*, Dufour-Zavala L. (Editor in Chief) Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E., Reed W.M, Woolcock P.R., 4th ed., American Association of Avian Pathologists, Athens, GA, 135–141.
- Dennis J. Alexandar Newcastle Disease and other Avian Paramyxoviridae Infections. *Diseases of Poultry*, Bölüm 20, 541-569
- Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.14. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf
- Veterinary Laboratory Agency. PCR protocols for the detection of newcastle diseases virus (NDV) http://www.defra.gov.uk/vla/science/sci_ndv_reflab_prot.htm

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN PARAMYXOVIRUS TİP-1 (APMV-1) SUŞLARININ MATRIX (M) PROTEİNİNİN TESPİTİ İÇİN REAL TIME RT-PCR

1. AMAÇ

Avian Paramyxovirus Tip 1 izolatlarının Real-Time PCR ile tespitinin yapılması.

2. UYGULAMA ALANI

Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarlarında Avian Paramyxovirus Tip suşlarının teşhisinde kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların infeksiyonuna yol açma riski nedeni ile infeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

APMV-1: Avian Paramyxovirus Tip 1 kanatlılarda hafiften şiddetliye kadar değişen farklı formlarda hastalık oluşturan virus gurubudur.

ND: Newcastle Hastalığı

CAS: Korio-allantoik sıvı

rRT-PCR: Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

RNA: Ribonükleik Asit

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Newcastle hastalığı şüphesi ile gelen kanatlı hayvanlardan alınan materyallerden APMV-1 virus suşunun Real-Time RT-PCR testi ile tespiti için kullanılır. APMV-1 suşunun tespiti için oldukça hızlı, hassas ve spesifik bir metottur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal ve transport

- ☐ Ölü kanatlılardan alınan örnekler; trakeal, oro-farengeal, kloakal sıvaplar ve organ örnekleridir. Organ örnekleri hazırlanırken solunum sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, sindirim sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, beyin ise ayrı olarak işlenir.
- ☐ Canlı kanatlılardan alınan örnekler, trakeal, oro-farengeal ve kloakal sıvaplardır. Küçük ve narin kanatlılarda sıvapla örneği almak hayvana zarar verebileceğinden taze dışkı virus izolasyonu için bir alternatif olabilir. Alınan sıvap örnekleri VTV (pH 7.2–7.4) içerisinde, soğuk zincirde en seri şekilde çalışmanın yapılacağı laboratuvara gönderilir.

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Biyogüvenlik Kabini (Class II tip)
- ☐ Mikrosantrifüj
- ☐ LightCycler 2.0
- ☐ Software
- ☐ Vortex karıştırıcı
- ☐ Derin Dondurucu ($-30\pm5^{\circ}\text{C}$, $-70\pm5^{\circ}\text{C}$)
- ☐ Buzdolabı
- ☐ 1.5 ml mikrosantrifüj tüpü
- ☐ Tek kanallı Mikropipetler; değişik volümde
- ☐ Otomatik pipet kontroller
- ☐ Tek kullanımlık steril pipetler
- ☐ Mikropipet uçları (bariyerli)
- ☐ Mikrosantrifüj tüpleri için uygun büyüklükte sehpa
- ☐ Steril cryovialler ve eppendorf tüpler
- ☐ Steril santrifüj tüpleri

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ RNA ekstraksiyon kiti
- ☐ One Step RT-PCR Kiti
- ☐ RRT-PCR kiti
- ☐ Etkin dezenfektan

NDV real-time RT-PCR probe and primer dizinleri

Hedef Gen	Primer/prob ismi - Genomic hedef	Dizin
APMV-1 (matrix)	M+4100** (forward primer)	5'-AGTGATGTGCTCGGACCTTC-3'
	M+4169** (matrix prob)	5'[FAM]TTCTCTAGCAGTGGGACAGCCTGC[BHQ]-3'
	M-4220** (reverse primer)	5'-CCTGAGGAGAGGCATTTGCTA-3'

NDV rRT - PCR Kontrolleri:

No template control

Sadece master mix içeren en az bir no template kontrol olmalıdır. “NTC” olarak kodlanır. Bu master mix'in kontaminasyonunun kontrolü içindir.

Negatif ekstraksiyon kontrol

En az bir negatif ekstraksiyon kontrolü olmalıdır. Bu kontrol örneğin çalışılması esnasında oluşabilecek çapraz bulaşmanın kontrolü içindir.

Pozitif ekstraksiyon kontrolleri

Bir adet avirulent APMV-1 (örn. Ulster) ve bir adet virulent bir APMV-1 (örn. AG68) olmak üzere en az iki pozitif ekstraksiyon kontrolü olmalıdır. Bunların Ct değerleri 28-32 arasında olacak şekilde ön dilusyonları yapılmalıdır. Bu kontroller RNA ekstraksiyonunun etkinliğini görmek içindir.

Pozitif RNA kontrolleri

Önceden hazırlanmış ve Ct değeri 28-32 arasında ayarlanmış olan pozitif RNA örnekleri kullanılır. Cihazın programında “Standartlar” olarak kaydedilir. Bu kontroller mastermix'in performansının görülmesi içindir.

7.4. Prosedür / Metot

Kontrollerinin hazırlanması

- ☐ Bir kez kullanılacak şekilde hazırlanmış ve saklanmış olan iki adet pozitif ekstraksiyon kontrolü testte kullanılmak üzere Ct değeri 30 dolayında olacak şekilde sulandırılır.
- ☐ Viral RNA'dan aşağıdaki şekilde iki adet pozitif RNA kontrolü hazırlanır.
 - Virulent ve avirulent APMV-1 'den ekstrakte edilen RNA'ların 10 katlı seri dilusyonlar hazırlanır ve rRT-PCR ile test edilir.
 - Her iki virusa ait RNA Ct değeri 28-32 arasında olacak şekilde 5µl/ml RNasin içeren AE elüsyon buffer (Qiagen RNA elution buffer) ya da benzeri ile kullanılarak sulandırılır.

- Her iki RNA dilusyonundan 10 µl miktarında porsiyonlanarak üzerleri virulent ve avirulent olarak etiketlenir ve -70°C'de saklanır. Bunlar virulent ve avirulent RNA kontrolleridir.
- Her iki kontrol grubundan birer porsiyon alınarak önce kullanılmış olan seri ile birlikte test edilir. Üzerlerine seri no ve Ct değeri yazılarak stoklanır.
- **Bu Ct değeri beklenen sonuç değeridir ve bu yapılan testlerin geçerliliğini değerlendirmede kullanılır.**
- Sonuçlar uygun şekilde kaydedilir.

NDV Real Time PCR master mix

PCR Bileşenleri	Final Hacim
DEPC H ₂ O (RNase- free)	7 µl
(x5) Qiagen OneStep RT PCR buffer	5 µl
ROX ref.boya (Stratagene stoktan DEPC su ile 1:500 ön dilue edilmiş)	1 µl
dNTP mix (Her biri 10 µM)	1 µl
M+4100** (forward primer) (12.5µM)	1 µl
M-4220** (reverse primer)	1 µl
M+4169** (matrix prob)	1 µl
25 mM MgCl ₂	3 µl
RNAsin (40U/µl) (1/10 sulandırılmış)	1 µl
OneStep RT-PCR Enzim mix (Qiagen Kit)	1 µl

- ☐ Mastermix hazırlanırken tüm reagentler tamamen erimiş ve iyice karışmış olmalı ve test sayısı için yeterli miktarda olmalıdır.
- ☐ Mastermix iyice karıştırıldıktan sonra her örnek için 23 µl olacak şekilde kapıllar / tüp / pleyt dağıtılmalıdır.
- ☐ Kapakları hafifçe kapatılmalıdır
- ☐ Örnekler temiz odadan alınıp PCR yapılan alanda üzerlerine RNA örnekleri ve kontroller ilave edilmelidir.

Örneklerin ve kontrollerin ilavesi

Her bir kapıllar / pleyt gözünde bulunan 23 µl master miks üzerine 2 µl ekstrakte edilmiş RNA örneği ilave edilir.

Bu aşamada örnekler arasında çapraz bulaşmadan kaçınmak için dikkat edilmelidir. Eldivenler sıklıkla değiştirilmeli RNA içeren pipet uçlarını yanlış kapıllar / tüp / pleyt gözlerine değdirilmemelidir.

- Mastermix iyice karıştırılıp hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için 30 saniye santrifüj edilmelidir.

Test hemen başlatılmıyacaksa tüpler test edilinceye kadar buzda ya da +4°C'de bekletilmelidir.

Reverse transcription (RT) ve PCR

Real Time tüpleri uygun Real Time ekipmanına yerleştirilir.

Reaksiyon aşağıdaki döngü profili ile inkübe edilir.

RT aşaması:	30 dakika 50°C	
	15 dakika 95°C	
PCR aşaması	10 saniye 95°C	} 40 döngü
	30 saniye 50°C	
	30 saniye 72°C	

Not: Floresan data 50°C'de annealing basamağının sonunda okunur.

Sonuçlar uygun bir dosyaya kaydedilir.

7.5. Sonuçların değerlendirilmesi

Newcastle Diseases M gen Taqman Real Time RT-PCR sonuçları 530 numaralı kanalda okunur. Deney sonuçlarını analiz etmek için analiz düğmesine basılır ve kalitatif analiz seçilir. Analize ait floresan bilgileri analiz sırasında ve sonrasında da izlenebilir. Paralel çalışılan örneklerle test örnekleri karşılaştırılarak sonuçlar analiz edilir. Referens örnekten standartlar hazırlanmışsa standart curve analizi yapılarak PCR'in etkinliği saptanır. LightCycler için optimum etkinlik 2.0 olmalıdır. Fakat gerçekte çoğu zaman bu değerden daha düşük bir değer elde edilir.

Örneklere ait elde edilen sonuçlar pozitif ve negatif kontrolle karşılaştırılarak değerlendirilir.

Pozitif örneklerde yükselen bir eğri gözlenirken negatif kontrol ve negatif örneklerde dümdüz bir floresans çizgisi izlenmelidir.

Bir örneğin pozitif mi yoksa negatif mi olduğunu analiz ederken Ct değeri <30 ise pozitif, Ct değeri 30-35 arasında ise ve sigmoid logaritmik bir eğri ise zayıf pozitif, Ct değeri >35 ise ve amplifikasyon eğrisi linear bir yapıda ise negatif olarak kabul edilir.

Şüpheli bir durum varsa pozitif olduğu bilinen bir örnekten hazırlanan standart dilüsyonları ile şüpheli örnek kullanılarak rRT-PCR yenilenir. Yükselen bir eğri oluşturan en düşük konsantrasyondaki pozitif örnek ile incelenen örnek karşılaştırılarak karar verilir.

Floresans data 60°C'de 530 kanalında Fam filtresi yardımıyla toplanır.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- Alexander, D.J. & Senne D.A. (2008a). Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus Infections. *In: Diseases of Poultry*, 12.Baskı, Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. & Swayne D.E., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 75–116.
- Alexander, D.J. & Senne D.A. (2008b), Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviruses. *In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*, Dufour-Zavala L. (Editor in Chief) Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E., Reed W.M, Woolcock P.R., 4th ed., American Association of Avian Pathologists, Athens, GA, 135–141.
- Dennis J. Alexander Newcastle Disease and other Avian Paramyxoviridae Infections. *Diseases of Poultry*, Bölüm 20, 541-569
- Laboratory Biosafety Manual - Third Edition (<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>)
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.14. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf
- Veterinary Laboratory Agency. PCR protocols for the detection of newcastle diseases virus (NDV)
- http://www.defra.gov.uk/vla/science/sci_ndv_reflab_prot.htm

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

NEWCASTLE HASTALIĞI VİRUSUNUN (NDV) FUSION (F) PROTEİNİNİN REAL-TIME PCR TESTİ İLE TESPİTİ

1. AMAÇ

Klinik örneklerden ve infekte amnioallantoik sıvıdan izole edilen RNA'dan Newcastle Hastalığı virusunun fusion (F) proteininin hızla tespiti yapılmasıdır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu NDV'nin Real-Time PCR testi ile teşhisini yapan Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarında uygulanmaktadır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

APMV-1: Avian paramyxovirus tip 1

ND: Newcastle Hastalığı, kanatlıların solunum, sindirim ve sinir sistemlerini etkileyen, oldukça bulaşıcı ve öldürücü karakterde olan viral bir hastalıktır.

rRT-PCR: Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

RNA: Ribonükleik Asit

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu test metodu, Newcastle Hastalığı Virusu Fusion proteini (F proteini) tespiti için Real-Time PCR testi ile yapılması işlemlerini anlatır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Kullanılan Ekipman

- ☐ Biyogüvenlik Kabini (Class II tip)
- ☐ LightCycler 2.0
- ☐ Mikrosantrifüj
- ☐ Derin Dondurucu (en az -70°C'lik)
- ☐ Mikropipetler (değişik volümde)
- ☐ Mikropipet uçları (steril Rnase free, hava bariyerli)
- ☐ PCR tüpleri (değişik volümde)
- ☐ Vorteks karıştırıcı
- ☐ RNA ekstraksiyon kiti
- ☐ Soğuk Blok
- ☐ Mikrosantrifüj tüpleri için uygun büyüklükte sehpa

7.3. Kimyasallar ve reagentlar

☐ Primerler ve proplar

RT6 CGCAGGATMCAAGRGTCTG

RT7 GGAGGATGTTGGCAGC

VRP1[FAM] CCTATAAAICGITTCTGICTCCTTCC[BHQ1]

ARP3[HEX] CCTATAAGICGICCCTGTITCCC[BHQ1]

Seçmeli Lin 6 probe

ARP6 [HEX] CCTACCAAACGCTCCTGCCGTTC[BHQ1]

NOT: I = inosine

Koyu ve altı çizili baz = Locked nucleic acid (LNA)

Reagentler

Moleküler kalitede su – herhangi bir tedarikçiden

Qiagen 1 step RT-PCR kit – ya da emsal kalitede

Rox referans boya (1/1500) – Stratagene ya da muadili

25mM magnesium chloride – Promega ya da muadili

RNAsin (40U/μl) (ön dilüsyon 1/10) - Promega ya da muadili

NDV rRT-PCR Kontrolleri

No template control

Sadece master mix eklenerek testte en azından bir no template control bulunmalıdır. Bu cihazın programına “NTC” olarak kaydedilmelidir. NTC master mix’in kontaminasyonunun kontrolü için kullanılmaktadır.

Negatif ekstraksiyon kontrolü

Testte en azından bir adet negatif ekstraksiyon kontrolü bulunmalıdır. Bu cihazın programına “NAC” (nonamplification control) olarak kaydedilmelidir. Bu kontroller örneklerin çalışılması esnasında oluşabilecek herhangi bir çapraz bulaşmayı ortaya koymak için kullanılmaktadır.

İki adet pozitif kontrol

Teste; Ct değeri 28-33 arasında olacak şekilde önceden belirli oranda dilüe edilmiş olan, bir adet avirulent APMV-1 (örn. Ulster), bir adet virulent tip PMV-1 (örn. AG68) viruslarını içeren iki adet pozitif ekstraksiyon kontrolleri ilave edilmelidir. Bu kontroller cihazın programına “FAM pozitif kontrol” olarak kaydedilmelidir. Bunlar RNA ekstraksiyonunun etkinliğinin kontrolü için kullanılmaktadır.

İki adet pozitif RNA kontrolü

Teste; Ct değeri 28-33 arasında olacak şekilde önceden belirli oranda dilüe edilmiş ve porsiyonlanmış olan, önceki testlerde pozitif olarak bulunan RNA örnekleri dahil edilmelidir. Bu kontroller cihazın programına “STANDARTLAR” olarak kaydedilmelidir. Bu kontroller, master mix’in performansının kontrolü için kullanılmaktadır.

7.4 Metot

Kontrollerin hazırlanması

Avirulent (örn. Ulster) ve virulent (örn. AG68) suşlarının stok RNA'sı hazırlanır.

Her iki virusun RNA'sının 10 katlı seri dilüsyonları hazırlanır ve rRT-PCR kullanılarak test edilir.

Her iki virusun RNA'sı 28-32 arasında bir Ct değeri oluşturacak şekilde sulandırılır. Sulandırma için 5µl/ml RNasin içeren elüsyon buffer AE (Qiagen RNA elution buffer) ya da muadili kullanılır. Sulandırılmış olan stok RNA'lardan 200 µl'lik porsiyonlar hazırlanır. Virulent ve avirulent karakterdeki bu RNA'lar etiketlendikten sonra -70°C' de saklanır. Bunlar virulent ve ekstraksiyon kontrolleridir.

Her iki RNA dilüsyonundan da 10 µl'lik porsiyonlar hazırlanır. Virulent ve avirulent karakterdeki bu RNA'lar etiketlendikten sonra -70°C'de saklanır. Bunlar virulent ve avirulent pozitif RNA kontrolleridir.

Önceki serinin kontrollerinin yanında, amaca uygun olup olmadığını garanti etmek için, her bir kontrolden bir porsiyon alınarak test edilir. Seri numaraları ve Ct değerleri yazılarak kayda alınır.

PCR Master mix'in hazırlanışı

PCR Master mix'in hazırlanışı ve real-time için kapillarlara/ pleyte yüklenmesi işlemi PCR temiz odada yapılmalıdır.

Reagent	Volüm
Moleküler derecede su (RNase-free)	9 µl
(5x) Qiagen 1 step RT PCR buffer	5 µl
Rox ref dye (moleküler derecede su içerisinde 1/500 oranında dilüe edilmiş) *	1 µl
dNTP mix (10µM her biri)	1 µl
RT6 (10µM moleküler derecede su içerisinde)	1 µl
RT7 (10µM moleküler derecede su içerisinde)	1 µl
VRP1 (5µMTE buffer içerisinde)	7 µl
ARP3 (5µMM TE buffer içerisinde)	1 µl
25mM MgCl ₂ 3µl	3 µl
RNasin (40U/µl) (moleküler derecede su içerisinde 1/10 oranında dilüe edilmiş)	1 µl
Qiagen 1 step RT PCR enzyme mix	1 µl

* Roche LightCycler cihazı kullanıldığında Rox boyasının kullanılmasına gerek yoktur. Onun yerine gerekli miktarda su kullanılmalıdır.

Tüm reagentler uygun şekilde tamamen eritilip karıştırıldıktan sonra tabloda verilen miktarlar kullanılarak test sayısına göre hesaplanarak master mix hazırlanır.

Master mix'in tamamen karışması sağlandıktan sonra bu karışımdan 23µl alınarak tüm real – time PCR kapillar /pleyt gözlerine dağıtılır.

Kapillar / pleyt kapakları gevşek olarak kapatılır.

Master mixin hazırlandığı temiz odanın dışında kapillar / pleyte RNA örnekleri ve kontroller ilave edilir.

Örneklerin ve kontrollerin eklenmesi

Karosel / pleyt yerleşimine göre, test edilen örneklerin RNA'sından 2 µl alınarak 23µl master mix üzerine eklenir.

Bu aşamada örneklerin çapraz bulaşmasından kaçınmak için çok dikkatli olunmalıdır. Öncelikle test örneklerine ait RNA'lar dağıtılmalı, kontrollerin haricindekilerin kapakları kapatılmalıdır. Real-time PCR cihazına konulmadan önce tüm kapillar / pleyt kapaklarının sıkı ve doğru bir şekilde kapanmış olması sağlanmalıdır.

Yerleşim planına uygun olarak kontrollerden (negatif kontrol ekstraksiyonu öncelikle olmak üzere) 2 µl, 23 µl master mix üzerine ilave edilir.

Tüplere hava kabacığı oluşması durumunda, maksimum devirde spin yaparak kabarcığın giderilmesi sağlanır.

Real-time kapillar / pleytleri test edilinceye kadar oda ısısında tutulabilir.. Eğer test edilmeden önce uzun süre bekletilecekse buz üzerinde ya da +4°C'de tutulmalıdır.

Reaksiyonların çalıştırılması

Real-time PCR cihazı açılarak karosel / pleyt cihazın özelliğine göre yerleştirilir.

Real-time yazılım programı açılır ve kapillar/pleyt yerleşim planına göre tüm örnekler kayıt edilir.

FAM ve HEX reporter boya olarak seçilmelidir.

Test örnekleri bilinmeyen olarak kaydedilir. Kontroller ise; sadece master mix olan =NTC, negatif ekstraksiyon=NAC, pozitif ekstraksiyon kontrolleri = FAM pozitif kontrol, virulent pozitif RNA kontrol= Standart, avirulent pozitif RNA kontrol= Standart,olarak kaydedilir.

Test için döngü koşulları;

50°C'de 30 dakika

95°C'de 15 dakika

95°C'de 10 saniye	}	40 döngü
50°C'de 30 saniye		
72°C'de 20 saniye		

30 saniye 50°C'deki final uzatma basamağı (annealing) sonunda floresan okunur.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Bu test çok sonuçlu bir testtir. Bir çift primer tüm APMV-1 izolatlarını amplifiye ederek ve daha sonra değişik problemler tarafından ayırd edilir. Virulent bölünme bölgesine sahip tüm izolatlar FAM problemleri, avirulent izolatlar HEX problemleri ile araştırılır.

Sonuçta; kontroller için rapor edilen Ct değerlerini aşağıdaki şekilde kontrol edilmelidir.

Geçerli bir test için altı NDV RRT-PCR kontrolü aşağıdaki koşullarla örtüşmelidir:

1. Template kontrolü yok – FAM ve HEX kanallarının her ikisinde de “Ct olmamalı ya da Ct ≥ 37 olmalıdır,
2. Negatif ekstraksiyon kontrolü - FAM ve HEX kanallarının her ikisinde de “Ct olmamalı ya da Ct ≥ 37 olmalıdır,
3. İki pozitif ekstraksiyon kontrolü – Her bir ekstraksiyon ekstraksiyon kontrolünün Ct değeri önceden belirlenen Ct değeri serisinin ikisi arasında olmalıdır. Örneğin avirulent virus serisinin önceden belirlenmiş Ct değeri 30 ise ve virulent virus serisinin önceden belirlenmiş Ct değeri

29 ise, geçerli bir testte avirulent HEX Ct 28-32 arasında, FAM kanalında Ct olmamalı, virulent AG68 FAM için 27-31 arasında olmalı ve HEX kanalı için Ct olmamalıdır.

4. İki pozitif RNA kontrolü – RNA kontrollerinin Ct değerleri ekstraksiyon kontrollerinde belirlendiği şekilde önceden belirlenmiş Ct serisinin bu iki Ct değeri arasında olmalıdır.

Pozitif bir örnek <37 Ct değeri oluşturmamalıdır. Negatif sonuçlar Ct oluşturmazlar. Ct değerinin ≥37 Ct olması durumu yorumlanamayacak bir sonuçtur ve doğrulama için testin tekrarlanması gerekir. Tekrarlanan testte de ≥37 bir Ct değeri alınmışsa sonuç negatif olarak raporlanır. Virulent örnekler FAM kanalında pozitif Ct oluştururken, avirulent örnekler HEX kanalında pozitif Ct oluştururlar.

Çalışma pozitif ve negatif kontrollerle çalışılan örneklerin beklenen değerler arasında olup olmamasına göre geçerli sayılır.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- Chad M. Fuller, Lina Brodd, Richard M. Irvine, Dennis J. Alexander and Elizabeth W. Aldous. 2010. Development of an L gene real-time Reverse- Transcription PCR assay for the detection of Avian Paramyxovirus type 1 RNA in clinical samples. Archives of Virology, (2010) 155:817-823
- Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.14. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf
- Qiagen one-step RT-PCR kit Kullanım Kılavuzu

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

NEWCASTLE HASTALIĞI VIRUS (NDV) PATOTİPLERİNİN REAL-TIME PCR TESTİ İLE BELİRLENMESİ

1. AMAÇ

Klinik örneklerden ve infekte amnioallantoik sıvıdan izole edilen RNA'dan Newcastle Hastalığı virusunun fusion (F) proteininin hızla tespitinin yapılmasıdır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu NDV'nin Real-Time PCR testi ile teşhisini yapan Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarında uygulanmaktadır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

APMV-1: Avian paramyxovirus tip 1

ND: Newcastle Hastalığı, kanatlıların solunum, sindirim ve sinir sistemlerini etkileyen, oldukça bulaşıcı ve öldürücü karakterde olan viral bir hastalıdır.

rRT-PCR: Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

RNA: Ribonükleik Asit

F: Fusion Proteini

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu test metodu, Newcastle Hastalığı Virusu Fusion proteini (F proteini) tespitinin Real-Time PCR testi ile yapılması işlemlerini anlatır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

7.1. Materyal ve transport

- ☐ Ölü kanatlılardan alınan örnekler; trakeal, oro-farengeal, kloakal sıvaplar ve organ örnekleridir. Organ örnekleri hazırlanırken solunum sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, sindirim sistemi organlarından alınan örnekler ayrı ayrı veya birlikte, beyin ise ayrı olarak işlenir.
- ☐ Canlı kanatlılardan alınan örnekler, trakeal, oro-farengeal ve kloakal sıvaplardır. Küçük ve narin kanatlılarda sıvapla örneği almak hayvana zarar verebileceğinden taze dışkı virus izolasyonu için bir alternatif olabilir. Alınan sıvap örnekleri VTV (pH 7.2–7.4) içerisinde, soğuk zincirde en seri şekilde çalışmanın yapılacağı laboratuvara gönderilir.

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Biyogüvenlik Kabini (Class II tip)
- ☐ LightCycler 2.0
- ☐ Mikrosantrifüj
- ☐ Derin Dondurucu (en az -70°C'lik)
- ☐ Mikropipetler (değişik volümde)
- ☐ Mikropipet uçları (steril Rnase free, hava bariyerli)
- ☐ PCR tüpleri (değişik volümde)
- ☐ Vorteks karıştırıcı
- ☐ RNA ekstraksiyon kiti
- ☐ Soğuk Blok
- ☐ Mikrosantrifüj tüpleri için uygun büyüklükte sehpa

7.3. Kimyasallar ve reagentlar

☐ Primerler ve probler

RT6 CGCAGGATMCAAGRGTCCTG

RT7 GGAGGATGTTGGCAGC

VRP1[FAM] CCTATAAAICGITTCTGICTCCTTCC[BHQ1]

ARP3[HEX]CCTATAAGICGICCCTGTITCCC[BHQ1]

NOT: I = inosine

Koyu ve altı çizili baz = Locked nucleic acid (LNA)

Reagentler

Moleküler kalitede su – herhangi bir tedarikçiden

Qiagen 1 step RT-PCR kit – ya da emsal kalitede

Rox referans boya (1/1500) – Stratagene ya da muadili

25mM magnesium chloride – Promega ya da muadili

RNAsin (40U/μl) (ön dilüsyon 1/10) - Promega ya da muadili

NDV rRT-PCR Kontrolleri

No template control

Sadece master mix eklenerek testte en azından bir no template control bulunmalıdır. Bu cihazın programına “NTC” olarak kaydedilmelidir. NTC master mix’in kontaminasyonunun kontrolü için kullanılmaktadır.

Negatif ekstraksiyon kontrolü

Testte en azından bir adet negatif ekstraksiyon kontrolü bulunmalıdır. Bu cihazın programına “NAC” (nonamplification control) olarak kaydedilmelidir. Bu kontroller örneklerin çalışılması esnasında oluşabilecek herhangi bir çapraz bulaşmayı ortaya koymak için kullanılmaktadır.

İki adet pozitif kontrol

Teste; Ct değeri 28-33 arasında olacak şekilde önceden belirli oranda dilüe edilmiş olan, bir adet avirulent APMV-1 (örn. Ulster), bir adet virulent tip PMV-1 (örn. AG68) viruslarını içeren iki adet pozitif ekstraksiyon kontrolleri ilave edilmelidir. Bu kontroller cihazın programına virulent suş için “FAM pozitif kontrol”, avirulent suş için “HEX pozitif kontrol” olarak kaydedilmelidir. Bunlar RNA ekstraksiyonunun etkinliğinin kontrolü için kullanılmaktadır.

İki adet pozitif RNA kontrolü

Teste; Ct değeri 28-33 arasında olacak şekilde önceden belirli oranda dilüe edilmiş ve porsiyonlanmış olan, önceki testlerde pozitif olarak bulunan RNA örnekleri dahil edilmelidir. Bu kontroller cihazın programına “STANDARTLAR” olarak kaydedilmelidir. Bu kontroller, master mix’in performansının kontrolü için kullanılmaktadır.

7.4 Metot

Kontrollerin hazırlanması

Avirulent (örn. Ulster) ve virulent (örn. AG68) suşlarının stok RNA'sı hazırlanır.

Her iki virusun RNA'sının 10 katlı seri dilüsyonları hazırlanır ve rRT-PCR kullanılarak test edilir.

Her iki virusun RNA'sı 28-32 arasında bir Ct değeri oluşturacak şekilde sulandırılır. Sulandırma için 5µl/ml RNasin içeren elüsyon buffer AE (Qiagen RNA elution buffer) ya da muadili kullanılır.

Sulandırılmış olan stok RNA'lardan 200 µl'lik porsiyonlar hazırlanır. Virulent ve avirulent karakterdeki bu RNA'lar etiketlendikten sonra -70°C' de saklanır. Bunlar virulent ve ekstraksiyon kontrolleridir.

Her iki RNA dilüsyonundan da 10 µl'lik porsiyonlar hazırlanır. Virulent ve avirulent karakterdeki bu RNA'lar etiketlendikten sonra -70°C' de saklanır. Bunlar virulent ve avirulent pozitif RNA kontrolleridir.

Önceki serinin kontrollerinin yanında, amaca uygun olup olmadığını garanti etmek için, her bir kontrolden bir porsiyon alınarak test edilir. Seri numaraları ve Ct değerleri yazılarak kayda alınır.

PCR Master mix'in hazırlanışı

PCR Master mix'in hazırlanışı ve real-time için kapillarlara/ pleyte yüklenmesi işlemi PCR temiz odada yapılmalıdır.

Reagent	Volüm
Moleküler derecede su (RNase-free)	9 µl
(5x) Qiagen 1 step RT PCR buffer	5 µl
Rox ref dye (moleküler derecede su içerisinde 1/500 oranında dilüe edilmiş) *	1 µl
dNTP mix (10µM her biri)	1 µl
RT6 (10µM moleküler derecede su içerisinde)	1 µl
RT7 (10µM moleküler derecede su içerisinde)	1 µl
VRP1 (5µMTE buffer içerisinde)	7 µl
ARP3 (5µMM TE buffer içerisinde)	1 µl
25mM MgCl ₂ 3µl	3 µl
RNasin (40U/µl) (moleküler derecede su içerisinde 1/10 oranında dilüe edilmiş)	1 µl
Qiagen 1 step RT PCR enzyme mix	1 µl

* Roche LightCycler cihazı kullanıldığında Rox boyasının kullanılmasına gerek yoktur. Onun yerine gerekli miktarda su kullanılmalıdır.

Tüm reagentler uygun şekilde tamamen eritilip karıştırıldıktan sonra tabloda verilen miktarlar kullanılarak test sayısına göre hesaplanarak master mix hazırlanır.

Master mix'in tamamen karışması sağlandıktan sonra bu karışımdan 23µl alınarak tüm real – time PCR kapıllar /pleyt gözlerine dağıtılır.

Kapıllar / pleyt kapakları gevşek olarak kapatılır.

Master mixin hazırlandığı temiz odanın dışında kapıllar / pleyte RNA örnekleri ve kontroller ilave edilir.

Örneklerin ve kontrollerin eklenmesi

Karosel / pleyt yerleşimine göre, test edilen örneklerin RNA'sından 2 µl alınarak 23µl master mix üzerine eklenir.

Bu aşamada örneklerin çapraz bulaşmasından kaçınmak için çok dikkatli olunmalıdır. Öncelikle test örneklere ait RNA'lar dağıtılmalı, kontrollerin haricindekilerin kapakları kapatılmalıdır. Real-time PCR cihazına konulmadan önce tüm kapıllar / pleyt kapaklarının sıkı ve doğru bir şekilde kapanmış olması sağlanmalıdır.

Yerleşim planına uygun olarak kontrollerden (negatif kontrol ekstraksiyonu öncelikle olmak üzere) 2 µl, 23 µl master mix üzerine ilave edilir.

Tüplere hava kabacığı oluşması durumunda, maksimum devirde spin yaparak kabarcığın giderilmesi sağlanır.

Real-time kapıllar / pleytleri test edilinceye kadar oda ısısında tutulabilir.. Eğer test edilmeden önce uzun süre bekletilecekse buz üzerinde ya da +4°C'de tutulmalıdır.

Reaksiyonların çalıştırılması

Real-time PCR cihazı açılarak karosel / pleyt cihazın özelliğine göre yerleştirilir.

Real-time yazılım programı açılır ve kapıllar/pleyt yerleşim planına göre tüm örnekler kayıt edilir.

FAM ve HEX reporter boya olarak seçilmelidir.

Test örnekleri bilinmeyen olarak kaydedilir. Kontroller ise; sadece master mix olan =NTC, negatif ekstraksiyon=NAC, pozitif ekstraksiyon kontrolleri = FAM pozitif kontrol, virulent pozitif RNA kontrol= Standart, avirulent pozitif RNA kontrol= Standart,olarak kaydedilir.

Test için döngü koşulları;

50°C'de 30 dakika

95°C'de 15 dakika

95°C'de 10saniye

50°C'de 30 saniye

72°C'de 20 saniye

} 40 döngü

30 saniye 50°C'deki final uzatma basamağı (annealing) sonunda floresan okunur.

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

Bu test çok sonuçlu bir testtir. Bir çift primer tüm APMV-1 izolatlarını amplifiye eder ve bu daha sonra değişik problemler tarafından ayırılır. Virulent bölünme bölgesine sahip tüm izolatlar FAM problemleri, avirulent izolatlar HEX problemleri ile araştırılır.

Sonuçta; kontroller için rapor edilen Ct değerlerini aşağıdaki şekilde kontrol edilmelidir.

Geçerli bir test için altı NDV RRT-PCR kontrolü aşağıdaki koşullarla örtüşmelidir:

1. Template kontrolü yok – FAM ve HEX kanallarının her ikisinde de “Ct olmamalı ya da Ct ≥ 37 olmalıdır,
2. Negatif ekstraksiyon kontrolü - FAM ve HEX kanallarının her ikisinde de “Ct olmamalı ya da Ct ≥ 37 olmalıdır,
3. İki pozitif ekstraksiyon kontrolü – Her bir ekstraksiyon ekstraksiyon kontrolünün Ct değeri önceden belirlenen Ct değeri serisinin ikisi arasında olmalıdır. Örneğin avirulent virus serisinin önceden belirlenmiş Ct değeri 30 ise ve virulent virus serisinin önceden belirlenmiş Ct değeri 29 ise, geçerli bir testte avirulent HEX Ct 28-32 arasında, FAM kanalında Ct olmamalı, virulent AG68 FAM için 27-31 arasında olmalı ve HEX kanalı için Ct olmamalıdır.
4. İki pozitif RNA kontrolü – RNA kontrollerinin Ct değerleri ekstraksiyon kontrollerinde belirlendiği şekilde önceden belirlenmiş Ct serisinin bu iki Ct değeri arasında olmalıdır.

Pozitif bir örnek <37 Ct değeri oluşturmalıdır. Negatif sonuçlar Ct oluşturmazlar. Ct değerinin ≥ 37 Ct olması durumu yorumlanamayacak bir sonuçtur ve doğrulama için testin tekrarlanması gerekir. Tekrarlanan testte de ≥ 37 bir Ct değeri alınmışsa sonuç negatif olarak raporlanır. Virulent örnekler FAM kanalında pozitif Ct oluştururken, avirulent örnekler HEX kanalında pozitif Ct oluştururlar.

Çalışma pozitif ve negatif kontrollerle çalışılan örneklerin beklenen değerler arasında olup olmamasına göre geçerli sayılır.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- Fuller, C.M., Collins, M.S., Alexander, D.J. (2009). Development of a real-time Reverse-Transcription PCR for the detection and simultaneous pathotyping of Newcastle Diseases Virus isolates using a novel probe. Arch Viro, 154 (6)929-937.
- Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.14. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf
- Qiagen one-step RT-PCR kit Kullanım Kılavuzu

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

NEWCASTLE DISEASE VIRUS (NDV) ANTİKORLARININ TESPİTİ İÇİN ELISA TEST METODU

1. AMAÇ

Bu test metodu, kanatlılarda Newcastle Hastalığı (ND) etkenine karşı oluşan antikorların ELISA testi ile tespitinin yapılmasıdır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu, Newcastle Hastalığı şüpheli kanatlılarda bu etkene karşı oluşan antikorların tespitini ELISA testi ile yapan Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarında geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

1. Kiti ve tüm reagentları 2-8°C’de muhafaza ediniz.
2. Tüm reagentlar kullanılmadan önce 18- 25°C’lik oda sıcaklığına getirilmelidir.
3. Tüm açıklamalar dikkatlice okunup izlenmelidir.
4. Kullanılmamış pleyt gözleri kapatılarak kapalı bir plastik torba içinde 2-8°C’de saklanmalıdır.
5. Farklı serilerdeki (farklı zamanlarda üretilen) kitlerin malzemeleri ve kılavuz kitapçıkları karıştırılmamalıdır.
6. Reagentlarla çalışırken dikkatli olunmalıdır. Son kullanma tarihi geçmiş kit kullanılmamalıdır.
7. Her örnek için ayrı pipet ucu kullanılmalıdır.
8. Her pleyte hem negatif hem de pozitif kontrol kullanılmalıdır.

9. Substrat solüsyonu göz, solunum sistemi ve deri üzerinde tahriş edici etkisi vardır. Deri ve gözlerle temasından kaçınılmalıdır.
10. Stop solüsyonu kuvvetli bir asit olup, yanıklara sebep olabilen H_2SO_4 içerir. Dikkatli çalışılmalıdır.
11. Ağızla pipetleme yapılmamalıdır.
12. Bu kit sadece in vitro teşhis amacıyla kullanılır.
13. Kit prosedürü takip edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

ND: Newcastle Hastalığı, kanatlıların solunum, sindirim ve sinir sistemlerini etkileyen, oldukça bulaşıcı ve öldürücü karakterde olan viral bir hastalıdır.

ELISA: Enzym Linked Immunosorbent Assay

Antikor (Ab): Antikor, çok hücreli hayvansal organizmaların bağışıklık sistemi tarafından; kendi organizmalarına ait olmayan organik yapılara karşı geliştirilen glikoprotein yapısındaki moleküllerdir.

Antijen (Ag): Antijen, vücuda yabancı maddeler girdiği anda bağışıklık sistemince antikor oluşturulmasına neden olan moleküllerdir.

Konjugat: Bir enzim ile işaretlenmiş ikinci ajan, enzim ile işaretlenmiş antiglobulin.

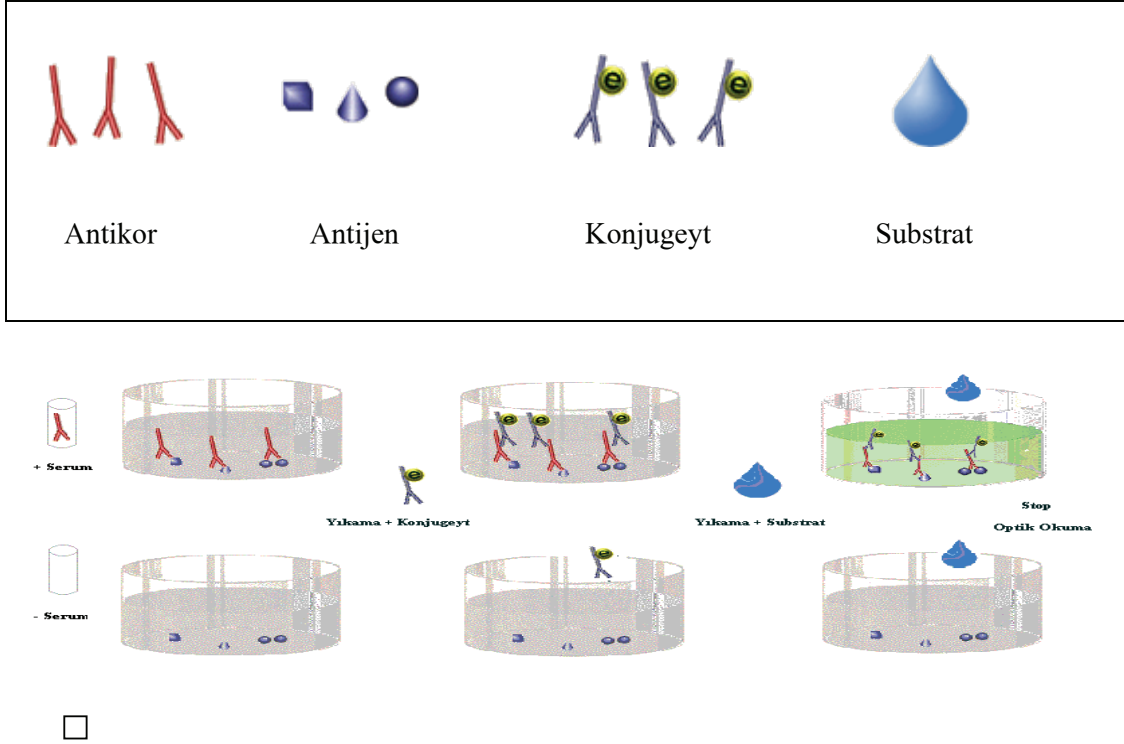
Substrat: Biyokimyada enzimlerin tepkimelerinde işlenen maddelere verilen addır. ELISA da konjugeyte bağlı olan enzime özgü alt tabakaya substrat denir. Sisteme (Ag-Ab kompleksi) bağlanmış konjugeyte bağlı enzim uygun kromojen substratı parçaladığında ortaya çıkan renk, yapılacak kolorimetrik yöntemlerle ölçülerek bağlanmış olan enzim dolayısıyla bağlanmış olan antikor hakkında fikir verecektir.

OD: Optik dansite

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu test metodu, kanatlılarda Newcastle Diseases Virus (NDV) etkenine karşı oluşan antikorların varlığının ELISA testi ile tespitini anlatır. ELISA, katı bir faza bağlı olarak Antijen-Antikor (Ag-Ab) kompleksinin oluşabilmesi ve enzim ile işaretlenmiş konjugeyt olarak isimlendirilen ikinci ajan ve uygun bir substrat ile reaksiyon sonucunda renkli son ürün şeklinde Ag-Ab kompleksinin varlığın saptanması için uygulanan test metodudur (Tablo 2).

Tablo 2: ELISA Test Metodu' nun Şematik Anlatımı



7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

- ☐ Test edilecek kanatlı kan serumları

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ 96 gözlü U tabanlı mikropleyt
- ☐ Otomatik mikropipetler (tek kanallı ve 8–12 kanallı)
- ☐ Mikropipet uçları
- ☐ ELISA okuyucusu
- ☐ Vortex

7.3. Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanması

- ☐ ELISA Kiti

ELISA testi yapılırken kullanılacak kit bileşenleri kimyasal ve biyolojik maddelerden oluşur. Bunların bir kısmı kit içerisinde kullanıma hazır halde bulunmaktadır, diğer bir kısmı ise kullanımdan önce hazırlanması gerekir. Kullanımdan önce hazırlanması gereken reagentlerin dilasyonları kit protokolüne uygun olarak hazırlanır. Hazırlanan reagentler kitte belirtilen süre ve sıcaklıkta saklanır.

Teste başlamadan önce bütün gerekli reagentler oda sıcaklığına (21–27°C) gelene kadar bekletilir.

7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

Numunenin Hazırlanması

Testte kullanılacak örnek miktarı, test reagentlerinin kullanım konsantrasyonları ve inkubasyon süreleri, tercih edilen ticari ELISA kitinin protokolüne uygun olarak ayarlanır.

Genel olarak ELISA testinin temel basamakları aşağıda açıklanmıştır. Teste başlamadan önce antijen kaplı ELISA pleytine konulacak kontrol ve test serumlarının pleyt üzerindeki konumu kaydedilir.

Muayene/Analizin Yapılması

1. **Negatif ve Pozitif** kontrol serumlarından kitin protokolüne uygun hacimde ve dilusyonda 2'şer veya 3'er göze (örneğin; A1-A2 negatif kontrol, H11-H12 pozitif kontrol veya A1-A2-A3 pozitif, negatif, pozitif kontrol H10-H11-H12 negatif, pozitif, negatif kontrol olacak şekilde) konulur.
2. **Referans** kontrol serumu 1 veya 2 göze konur. Referans kit kontrol serumları kitin protokolüne uygun hacimde ve dilusyonda kullanılır.
3. ELISA pleytinin kontroller dışındaki her bir gözüne kitin protokolüne uygun hacimde **diluent** konur ve üzerine önceden hazırlanmış olan **dilue serumlardan** belirli hacimde ilave edilerek test serumları kitte belirtilen final sulandırma oranında hazırlanmış olur.
4. Üzeri kapatılmış olan pleyt kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürede **inkube edilir**.
5. Süre sonunda **içerik dökülür** ve ELISA pleytinin her bir gözü test protokolünde önerilen konsantrasyonda hazırlanmış olan yıkama solusyonu ile **3-5 kez yıkanır**.
6. Son yıkamadan sonra pleyt ters çevrilip kurutma kağıdına vurularak kalan solüsyonun iyice emdirilmesi sağlanır.
7. Belirtilen hacimde **Konjugat Solusyonu** tüm gözlere ilave edilir.
8. Üzeri kapatılmış olan pleyt kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürede **inkube edilir**.
9. **Yıkama prosedürü** 5. ve 6. basamakta anlatıldığı gibi tekrarlanır.
10. Her göze protokole uygun miktarda **Substrat Solusyonu** konur ve kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürede **inkube edilir**.
11. Reaksiyonu durdurmak için her göze belirtilen hacimde **Stop Solusyonu** ilave edilir.
12. Test protokolünde verilen dalga boyunda ELISA okuyucu ile OD değerleri saptanır ve bilgisayar çıktısı alınır. Kit protokolünde verildiği şekilde sonuçlar yorumlanır.

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Test edilen örnekler, pozitif, negatif ve referans kontrol gözleri için okunan OD değerleri ile kit protokolünde ve kitin kalite kontrol sertifikasında verilen OD değerleri karşılaştırılır, geçerli sınırlar içerisinde ise test edilen örnekler pozitif ve negatif şeklinde ifade edilerek kalitatif ve/veya kantitatif olarak değerlendirilir.

Testte kullanılan pozitif, negatif ve referans kontrollerin beklenen standart seviyelerde çıkması halinde test geçerli olarak kabul edilir. Kit protokolünde ve kitin kalite kontrol sertifikasında verilen OD değerleri ile ölçülen OD değerleri karşılaştırılarak testin geçerliliği kontrol edilir.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ BioChek Test Kiti Kullanım Talimatı
- ☐ Guildhay Kiti Kullanım Talimatı
- ☐ Idexx Kiti Kullanım Talimatı
- ☐ Synbioticks Test Kiti Kullanım Talimatı
- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.14.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

NEWCASTLE DISEASE VIRUS (NDV) TEŞHİSİNDE HEMAGLUTİNASYON İNHİBİSYON (HI) TEST METODU

1. AMAÇ

Newcastle Hastalığı virusunun (APMV-1/NDV) Hemaglutinasyon ve Hemaglutinasyon İnhibisyon (HA-HI) test metodu ile teşhisinin yapılması amaçlanmaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu, ND virusunun teşhisini HA-HI test ile yapan Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarlarında kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların infeksiyonuna yol açma riski nedeni ile infeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

Sertifikalı Referans Standart (SRS): Referans olarak alınan, ölçü, miktar, titre gibi özellikleri bilinen, uluslararası bir kuruluş tarafından izlenebilirliği olan, sertifikalandırılmış kimyasal / biyolojik madde gibi ürünlerdir.

ND: Newcastle hastalığı, kanatlıların solunum, sindirim ve sinir sistemlerini etkileyen, oldukça bulaşıcı ve öldürücü karakterde olan viral bir hastalıdır.

APMV-1: Avian Paramyxovirus-1

HA: Hemaglutinasyon

HI : Hemaglutinasyon-Inhibisyon

HAU: Hemaglutinasyon Unitesi

OIE: Office International des Epizooties = Dünya Hayvan Sağlık Örgütü

CAS: Korio-allantoik sıvı

PBS: Phosphate Buffered Saline

v/v : Volüm/volüm

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu test metodu, viral kanatlı hastalıkları yönünden şüpheli materyallerden izole edilen hemaglutinasyon aktivite özelliği gösteren viral etkenin (infektif korio-allantoik sıvının), testte kullanılan Sertifikalı Referans Standart (SRS) antiserumların hemaglutinasyonu inhibe etme özelliğinden yararlanılarak Newcastle hastalığı virusunun varlığı veya yokluğunun saptanmasını anlatır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

- ☐ Test Materyali; Infektif korio-allantoik sıvı
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS);
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS) Antijen [APMV-1(NDV)]
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS) Antiserum [APMV-1(NDV)]

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ 96 gözlü U / V tabanlı mikropleyt
- ☐ 25-50 ml kapasiteli Otomatik Mikropipetler ve uçları
- ☐ Küvetler

7.3. Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanması

Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.2-7.4 Hazırlanması:

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g (Susuz) veya 2.95 g (12 Sulu)

Steril distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilir ve pH 7.2-7.4'e ayarlanır. Testin uygulanması esnasında tampon solüsyon olarak ve aynı zamanda test için gerekli olan eritrosit süspansiyonunun hazırlanması için kullanılır. Buzdolabında (5°C±3°C) raf ömrü, şişenin ağzı açılmadıkça hazırlanmasından sonra 2 yıldır.

%1'lik Tavuk Eritrosit Süspansiyonu (v/v) Hazırlanması:

- ☐ 10 ml' lik enjektöre 5 ml kan için 5 ml antikoagulan (eşit hacimde) çekilir,
- ☐ Kan alma hayvanı olarak sağlıklı tavuklar kullanılır. Tavuğun kalbinden veya kanat altı venasından kan alındıktan sonra enjektör yavaşça döndürülerek kanın antikoagulan ile iyice karışması sağlanır.
- ☐ Kan enjektörden santrifüj tüpüne enjektörün iğne kısmı çıkarılmış halde yavaşça aktarılır,
- ☐ Antikoagulanlı kan 1000-1500 rpm' de 5-10 dakika santrifüj edilir ve ayrılan süpernatant dikkatlice pipetle çekilir.
- ☐ Tüpün dip kısmında kalan eritrositin üzeri PBS ile doldurulur. Daha sonra yavaşça alt üst edilerek kanın PBS ile iyice karışması sağlanır, 5 dakika santrifüj edilir ve üstteki sıvı atılır. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır.
- ☐ Son yıkamadan sonra üstte kalan berrak sıvı dikkatlice alınıp atılır ve dipte kalan eritrosit çökeltisinden 1 ml alınarak 99 ml PBS içerisine katılır. Böylece %1'lik eritrosit süspansiyonu hazırlanmış olur.
- ☐ Hazırlanan eritrosit süspansiyonunun çalışıp çalışmadığının kontrolü için U/V tabanlı mikropleytin kontrol için çalışılacak sıranın gözlerine 25 ml PBS ve üzerine 25 ml % 1' lik tavuk eritrosit süspansiyonu konulur.
- ☐ Pleytin kenarlarına hafifçe vurularak PBS ile tavuk eritrosit süspansiyonunun iyice karışması sağlanır ve eritrositlerin çökmesi için yaklaşık $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ de 40 dakika $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ' de 60 dakika beklenir.
- ☐ Çalışılan gözdeki eritrositlerin belirgin bir düğme formasyonu oluşturup, pleyt hafifçe eğimli tutulduğunda gözyaşı akıntısı tarzında şekil oluşturması, hazırlanan eritrosit süspansiyonun HA-HI testinde kullanılabileceğini gösterir.

7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

Numunenin Hazırlanması

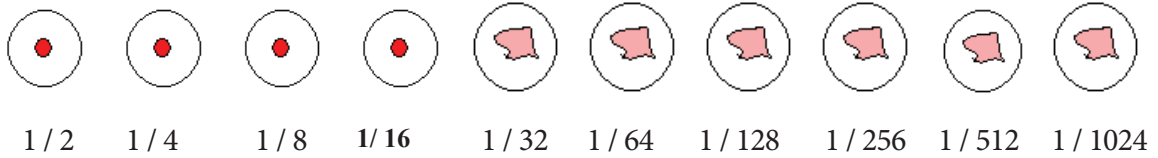
Şüpheli materyallerden izole edilen hemaglutinasyon aktivitesine sahip viral etkenin (infektif korio-allantoik sıvı), 4 HAU' ne ayarlanır. HA test sonucu 4 HAU olan antijen/izolat, HI testinde kullanılır. HA sonucu 4 HAU değil ise, bulunan test sonucuna göre tekrar 4 HAU ayarlanır, tekrar kontrol edildikten sonra HI testine devam edilir.

Muayene/Analizin Yapılması

Hemaglutinasyon İnhibisyon (HI) Testi

- 1) 96 gözlü V veya U tabanlı mikropleytin çalışılacak tüm gözlerine 25 µl PBS konulur,
- 2) Tiplendirmesi yapılacak virus izolatının çalışılacağı sıranın ilk gözüne 25 µl SRS Antiserum [APMV-1(NDV)] konulur,

- 3) SRS Antiserumun iki katlı seri dilüsyonları yapılır ve bu sıradaki her bir göze 4 HAU virus süspansiyonundan,
- 4) Pozitif kontrol için ayrılan sırada da SRS Antiserum [APMV-1(NDV)]'un dilüsyonu yapılarak, sıranın her bir gözüne 4 HAU SRS Antijen [APMV-1(NDV)]'den konulur,
- 5) Pleytin kenarlarına hafifçe vurularak iyice karışması sağlanır ve daha sonra yaklaşık $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ de 15-30 dakika / $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 60 dakika beklenir.
- 6) Bekleme süresi bitiminde tüm gözlerle %1' lik tavuk eritrositinden 25 μl eklenir ve hafifçe karıştırıldıktan sonra eritrositlerin çökmesi için $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 40 dakika $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 60 dakika negatif kontrol gözündeki bariz bir düğme formasyonu görülünceye kadar beklenir,
- 7) Bu son bekleme süresi bitiminde ise pleyt gözlemlenerek düğme formasyonu oluşan yani Hemaglutinasyonun inhibe olduğu, HI (+) gözlerin varlığı saptanır (**Şema 1**).
- 8) Virus izolatının, SRS Antiserum [APMV-1(NDV)] ile tam olarak inhibisyon göstermesi o antiserum ile HI (+) olduğunu gösterir. Bu sonuçlara göre virus izolatının teşhisi ile ilgili değerlendirme yapılır.



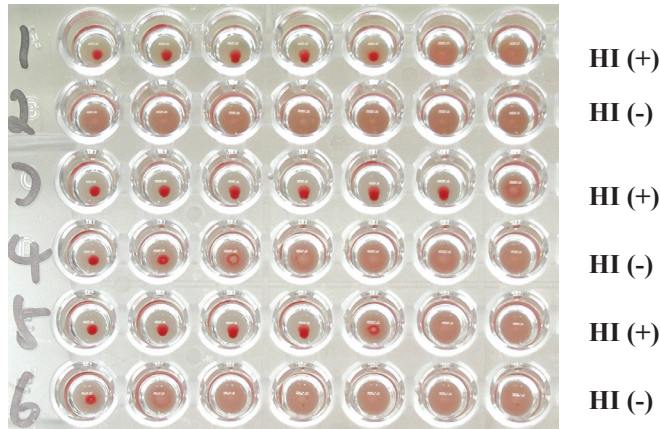
Şema 1 : HI (+) Test Sonucu Şematik Görüntü

Sonuçların kalitatif değerlendirilmesi;

İnhibisyon (düğme formasyonu) olan gözler = **Pozitif**

İnhibisyon (düğme formasyonu) olmayan, dantela tarzında kalan gözler = **Negatif** olarak ifade edilir (**Şema 2**).

HI Test Sonucu



Şema 2 : HI (+) ve HI (-) pleyt görünümü

7.5. Sonuçların değerlendirilmesi

Negatif kontrol (kan kontrol): Bu sıradaki gözlerde eritrositin antijen ile bağlanıp dantela tarzında kalması,

Pozitif kontrol (SRS Antiserum [APMV-1(NDV)] ve SRS Antijen [APMV-1(NDV)]): Bu sıradaki gözlerin düğme formasyonu verip, pleyt eğimli tutulduğunda gözyaşı akıntısı tarzında şekil oluşturması testin geçerliliğini kanıtlar.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- Alexander, D.J. & Senne D.A. (2008a). Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus Infections. *In: Diseases of Poultry*, 12.Baskı, Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. & Swayne D.E., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 75–116.
- Alexander, D.J. & Senne D.A. (2008b), Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviruses. *In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*, Dufour-Zavala L. (Editor in Chief) Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E., Reed W.M, Woolcock P.R., 4th ed., American Association of Avian Pathologists, Athens, GA, 135–141.
- Dennis J. Alexandar Newcastle Disease and other Avian Paramyxoviridae Infections. *Diseases of Poultry*, Bölüm 20, 541-569
- Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E., Reed W.M, Woolcock P.R., 4th ed., American Association of Avian Pathologists, Athens, GA, 135–141.
- Laboratory Biosafety Manual - Third Edition (<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>)
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.14. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUSU (IBV) İZOLASYONU

1. AMAÇ

Avian infectious bronchitis virusunun (IBV) izolasyonu ve identifikasyonu işlemlerinin yapılması.

2. UYGULAMA ALANI

Bu prosedür, IBV izolasyonu ve identifikasyonu ile ilgili her türlü analiz/muayene/kontrolü yapan Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarında geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

IB: Infectious bronchitis kanatlılarda coronaviruslar tarafından oluşturulan akut, bulaşıcı bir hastalıktır.

PBS : Phosphate Buffered Saline

SPF (Specific Pathogen Free) Sürü: Önemli kanatlı hastalıklarının etkenlerini ve bu etkenlere karşı oluşmuş antikorları taşımayan sürü.

İnokulum: Virus izolasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere organ ve doku örneklerinin parçalanmasıyla, ekim için hazırlanmış olan materyal.

CAB: Korio-allantoik boşluk

CAS: Korio-allantoik sıvı

ETY: Embriyolu tavuk yumurtası

HA: Hemaglutinasyon

HI: Hemaglutinasyon–İnhibisyon

TOC: Tracheal Organ Culture

BGS-3: Biyogüvenlik Seviyesi 3

OIE: Office International des Epizooties = Dünya Hayvan Sağlık Örgütü

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu prosedür, Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarına IB hastalığı şüphesi ile gelen kanatlı hayvanlardan alınan, iç organ örnekleri, dışkı, trakeal ve kloakal sıvı vb. materyallerden viral etkenin izolasyonu için yapılan tüm işlemlerin akış sistemini anlatır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Canlı kanatlılardan alınan örnekler, trakeal, oro-farengeal ve kloakal sıvılardır.

Klinik olarak hastalık şüphesi görüldüğünde hemen IB'nin görülen formuna uygun olarak örnekler alınmalıdır. Örnekler soğuk taşıma vasatı içerisine alınıp hemen dondurulmalı ve soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Akut solunum sistemi hastalığı için canlı kanatlılardan üst solunum yollarından sıvılar ya da ölen kanatlılardan trachea ve akciğerlerden örnekler alınarak içerisinde antibiyotik bulunan (Penicillin (10.000 Unit/ml)-Streptomycin (10 mg/ml), taşıma vasatı vasatlarına alınır ve dondurulur. Solunum sistemi örneklerine ilaveten nefritis problemi olan hayvanlardan böbreklerden, yumurta veriminde problem olan sürülerden ise oviduct'tan da örnekler alınmalıdır. Bazı durumlarda virus izolasyonuna gerek olmadan RT-PCR testi ile IBV identifikasyonu yapılabilir. Bu işlem için sadece trakeal ya da kloakal sıvı taşıma vasatına konulmadan gönderilebilir. IB kaynaklı nefritisten şüpheli olgularda virus izolasyon çalışmaları için kullanılmak üzere taze karkaslardan örnekler alınmalıdır. En yüksek virus izolasyon oranı sekal tonsiller ve dışkıdan olduğu bildirilmiştir.

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Biyogüvenlik Kabinleri (Class II tip)
- ☐ Santrifüj
- ☐ Kuluçka makinesi
- ☐ Mekanik parçalayıcı cihaz ve tüpleri / ultra turrax / blender
- ☐ Elektrikli/şarjlı pipetor
- ☐ Yumurta kontrol lambası
- ☐ Steril keskin cerrahi makaslar, dişli ve dişsiz pensler
- ☐ Santrifüj tüpleri (15 ml)

- ☐ Embriyolu yumurta için ekim materyali (yumurta kabuğu delicisi)
- ☐ Steril enjektör (1 veya 2 cc. lik, 0.1 cc. taksimatlı)
- ☐ Tek kullanımlık steril malzeme (pipetler, marazi madde kapları, tüp vb.)

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ Steril PBS (pH 7.0-7.4)
- ☐ Yıkanmış tavuk eritrositi %1 (v/v)
- ☐ Antibiyotik solüsyonu: Penicillin (2000 ünit/ml)-Streptomycin (2 mg/ml), Gentamycin (50 mg/ml) ve Mycostatin (1000 ünite/ml). Dışkı ve kloakal sıvaplar için bu oranlar 5 X hazırlanır.
- ☐ %70'lik Ethanol / Tentürdiyot
- ☐ Yapıştırıcı; uhu, tırnak cilası, eritilmiş parafin vb.

Ayrıca;

- ☐ 9-11 günlük SPF embriyolu tavuk yumurtası.

7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

Numunenin Hazırlanması

IB Hastalığı şüpheli kanatlılarda nekropsi işlemi, **Kanatlılarda Nekropsi** prosedürüne göre yapılarak etken izolasyonu için gerekli olan sıvap ve organ örnekleri alınır.

Muayene/Analizin Yapılması

Virus İzolasyonu

İnokulum Hazırlama

- ☐ Organ parçalarından hazırlanacak inokulumun mekanik parçalayıcı cihaz kullanarak parçalanması en idealdir. Eğer mekanik parçalayıcı cihaz yoksa, organ parçaları ultra turrax, blender veya steril makas yardımıyla iyice parçalanır.
- ☐ Parçalanmış doku %10-20 (w/v) oranında olacak şekilde hazırlanmış antibiyotik solüsyonu içerisine konur ve iyice karışması sağlanır.
- ☐ Karışım, 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki sıvı alınır.
- ☐ Trakeal, kloakal sıvaplar ve dışkı materyalinden inokulum hazırlanırken, bu materyaller de antibiyotik solüsyonu içine alınır.
- ☐ Dışkı ve kloakal sıvaplar için kullanılacak antibiyotik solüsyonu, antibiyotik miktarı yukarıda verilen oranların 5 katı artırılarak hazırlanır.
- ☐ Süspansiyonlar oda sıcaklığında 60 dakika ya da buzdolabında bir gece bekletilir ve bu süre sonunda işleme alınır. Hemen işleme alınmayacaksa derin dondurucuda muhafaza edilir.
- ☐ Antibiyotik solüsyonunda bekleme süresini tamamlayan süspansiyonlar 3000 rpm'de 10 dakika tekrar santrifüj edilir, üstteki sıvı alınarak inokulum olarak kullanılır.

Embriyolu Yumurtaların Hazırlanması ve İnokulasyonu

SPF Tavuk Yumurtalarının Ön-İnkübasyonu

- ☐ Infectious bronchitis virusu ETY'da üremektedir ve bu nedenle izole etmek için tercih edilen metot SPF embriyolu tavuk yumurtasına inokulasyondur. Ön-inkübasyona konacak SPF tavuk yumurtaları 10-15°C'de min. 18 saat max. 10 gün saklanmış olmalıdır.
- ☐ İnkubatöre yerleştirilen yumurtalar, potasyum permanganat + formol ile fumige edilir. İnkubatörde 37.5+ 0.5°C ve %50-70 nispi nem (RN)'de ön-inkübasyona tabi tutulur.
- ☐ Ön-inkübasyon süresi 9-11 gündür (İnkubatöre konma günü = gün 0).
- ☐ 9-11 gün inkube edilmiş yumurtalar, yumurta kontrol lambası ile karanlık bir ortamda fertilitite ve canlılık muayenesi yapılır ve aşağıda anlatıldığı şekilde ayırt edilir;

Ölü embriyolu yumurtalar: Görülebilir damar yok, açık sarı yumurta sıvısında yüzen embriyo gri-siyah kütle görünümünde,

Fertil olmayan yumurtalar: Embriyonun olmaması, yalnızca yumurta sarısının ayırt edilebilmesi şeklinde gözlenir.

İnokulasyon yerinin belirlenmesi:

- ☐ Fertil olanlarda embriyonun yeri ve yumurtanın hava boşluğu sınırı kurşun kalem ile çizilir. İnokulasyon yeri, embriyonun karşı tarafında, kan damarlarının az olduğu bir noktada, hava boşluğu çizgisinin 2 mm kadar üzerinde işaretlenir.
- ☐ Yumurtalar, hava keseleri üste gelecek şekilde viyollere yerleştirilir ve üzerlerine inokule edilecek materyalin kod numarası yazılır. Her numune için 3-5 yumurta kullanılır.

SPF Embriyolu Tavuk Yumurtasına Ekim

- ☐ Biyogüvenlik kabini içerisinde, inokulasyon noktasını da içine alacak şekilde yumurtaların üst kısımları %70 Ethanol ya da seyreltilmiş tentürdiyot ile ıslatılmış pamuk yardımıyla silinerek dezenfekte edilir.
- ☐ İnokulasyonun yapılacağı bölgede daha önce işaretlenmiş noktadan steril delici ile delik açılır.
- ☐ Steril enjektör içerisine alınan inokulum sıvısı, 90°'lik eğim ile, 0.1-0.2 ml miktarında korioallantoik boşluğa enjekte edilir.
- ☐ Açılan delik, bir damla sıvı yapıştırıcı yada eritilmiş parafin ile kapatılır,
- ☐ İnokulasyondan sonraki 24 saatlik gözlem süresinin sonunda ölen embriyolu yumurtalar, kaydedilerek değerlendirmeye alınmaz ve atılır.
- ☐ Yumurtaların 35-37°C'de 4-7 gün inkubasyonuna devam edilir. Bu süre içinde 24 saat aralıklarla yumurtaların canlılık muayenesi yapılır. Ölü veya ölmekte olan embriyoları içeren yumurtalar ve inkubasyon periyodunun sonunda canlı kalan tüm yumurtalar buzdolabında 1 gece bekletilir. Bu sürede ölmeleri ve kan damarlarının çekilmesi sağlanır.

Korio Allantoik Sıvının (CAS) Toplanması

- ☐ Biyogüvenlik kabini içerisinde, steril malzemeler (eğri uçlu makas, pens, pipetler, tüpler vb.) hazırlanır.
- ☐ CAS'ları toplanacak yumurtalar, öncelikle üst kısımları %70 Ethanol ya da seyreltilmiş tentürdiyot ile ıslatılmış pamuk yardımıyla silinerek dezenfekte edilir.
- ☐ Hava kesesini belirleyen çizginin 1-2 mm üzerinden makas yardımı ile kesilerek yumurta kabuğu kaldırılır
- ☐ Hava boşluğunu sınırlayan yumurta zarı, yumurta sarısına zarar verilmeden açılır.
- ☐ Elektrikli pipettor ve pipet yardımıyla korio-allantoik sıvı (CAS), yumurta sarısına zarar verilmeden toplanır.
- ☐ Toplanan sıvı eritrosit ve hücre birikintilerinin uzaklaştırılması amacıyla 3000 rpm'de 5 dak. santrifüj edilir.

7.5. Sonuçların değerlendirilmesi

Saha suşunun yumurtaya adapte bir suş olmadığı durumlarda ilk pasajda genellikle makroskopik lezyonlar sınırlıdır. İnokulasyondan 3 gün sonra tüm yumurtaların korioallantoik sıvıları toplanarak bir araya getirilir. Bu sıvı 1/5 ya da 1/10 antibiyotik solüsyonu ile dilue edildikten sonra tekrar pasajı yapılır ve bu şekilde 3-4 kez pasaj edilir. Saha suşları 2-4 pasajdan sonra embriyolarda tipik olarak gelişim bozukluğu, kıvrılma, tüylerde distrofi ve mezonefronlarda ürat birikimleri oluşturabilir. Daha ileri pasajlarda suş embriyoya adapte olmaya başladıktan sonra embriyo ölümleri oluşabilir. Solunum sisteminde yaygın olarak bulunabilen adenovirus gibi diğer viruslarda embriyolarda IBV ile benzer lezyonlar oluştururlar. Avian infectious bronchitis virusunun sınırlı sayıda suşları tavuk eritrositlerini aglutine etme (HA) yeteneği olup diğer birçok suşu bu özelliğe sahip değildir. Bu nedenle IBV'nin izolasyonu serotiplendirme ve genotiplendirme ile teyit edilmelidir. Infekte korioallantoik sıvılar kısa süreli saklamalar için -20°C, uzun süreli saklamalar için -60°C'de ya da liyofilize edildikten sonra 4°C'de tutulabilir.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- Cavanagh,D., Naqi,S. (2003). Infectious Bronchitis. Diseases of Poultry, 11. Baskı. Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly,A.M., McDougald,L.R., Swayne,D.E., eds. Ames Iowa 101-119.
- Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.2 . http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.02_AIB.pdf.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS (IBV) TESPİTİNDE HEMAGLUTİNASYON TEST METODU

1. AMAÇ

Avian Infectious Bronchitis virusuna (IBV) karşı oluşan antikorların Hemaglutinasyon ve Hemaglutinasyon İnhibisyon (HA-HI) test metodu ile tespiti amaçlanmaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu, IB virusuna karşı oluşan antikorların tespitini HA-HI test ile yapan Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarlarında geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

Sertifikalı Referans Standart (SRS): Referans olarak alınan, ölçü, miktar, titre gibi özellikleri bilinen, uluslararası bir kuruluş tarafından izlenebilirliği olan, sertifikalandırılmış kimyasal/ biyolojik madde gibi ürünlerdir.

IB: Avian Infectious Bronchitis kanatlılarda coronaviruslar tarafından oluşturulan akut, bulaşıcı bir hastalıktır.

HA: Hemaglutinasyon

HI : Hemaglutinasyon-Inhibisyon

HAU: Hemaglutinasyon Ünitesi

OIE: Office International des Epizooties = Dünya Hayvan Sağlık Örgütü

CAS: Korio-allantoik sıvı

PBS: Phosphate Buffered Saline

SPF: Specific Pathogen Free

v/v : Volüm/volüm

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu test metodu, Sertifikalı Referans Standart (SRS) antijenler kullanılarak bu antijenlerin şüpheli serumlarda IB virusuna karşı oluşan antikorları hemaglutinasyonu inhibe etme özelliğinden yararlanılarak saptanır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

- ☐ Test Materyali; İnfektif korio-allantoik sıvı
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS);
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS) Antijen [IBV-1(M41,793/B, QX, IT-02, D274 vb.)]
- ☐ Sertifikalı Referans Standart(SRS) Antiserum [IBV-1(M41,793/B,QX,IT-02,D274 vb.)]
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS) Negatif serum (SPF)

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ 96 gözlü V / U tabanlı mikrolept
- ☐ 25-50 ml kapasiteli Otomatik Mikropipetler ve uçları
- ☐ Küvetler
- ☐ Pipet ve şarjlı pipettor
- ☐ Değişik ölçülerde vidalı kapaklı şişeler
- ☐ Santrifüj
- ☐ Enjektör
- ☐ Santrifüj tüpü
- ☐ Buzdolabı
- ☐ Laboratuvar saati

7.3. Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanması

Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.2-7.4 Hazırlanması:

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
KH_2PO_4	0.2 g
Na_2HPO_4	1.15 g (Susuz) veya 2.95 g (12 Sulu)

Steril distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilir ve pH 7.2-7.4'e ayarlanır. Testin uygulanması esnasında tampon solüsyon olarak ve aynı zamanda test için gerekli olan eritrosit süspansiyonunun hazırlanması için kullanılır. Buzdolabında (5°C±3°C) raf ömrü, şişenin ağzı açılmadıkça hazırlanmasından sonra 2 yıldır.

%1'lik Tavuk Eritrosit Süspansiyonu (v/v) Hazırlanması:

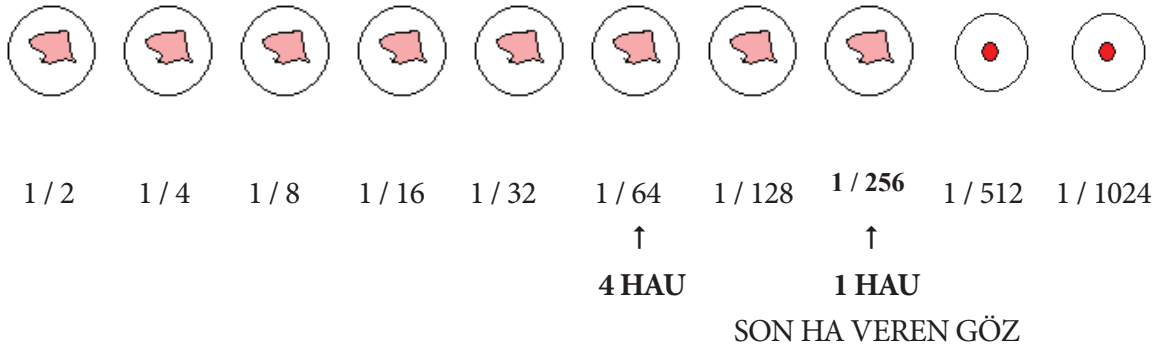
- ☐ 10 ml' lik enjektöre 5 ml kan için 5 ml antikoagulan (eşit hacimde) çekilir,
- ☐ Kan alma hayvanı olarak sağlıklı tavuklar kullanılır. Tavuğun kalbinden veya kanat altı venasından kan alındıktan sonra enjektör yavaşça döndürülerek kanın antikoagulan ile iyice karışması sağlanır.
- ☐ Kan enjektörden santrifüj tüpüne enjektörün iğne kısmı çıkarılmış halde yavaşça aktarılır,
- ☐ Antikoagulanlı kan 1000-1500 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edilir ve ayrılan süpernatant dikkatlice pipetle çekilir.
- ☐ Tüpün dip kısmında kalan eritrositin üzeri PBS ile doldurulur. Daha sonra yavaşça alt üst edilerek kanın PBS ile iyice karışması sağlanır, 5 dakika santrifüj edilir ve üstteki sıvı atılır. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır.
- ☐ Son yıkamadan sonra üstte kalan berrak sıvı dikkatlice alınıp atılır ve dipte kalan eritrosit çökeltisinden 1 ml alınarak 99 ml PBS içerisine katılır. Böylece % 1'lik eritrosit süspansiyonu hazırlanmış olur.
- ☐ Hazırlanan eritrosit süspansiyonunun çalışıp çalışmadığının kontrolü için U/V tabanlı mikroyetkin kontrol için çalışılacak sıranın gözlerine 25 ml PBS ve üzerine 25 ml % 1'lik tavuk eritrosit süspansiyonu konulur.
- ☐ Pleytin kenarlarına hafifçe vurularak PBS ile tavuk eritrosit süspansiyonunun iyice karışması sağlanır ve eritrositlerin çökmesi için 5°C±3°C'de yaklaşık 30 dakika beklenir.
- ☐ Çalışılan gözdeki eritrositlerin belirgin bir düğme formasyonu oluşturup, pleyt hafifçe eğimli tutulduğunda gözyaşı akıntısı tarzında şekil oluşturması, hazırlanan eritrosit süspansiyonun HA-HI testinde kullanılabileceğini gösterir.

7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

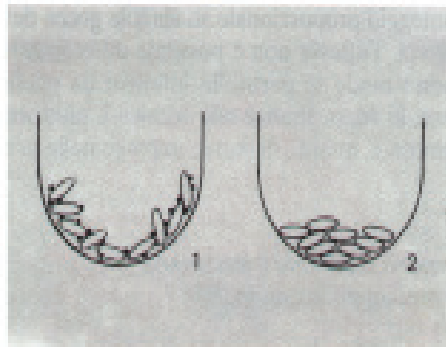
Antijenin 4 HAU' ne ayarlanması;

Hemaglutinasyon (HA) Testi

- 1) 96 gözlü V veya U tabanlı mikroyeğin çalışılacak gözlerine 25 µl PBS konulur,
- 2) İlk göze 25 µl Standart Antijen (IBV-M41) ilave edilir ve iki katlı dilüsyonu yapılarak son göze kadar gidilir.
- 3) Dilüsyon yapılan tüm gözlerle tekrar 25 µl PBS ilave edilir,
- 4) Aynı gözlerle 25 µl % 1'lik yıkanmış tavuk eritrositi konulur,
- 5) Negatif kontrol (kan kontrol) için ayrılan sıradaki gözlerle 25 ml PBS ve üzerine 25 ml % 1'lik tavuk eritrosit süspansiyonu ilave edilir,
- 6) Pleytin kenarlarına hafifçe vurularak iyice karışması sağlanır ve reaksiyonun şekillenmesi için 5°C±3°C'de yaklaşık 30 dakika ya da kontrol gözündeki eritrositler belirgin bir düğme formasyonu oluşturan kadar beklenir.
- 7) Bekleme süresi sonunda pleyt gözlemlenerek dantela tarzında kalan yani Hemaglutinasyon şekillenen gözlerin varlığı saptanır. HA pozitif reaksiyonu tanımlama, HA (+) virus izolatına ait sıranın dantela tarzında kalan son gözü %100 HA veren göz olarak kabul edilir. Bu son göz 1 HA Ünitesini temsil eder (Şema 1) ve (Şema 2).



Şema 1 : HA (+) Test Sonucu Şematik Görüntü (4 HAU Hesaplanması)



1. HA (+) 2. Eritrosit Kontrolü

Şema 2: Hemaglutinasyon Oluşma Mekanizması

Sonuçların kalitatif değerlendirilmesi;

Hemaglutinasyon şekillenen (dantela tarzında kalan) gözler = **Pozitif**

Hemaglutinasyon şekillenmeyen (düğme formasyonu oluşan) gözler = **Negatif** olarak ifade edilir.

4 HAU ayarlanması;

1 HAU'si belirlenmiş SRS Antijen [IBV-1(M41,793/B, QX, IT-02, D274 vb.)] 4 HAU'ne (**Şema 1**)' de gösterildiği ve aşağıda anlatıldığı gibi ayarlanır.

Örn: 1 HAU = 1 / 256 olan bir antijen 4 HAU hazırlanmak için ; $256 : 4 = 64$, 63 ml PBS + 1ml SRS Antijen [IBV-1(M41,793/B, QX, IT-02, D274 vb.)] ilave edilerek dilüsyon hazırlanır.

4 HAU' ne ayarlanan SRS Antijen [[IBV-1(M41,793/B, QX, IT-02, D274 vb.)]' in kontrolü için, aynı pleytte her örnek için paralel iki sıra olacak şekilde HA testi yapılır.

1. HA test sonucu 4 HAU olan antijen, HI testinde kullanılır. HA sonucu 4 HAU değil ise, bulunan test sonucuna göre tekrar 4 HAU ayarlanır, tekrar kontrol edildikten sonra HI testine devam edilir.

7.5. Sonuçların değerlendirilmesi

Negatif kontrol (kan kontrol): Bu sıradaki gözlerin düğme şeklinde dibe çökmesi ve pleyt eğimli tutulduğunda gözyaşı akıntısı tarzında şekil oluşturması,

Pozitif kontrol (SRS Antijen [IBV-1(M41,793/B, QX, IT-02, D274 vb.)]): Bu sıradaki gözlerde eritrositin antijen ile bağlanıp dantela tarzında kalması, testin geçerliliğini kanıtlar.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- Cavanagh,D., Naqi,S. (2003). Infectious Bronchitis. Diseases of Poultry, 11. Baskı. Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly,A.M., McDougald,L.R., Swayne,D.E., eds. Ames Iowa 101-119.
- Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.2 . http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.02_AIB.pdf.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS (IBV) SUŞLARININ NESTED REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION (NESTED RT-PCR) İLE TESPİTİ

1. AMAÇ

Kanatlılarda Infectious Bronchitis (IB) hastalığına sebep olan etkenin moleküler olarak tespitinin yapılması.

2. UYGULAMA ALANI

Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarlarında Avian Infectious Bronchitis viruslarının tespitinde kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

IB: Infectious Bronchitis kanatlılarda coronaviruslar tarafından oluşturulan akut, bulaşıcı bir hastalıktır.

CAS: Korio-allantoik sıvı

RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

RNA: Ribonükleik Asit

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Avian Infectious Bronchitis hastalığı şüphesi ile gelen kanatlı hayvanlardan alınan materyallerden IB virus suşunun RT-PCR testi ile tespiti için kullanılır. Şüpheli örneklerden viral RNA elde edilir. Elde edilen RNA spesifik primerler yardımıyla thermalcycler'da amplifiye edilir. Agarose jel elektroforezis yardımıyla elde edilen PCR ürünlerinde IB virusu için spesifik bant varlığı aranır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal ve transport

Organ örneği, trakeal sıvı örneği

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Biyogüvenlik Kabini (Class II tip)
- ☐ Mikrosantrifüj
- ☐ Vortex karıştırıcı
- ☐ Derin Dondurucu ($-20\pm5^{\circ}\text{C}$, $-70\pm5^{\circ}\text{C}$)
- ☐ Buzdolabı
- ☐ 1.5 ml mikrosantrifüj tüpü
- ☐ Tek kanallı Mikropipetler; değişik volümde
- ☐ Otomatik pipet kontroller
- ☐ Tek kullanımlık steril pipetler
- ☐ Mikropipet uçları (bariyerli)
- ☐ Mikrosantrifüj tüpleri için uygun büyüklükte sehpa
- ☐ Steril cryovialler ve eppendorf tüpler
- ☐ Steril santrifüj tüpleri
- ☐ Thermalcycler
- ☐ Elektroforez sistemi ve güç kaynağı
- ☐ Jel görüntüleme sistemi

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ RNA ekstraksiyon kiti
- ☐ RT-PCR Kiti
- ☐ Primerler
- ☐ DNA molekül ağırlık markeri
- ☐ Agarose
- ☐ Ethidium Bromide

- ☐ Tris-EDTA Asetat tamponu
- ☐ Loading dye
- ☐ Etkin dezenfektan

RNA İzolasyonu

IBV total RNA'sı ticari kitler kullanılarak infekte dokulardan / trakeal sıvılardan / korioallantoik sıvıdan ekstrakte edilir.

MASTER MIX: RT - PCR Infectious Bronchitis (IBV)

IBV - S1 geninin varlığının tespiti için viral RNA nested RT-PCR kullanılarak taranır.

Kullanılan Reagentlar

REAGENT	Saklama Koşulları
QuantiTect Probe RT-PCR Kit	-20° C (+210)° C
FOR1 (5' - CTT TTG TTT GCA CTA TGT AG-3')	-20° C (+210)° C
RE3 (5' - TAA TAA CCA CTC TGA GCT GT-3')	-20° C (+210)° C
Ultrapure H ₂ O	Oda ısısı / -20° C (+210)° C

REAGENT	Saklama Koşulları
QuantiTect Probe RT-PCR Kit	-20° C (+210)° C
FOR2 (5' -CAG TGT TTG TCA CAC ATT GT-3')	-20° C (+210)° C
RE2 (5'-CCA TCT GAA AAA TTG CCA GT-3')	-20° C (+210)° C
Ultrapure H ₂ O	Oda ısısı / -20° C (+210)° C

Hazırlanışı:

Enzim dışında diğer reagentlar eritilir.

Reagentlar iyice karıştırılır ve birkaç saniye santrifüj edilir

Aşağıdaki tabloya göre, steril eppendorf içinde reaksiyon karışımı hazırlanır.

REAGENT	Final Konsantrasyon	ml x 1 Reaksiyon
Ultrapure steril su	/	10,55
PCR Buffer 5X	1X	5
dNTPs mix 10mM	0,8mM	2
Primer FOR1 100 mM	2,5 mM	0,625
Primer RE3 100 mM	2,5 mM	0,625
RNase Inhibitor 40U/ml	8U	0,2
OneStep RT-PCR Enzyme Mix		1
Toplam volum		20
Örnek RNA		5
Final Reaksiyon volümü		25

Karışımı vortexlenir ve birkaç saniye santrifüj edilir

Karışımından 0.2 ml'lik tüplere 20ml dağıtılır

Üzerlerine RNA eklenir

Amplifikasyon Döngüsü

RT aşaması: 30 dakika 50°C
15 dakika 94°C

PCR aşaması; 94°C'de 30saniye }
57°C'de 30 saniye } 35 döngü
72°C'de 30 saniye }

Agar jel elektroforezis

- ☐ %1.5 lik agar TBE buffer içinde hazırlanır. Mikrodalga fırında eritilir ve içersine 0.5ug/ml Ethidium bromide eklenir. Jel kастı hazırlanır tarak yerleştirilir ve hazırlanan agar içine dökülür.
- ☐ Agar kuruyunca jel tankı içine yerleştirilir ve jel tankı agarın üzerini örtecek şekilde TBE buffer ile doldurulur.
- ☐ PCR ürününden 5 µl alınır 1ml jel loading dye ile karıştırılır ve agar üzerinde tarağın oluşturduğu çukurlara doldurulur.
- ☐ İlk çukura DNA merdiveni yüklenir.
- ☐ Örnekler 60Volttta agarın 2/3ünü geçene kadar yürütülür.
- ☐ UV ışık altında aranan DNA bantlarının varlığı incelenir.

7.4 Sonuçların değerlendirilmesi

- ☐ Agar UV ışığı altında incelenir. Beklenen ilk nested RT-PCR ürünü olan 878 bp, ikinci ürünü olan 400-bp bantlar IB virusunun varlığını gösterir.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- Cavanagh,D., Naqi,S. (2003). Infectious Bronchitis. Diseases of Poultry, 11. Baskı. Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly,A.M., McDougald,L.R., Swayne,D.E., eds. Ames Iowa 101-119.
- Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- Kahya,S., Coven,F., Temelli,S., Eyigor,A., Carlı,K.T.: Presence of IS/1494/06 genotype-related infectious bronchitis virus in breeder and broiler flocks in Turkey. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 60, 27-31, 2013
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.2 . http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.02_AIB.pdf.
- Pohuang T, Chansiripornchai N, Tawatsin A, Sasipreeyajan J (2009): Detection and molecular characterization of infectious bronchitis virus isolated from recent outbreaks in broiler flocks in Thailand. J Vet Sci 10, 219–223.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS (IBV) SUŞLARININ REALTIME REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION (RRT-PCR) İLE TESPİTİ

1. AMAÇ

Avian infectious bronchitis izolatlarının OneStep Real-Time RT- PCR ile tespitinin yapılması.

2. UYGULAMA ALANI

Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarlarında Avian infectious bronchitis viruslarının tespitinde kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

IB: Infectious bronchitis kanatlılarda coronaviruslar tarafından oluşturulan akut, bulaşıcı bir hastalıktır.

CAS: Korio-allantoik sıvı

RRT-PCR: Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

RNA: Ribonukleik Asit

cDNA: Komplementer DNA

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Infectious bronchitis hastalığı şüphesi ile gelen kanatlı hayvanlardan alınan materyallerden IB virus suşunun RRT-PCR testi ile tespiti için kullanılır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Şüpheli organ örnekleri ya da CAS.

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Biyogüvenlik Kabini (Class II tip)
- ☐ Mikrosantrifüj
- ☐ LightCycler 2.0
- ☐ Software
- ☐ Vortex karıştırıcı
- ☐ Derin Dondurucu ($-20\pm5^{\circ}\text{C}$, $-70\pm5^{\circ}\text{C}$)
- ☐ Buzdolabı
- ☐ 1.5 ml mikrosantrifüj tüpü
- ☐ Tek kanallı Mikropipetler; değişik volümde
- ☐ Otomatik pipet kontroller
- ☐ Tek kullanımlık steril pipetler
- ☐ Mikropipet uçları (bariyerli)
- ☐ Mikrosantrifüj tüpleri için uygun büyüklükte sehpa
- ☐ Steril cryovialler ve eppendorf tüpler
- ☐ Steril santrifüj tüpleri

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ RNA ekstraksiyon kiti
- ☐ One Step RT-PCR Kiti
- ☐ Etkin dezenfektan

RT- PCR master mix

Bu protokolde OneStep RT-PCR kit (Qiagen, cat # 210212) kullanılarak yapılmaktadır. Kit içerisinde bulunmayan reagentler diğer sağlayıcılardan tedarik edilebilir. Aşağıda verilen volümler 10x25 µl reaksiyon için yeterlidir, yani Master Mix 10x23 µl volume bölünür ve her birine 2 µl ekstrakte edilen RNA eklenir.

MASTER MIX: RealTime ONE STEP **Infectious Bronchitis (IBV 5'-UTR gen)****Reagentler**

Reagent	Saklama Koşulları
Sonda FAM IBV 5'G BHQ1 (5'- CACCACCAGAACCTGTCACCTC-3')	-20° C (+2-10)° C
Primerler: IBV 5' GU391 (5'- GCTTTTGAGCCTAGCGTT-3')	-20° C (+2-10)° C
Primerler: IBV 5' GL533 (5'- GCCATGTTGTCACTGTCTATTG -3')	-20° C (+2-10)° C
QuantiTect Multiplex RT-PCR kit 2X	-20° C (+2-10)° C
Steril Ultrapure H₂O	Oda Isısı /-20° C (+2-10)° C

Hazırlanışı;

Enzim dışında diğer reagentler çözündürülerek soğukta bekletilir

Reagentler iyice karıştırılır ve birkaç saniye santrifüj edilir

Aşağıdaki tabloya göre, steril eppendorf içinde reaksiyon karışımı hazırlanır.

Reagent	Final Konsantrasyon	ml x 1 Reaksiyon
Steril Ultrapure H₂O	/	3,25
Primer IBV5'GU391 10µM	300 nM	0,75
Primer IBV5'GL533 10µM	300 nM	0,75
2x RT-PCR master mix	1X	12,5
Sonda IBV 5'G 1µM	100 nM	2,5
Enzim mix		0,25
Total Volüm		20µl
Örnek RNA		5µl
Final Reaksiyon volümü		25µl

Karışım vortexlenir ve birkaç saniye santrifüj edilir.

Karışımından 0.2 ml'lik tüplere 20 µl dağıtılır.

Amplifikasyon Döngüsü

RT aşaması:	30 dakika 50°C	
	15 dakika 95°C	
PCR aşaması;	94°C'de 20 sn	} 50 döngü
	60°C'de 60 sn	

7.4. Sonuçların değerlendirilmesi

Infectious bronchitis virus S geni Real Time RT-PCR sonuçları 530 numaralı kanalda okunur. Test sonuçlarını analiz etmek için analiz düğmesine basılır ve kalitatif analiz seçilir. Analize ait floresan bilgileri analiz sırasında ve sonrasında da izlenebilir. Paralel çalışılan örneklerle test örnekleri karşılaştırılarak sonuçlar analiz edilir. Referens örnekten standartlar hazırlanmışsa standart curve analizi yapılarak PCR'ın etkinliği saptanır. LightCycler için optimum etkinlik 2.0 olmalıdır. Fakat gerçekte çoğu zaman bu değerden daha düşük bir değer elde edilir.

1. Örneklerle ait elde edilen sonuçlar pozitif ve negatif kontrolle karşılaştırılarak değerlendirilir.
2. Pozitif örneklerde yükselen bir eğri gözlenirken negatif kontrol ve negatif örneklerde dümdüz bir floresans çizgisi izlenmelidir.
3. Bir örneğin pozitif mi yoksa negatif mi olduğunu analiz ederken Ct değeri <30 ise pozitif, Ct değeri 30-35 arasında ise ve sigmoid logaritmik bir eğri ise zayıf pozitif, Ct değeri >35 ise ve amplifikasyon eğrisi linear bir yapıda ise negatif olarak kabul edilir.
4. Şüpheli bir durum varsa pozitif olduğu bilinen bir örnekten hazırlanan standart dilusyonları ile şüpheli örnek kullanılarak rRT-PCR yenilenir. Yükselen bir eğri oluşturan en düşük konsantrasyondaki pozitif örnek ile incelenen örnek karşılaştırılarak karar verilir.
5. Floresans data 60°C'de 530 kanalında FAM filtresi yardımıyla toplanır.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- Cavanagh,D., Naqi,S. (2003). Infectious Bronchitis. Diseases of Poultry, 11. Baskı. Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly,A.M., McDougald,L.R., Swayne,D.E., eds. Ames Iowa 101-119.
- Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- Kahya,S., Coven,F., Temelli,S., Eyigor,A., Carlı,K.T.: Presence of IS/1494/06 genotype-related infectious bronchitis virus in breeder and broiler flocks in Turkey. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 60, 27-31, 2013
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.2 . http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.02_AIB.pdf.
- Pohuang T, Chansiripornchai N, Tawatsin A, Sasipreeyajan J (2009): Detection and molecular characterization of infectious bronchitis virus isolated from recent outbreaks in broiler flocks in Thailand. J Vet Sci 10, 219–223.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

INFECTIOUS BRONCHITIS (IB) VİRUSUNA KARŞI OLUŞMUŞ ANTİKORLARIN ENZYM LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) TESTİ İLE TESPİTİ

1. AMAÇ

Bu test metodu, kanatlılarda Infectious Bronchitis virusuna (IBV) karşı oluşan antikorların ELISA test metodu ile tespitinin yapılması amaçlanmaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu, Avian Infectious Bronchitis'den şüpheli kanatlılarda bu etkene karşı oluşan antikorların tespitini ELISA testi ile yapan Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarında geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

1. Kiti ve tüm reagentları 2-8°C'de muhafaza ediniz.
2. Tüm reagentlar kullanılmadan önce 18- 25°C'lik oda sıcaklığına getirilmelidir.
3. Tüm açıklamalar dikkatlice okunup izlenmelidir.
4. Kullanılmamış pleyt gözleri kapatılarak kapalı bir plastik torba içinde 2-8°C'de saklanmalıdır.
5. Farklı serilerdeki (farklı zamanlarda üretilen) kitlerin malzemeleri ve kılavuz kitapçıkları karıştırılmamalıdır.
6. Reagentlarla çalışırken dikkatli olunmalıdır. Son kullanma tarihi geçmiş kit kullanılmamalıdır.
7. Her örnek için ayrı pipet ucu kullanılmalıdır.
8. Her pleyte hem negatif hem de pozitif kontrol kullanılmalıdır.

9. Substrat solüsyonu göz, solunum sistemi ve deri üzerinde tahriş edici etkisi vardır. Deri ve gözlerle temasından kaçınılmalıdır.
10. Stop solüsyonu kuvvetli bir asit olup, yanıklara sebep olabilen H_2SO_4 içerir. Dikkatli çalışılmalıdır.
11. Ağızla pipetleme yapılmamalıdır.
12. Bu kit sadece in vitro teşhis amacıyla kullanılır.
13. Kit prosedürü takip edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

IB: Avian Infectious Bronchitis kanatlılarda coronaviruslar tarafından oluşturulan akut, bulaşıcı bir hastalıktır.

ELISA: Enzym Linked Immunosorbent Assay

Antikor (Ab): Antikor, çok hücreli hayvansal organizmaların bağışıklık sistemi tarafından; kendi organizmalarına ait olmayan organik yapılara karşı geliştirilen glikoprotein yapısındaki moleküllerdir.

Antijen (Ag): Antijen, vücuda yabancı maddeler girdiği anda bağışıklık sistemince antikor oluşturulmasına neden olan moleküllerdir.

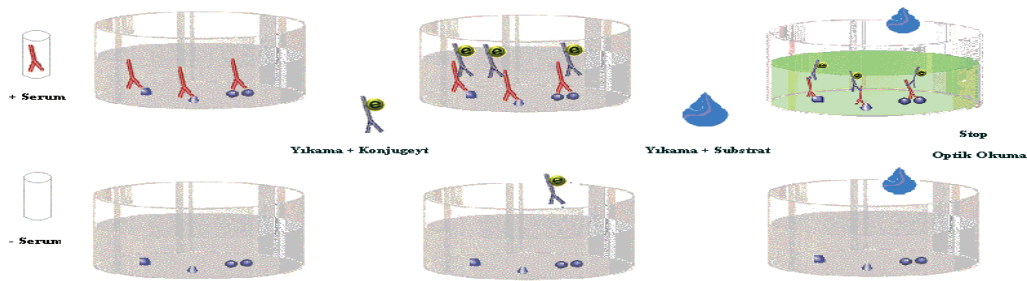
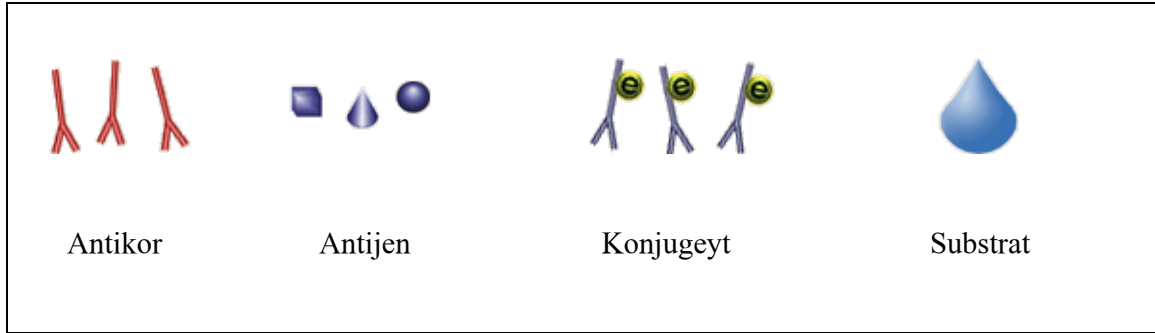
Konjugat: Bir enzim ile işaretlenmiş ikinci ajan, enzim ile işaretlenmiş antiglobülin.

Substrat: Biyokimyada enzimlerin tepkimelerinde işlenen maddelere verilen addır. ELISA da konjugeye bağlı olan enzime özgü alt tabakaya substrat denir. Sisteme (Ag-Ab kompleksi) bağlanmış konjugeye bağlı enzim uygun kromojen substratı parçaladığında ortaya çıkan renk, yapılacak kolorimetrik yöntemlerle ölçülerek bağlanmış olan enzim dolayısıyla bağlanmış olan antikor hakkında fikir verecektir.

OD: Optik dansite

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu test metodu, kanatlılarda Infectious Bronchitis (AIV) karşı oluşan antikorların varlığının ELISA testi ile tespitini anlatır. ELISA, katı bir faza bağlı olarak Antijen-Antikor (Ag-Ab) kompleksinin oluşabilmesi ve enzim ile işaretlenmiş konjugeye olarak isimlendirilen ikinci ajan ve uygun bir substrat ile reaksiyon sonucunda renkli son ürün şeklinde Ag-Ab kompleksinin varlığın saptanması için uygulanan test metodudur (**Tablo 2**).



Tablo 2: ELISA Test Metodu'nun Şematik Anlatımı

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

- ☐ Test edilecek kanatlı kan serumları

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ 96 gözlü U tabanlı mikropleyt
- ☐ Otomatik mikropipetler (tek kanallı ve 8–12 kanallı)
- ☐ Mikropipet uçları
- ☐ ELISA okuyucusu
- ☐ Vortex

7.3. Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanması

- ☐ ELISA Kiti

ELISA testi yapılırken kullanılacak kit bileşenleri kimyasal ve biyolojik maddelerden oluşur. Bunların bir kısmı kit içerisinde kullanıma hazır halde bulunmaktadır, diğer bir kısmı ise kullanımdan önce hazırlanması gerekir. Kullanımdan önce hazırlanması gereken reagentlerin dilusyonları kit protokolüne uygun olarak hazırlanır. Hazırlanan reagentler kitte belirtilen süre ve sıcaklıkta saklanır.

Teste başlamadan önce bütün gerekli reagentler oda sıcaklığına (21–27°C) gelene kadar bekletilir.

7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

Numunenin Hazırlanması

Testte kullanılacak örnek miktarı, test reagentlerinin kullanım konsantrasyonları ve inkubasyon süreleri, tercih edilen ticari ELISA kitinin protokolüne uygun olarak ayarlanır.

Genel olarak ELISA testinin temel basamakları aşağıda açıklanmıştır. Teste başlamadan önce antijen kaplı ELISA pleytine konulacak kontrol ve test serumlarının pleyt üzerindeki konumu kayıt edilir.

Muayene/Analizin Yapılması

1. **Negatif** ve **Pozitif** kontrol serumlarından kitin protokolüne uygun hacimde ve dilusyonda 2'şer veya 3'er göze (örneğin; A1-A2 negatif kontrol, H11-H12 pozitif kontrol veya A1-A2-A3 pozitif, negatif, pozitif kontrol H10-H11-H12 negatif, pozitif, negatif kontrol olacak şekilde) konulur.
2. **Referans** kontrol serumu 1 veya 2 göze konur. Referans kit kontrol serumları kitin protokolüne uygun hacimde ve dilusyonda kullanılır.
3. ELISA pleytinin kontroller dışındaki her bir gözüne kitin protokolüne uygun hacimde **diluent** konur ve üzerine önceden hazırlanmış olan **dilue serumlardan** belirli hacimde ilave edilerek test serumları kitte belirtilen final sulandırma oranında hazırlanmış olur.
4. Üzeri kapatılmış olan pleyt kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürede **inkube edilir**.
5. Süre sonunda **içerik dökülür** ve ELISA pleytinin her bir gözü test protokolünde önerilen konsantrasyonda hazırlanmış olan yıkama solüsyonu ile **3-5 kez yıkanır**.
6. Son yıkamadan sonra pleyt ters çevrilip kurutma kağıdına vurularak kalan solüsyonun iyice emdirilmesi sağlanır.
7. Belirtilen hacimde **Konjugat Solüsyonu** tüm gözlere ilave edilir.
8. Üzeri kapatılmış olan pleyt kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürede **inkube edilir**.
9. **Yıkama prosedürü** 5. ve 6. basamakta anlatıldığı gibi tekrarlanır.
10. Her göze protokole uygun miktarda **Substrat Solüsyonu** konur ve kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürede **inkube edilir**.
11. Reaksiyonu durdurmak için her göze belirtilen hacimde **Stop Solüsyonu** ilave edilir.
12. Test protokolünde verilen dalga boyunda ELISA okuyucu ile OD değerleri saptanır ve bilgisayar çıktısı alınır. Kit protokolünde verildiği şekilde sonuçlar yorumlanır.

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Test edilen örnekler, pozitif, negatif ve referans kontrol gözleri için okunan OD değerleri ile kit protokolünde ve kitin kalite kontrol sertifikasında verilen OD değerleri karşılaştırılır, geçerli sınırlar içerisinde ise test edilen örnekler pozitif ve negatif şeklinde ifade edilerek kalitatif ve/veya kantitatif olarak değerlendirilir.

Testte kullanılan pozitif, negatif ve referans kontrollerin beklenen standart seviyelerde çıkması halinde test geçerli olarak kabul edilir. Kit protokolünde ve kitin kalite kontrol sertifikasında verilen OD değerleri ile ölçülen OD değerleri karşılaştırılarak testin geçerliliği kontrol edilir.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.2 . http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.02_AIB.pdf.
- ☐ BioChek Test Kiti Kullanım Talimatı
- ☐ Synbioticks Test Kiti Kullanım Talimatı
- ☐ Idexx Kiti Kullanım Talimatı
- ☐ Guildhay Kiti Kullanım Talimatı

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VİRUSUNA (IBV) KARŞI OLUŞMUŞ ANTİKORLARIN TESPİTİNDE HEMAGLUTİNASYON İNHİBİSYON (HI) TEST METODU

1. AMAÇ

Avian Infectious Bronchitis virusuna (IBV) karşı oluşan antikorların Hemaglutinasyon ve Hemaglutinasyon İnhibisyon (HA-HI) test metodu ile tespiti amaçlanmaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Avian Infectious Bronchitis viral antikorlarının HA-HI test ile tespitini yapan Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarlarında kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

Sertifikalı Referans Standart (SRS): Referans olarak alınan, ölçü, miktar, titre gibi özellikleri bilinen, uluslararası bir kuruluş tarafından izlenebilirliği olan, sertifikalandırılmış kimyasal/ biyolojik madde gibi ürünlerdir.

IB: Infectious Bronchitis kanatlılarda coronaviruslar tarafından oluşturulan akut, bulaşıcı bir hastalıktır.

HA: Hemaglutinasyon

HI : Hemaglutinasyon-İnhibisyon

HAU: Hemaglutinasyon Ünitesi

OIE: Office International des Epizooties = Dünya Hayvan Sağlık Örgütü

PBS: Phosphate Buffered Saline

SPF: Specific Pathogen Free

v/v : Volüm/volüm

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu test; kullanılan Sertifikalı Referans Standart (SRS) antijenlerden yararlanılarak Infectious Bronchitis virusunun ya da bu virusa karşı yapılan aşılamalara oluşan immün yanıtın varlığı veya yokluğu ile seviyesini tespit etmek için uygulanır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

- ☐ Test Materyali; kan serumu
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS);
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS) Antijen [IBV-1(M41,793/B, QX, IT-02, D274 vb.)]
- ☐ Sertifikalı Referans Standart(SRS) Antiserum [IBV-1(M41,793/B,QX,IT-02,D274 vb.)]
- ☐ Sertifikalı Referans Standart (SRS) Negatif serum (SPF)

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ 96 gözlü U/V tabanlı mikropleyt
- ☐ 25-50 ml kapasiteli Otomatik Mikropipetler ve uçları
- ☐ Küvetler
- ☐ Pipet ve şarjlı pipettor
- ☐ Değişik ölçülerde vidalı kapaklı şişeler
- ☐ Santrifüj
- ☐ Enjektör
- ☐ Santrifüj tüpü
- ☐ Buzdolabı
- ☐ Laboratuvar saati

7.3.Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanması

Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.2-7.4 Hazırlanması:

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g (Susuz) veya 2.95 g (12 Sulu)

Steril distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilir ve pH 7.2-7.4'e ayarlanır. Testin uygulanması esnasında tampon solüsyon olarak ve aynı zamanda test için gerekli olan eritrosit süspansiyonunun hazırlanması için kullanılır. Buzdolabında (5°C±3°C) raf ömrü, şişenin ağzı açılmadıkça hazırlanmasından sonra 2 yıldır.

%1'lik Tavuk Eritrosit Süspansiyonu (v/v) Hazırlanması:

- ☐ 10 ml'lik enjektöre 5 ml kan için 5 ml antikoagulan (eşit hacimde) çekilir,
- ☐ Kan alma hayvanı olarak sağlıklı tavuklar kullanılır. Tavuğun kalbinden veya kanat altı venasından kan alındıktan sonra enjektör yavaşça döndürülerek kanın antikoagulan ile iyice karışması sağlanır.
- ☐ Kan enjektörden santrifüj tüpüne enjektörün iğne kısmı çıkarılmış halde yavaşça aktarılır,
- ☐ Antikoagulanlı kan 1000-1500 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edilir ve ayrılan süpernatant dikkatlice pipetle çekilir.
- ☐ Tüpün dip kısmında kalan eritrositin üzeri PBS ile doldurulur. Daha sonra yavaşça alt üst edilerek kanın PBS ile iyice karışması sağlanır, 5 dakika santrifüj edilir ve üstteki sıvı atılır. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır.
- ☐ Son yıkamadan sonra üstte kalan berrak sıvı dikkatlice alınıp atılır ve dipte kalan eritrosit çökeltisinden 1 ml alınarak 99 ml PBS içerisine katılır. Böylece %1'lik eritrosit süspansiyonu hazırlanmış olur.
- ☐ Hazırlanan eritrosit süspansiyonunun çalışıp çalışmadığının kontrolü için U/V tabanlı mikroyetkin kontrol için çalışılacak sıranın gözlerine 25 ml PBS ve üzerine 25 ml %1'lik tavuk eritrosit süspansiyonu konulur.
- ☐ Pleytin kenarlarına hafifçe vurularak PBS ile tavuk eritrosit süspansiyonunun iyice karışması sağlanır ve eritrositlerin çökmesi için yaklaşık 22°C±3°C'de 40 dakika / 5°C ±3°C'de 60 dakika beklenir.
- ☐ Çalışılan gözdeki eritrositlerin belirgin bir düğme formasyonu oluşturup, pleyt hafifçe eğimli tutulduğunda gözyaşı akıntısı tarzında şekil oluşturması, hazırlanan eritrosit süspansiyonun HA-HI testinde kullanılabileceğini gösterir.

7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

Numunenin Hazırlanması

Kan serumu

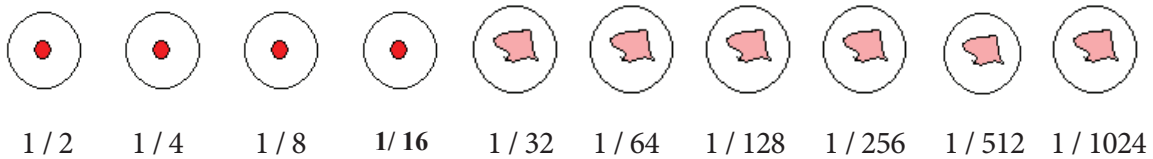
Antijen: Sertifikalı Referans Standart (SRS) Antijen [IBV (M41)] sulandırıldıktan sonra 4 HAU' ne ayarlanır. HA test sonucu 4 HAU olan antijen, HI testinde kullanılır. HA sonucu 4 HAU değil ise, bulunan test sonucuna göre tekrar 4 HAU ayarlanır, tekrar kontrol edildikten sonra HI testine devam edilir.

Muayene/Analizin Yapılması

Hemaglutinasyon İnhibisyon (HI) Testi

- 1) 96 gözlü V veya U tabanlı mikropleytin çalışılacak tüm gözlerine 25 µl PBS konulur, Test pleytinin çalışılacağı sıranın ilk gözüne 25 µl test serumu konulur,
- 2) Test serumun iki katlı seri dilusyonları yapılır ve bu sıradaki her bir göze 4 HAU virus süspansiyonundan, Pozitif kontrol için ayrılan sırada da SRS Antiserum [IBV (M41)]' un dilusyonu yapılarak, sıranın her bir gözüne 4 HAU SRS Antijen [IBV (M41)]' den konulur,
- 3) Pleytin kenarlarına hafifçe vurularak iyice karışması sağlanır ve daha sonra + 4°C'de yaklaşık 30 dakika beklenir.
- 4) Bekleme süresi bitiminde tüm gözlerle %1'lik tavuk eritrositinden 25 µl eklenir ve hafifçe karıştırıldıktan sonra eritrositlerin çökmesi için + 4°C'de yaklaşık 30 dakika ya da negatif kontrol gözündeki bariz bir düğme formasyonu görülünceye kadar beklenir.
- 5) Bu son bekleme süresi bitiminde ise pleyt gözlemlenerek düğme formasyonu oluşan yani Hemaglutinasyonun inhibe olduğu, HI (+) gözlerin varlığı saptanır (**Şema 1**).

Virus izolatının, SRS Antiserum [IBV (M41)] ile tam olarak inhibisyon göstermesi o antiserum ile HI (+) olduğunu gösterir. Bu sonuçlara göre virus izolatının teşhisi ile ilgili değerlendirme yapılır.



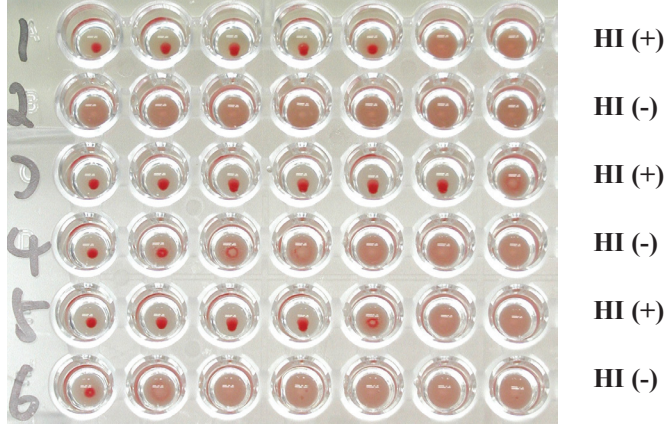
Şema 1 : HI (+) Test Sonucu Şematik Görüntü

Sonuçların kalitatif değerlendirilmesi;

İnhibisyon (düğme formasyonu) olan gözler = **Pozitif**

İnhibisyon (düğme formasyonu) olmayan, dantela tarzında kalan gözler = **Negatif** olarak ifade edilir (**Şema 2**).

HI Test Sonucu



Şema 2 : HI (+) ve HI (-) pleyt görünümü

Negatif kontrol (kan kontrol): Bu sıradaki gözlerde eritrositin antijen ile bağlanıp dantelâ tarzında kalması, Pozitif kontrol (SRS Antiserum [IBV (M41,793/B,QX, IT-02, D274 vb.)] ve SRS Antijen [IBV (M41793/B, QX, IT-02, D274 vb.)]): Bu sıradaki gözlerin düğme formasyonu verip, pleyt eğimli tutulduğunda gözyaşı akıntısı tarzında şekil oluşturması testin geçerliliğini kanıtlar.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- Cavanagh,D., Naqi,S. (2003). Infectious Bronchitis. Diseases of Poultry, 11. Baskı. Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly,A.M., McDougald,L.R., Swayne,D.E., eds. Ames Iowa 101-119.
- Laboratory Biosafety Manual - Third Edition <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Bölüm 2.3.2 . http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.02_AIB.pdf.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

TAVUK EMBRİYO PRİMER HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE ŞÜPHELİ MATERYALDEN İNFEKSİYÖZ LARİNGOTRAKEİTİS (ILT, INFECTIOUS LARYNGOTRACHEİTIS) VİRÜSÜNÜN İZOLASYONU

1. AMAÇ :

İnfeksiyöz Laringotrakeitis (ILT) hastalığının teşhisi için laboratuvara gönderilen evcil veya yabani kanatlıların otopsi sonrası alınan doku ve swap örneklerinden hazırlanan inokulum sıvılarının tavuk embriyo hücre kültürlerinde izolasyonu amacıyla yapılır.

2. UYGULAMA ALANI :

Kanatlı Hastalıkları Teşhis laboratuvarına sahadan gelen kanatlı hayvanlarda ILT hastalığının teşhisi veya rutin kontrolleri amacıyla yapılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların infeksiyonuna yol açma riski nedeni ile infeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “[OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual](#)”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

(ILT): Infectious laryngotracheitis; Tavukların üst solunum yollarında hastalığa neden olan bulaşıcı ve öldürücü bir virüs ve bu virusun neden olduğu hastalığa verilen isimdir.

(CEF): Tavuk embriyo primer hücre kültürü; 9-11 günlük SPF yumurtalardan elde edilen hücreleri.

SPF: Spesific Pathogen Free

İnokulum: Virus izolasyon çalışmalarında kullanılmak üzere organ ve kanat tüylerinden alınan örneklerinin parçalanmasıyla hazırlanmış materyal

CPE: Sitopatik etki

6. TEST METODUN KISA TANIMI:

Virolojik teşhis metodu olarak hasta veya hastalıktan şüpheli kanatlılardan alınan materyallerden viral etken izolasyonu için hazırlanan süpernatantın tavuk embriyo primer hücre kültürüne inokule edilmesidir.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Ölü Kanatlılardan trake, trakeal svap alınır. Bu örnekler Viral Transport Medium (İzotonik PBS, pH 7,0-7,4 hazırlanıp içersine koruyucu olarak %10 glycerol, antibiyotik (penicillin 10.000 U/ml, streptomisin 10 mg/ml ve gentamisin 250 µg/ml) ve Mycostatin 1000 ünite/ml

katılır.) içinde laboratuara soğuk zincir içinde gönderilir.

7.2. Kullanılan ekipman

- ☐ Yumurta kontrol kutusu
- ☐ Steril delici
- ☐ Steril enjektör (1 veya 2 cc. lik, 0.1 cc. taksimatlı)
- ☐ 15 ml'lik steril tüpler ve tüp spor
- ☐ Silinmeyen özellikte kalem,
- ☐ Laminar flow cabinet
- ☐ Etüv
- ☐ Buzdolabı
- ☐ Steril eğri uçlu küçük makas
- ☐ Tek dişli küçük pens
- ☐ Otomatik pipeti
- ☐ Tek kullanımlık steril pastör pipeti
- ☐ CO₂ etüv
- ☐ İnvert mikroskop
- ☐ Flask

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ Fosfat Buffer Saline
- ☐ Viral Transport Medium
- ☐ Penicilinle-Streptomycine stok solüsyonun (500X)
- ☐ Gentamycin
- ☐ Mycostatin

- ☐ DMEM F12 Ham vasat
- ☐ Fötal dana serum
- ☐ %70'lik Ethanol / Tentürdiyot
- ☐ Dezenfektan

7.4. Numunenin Hazırlanması ve Analiz / Test / Muayenesinin Yapılması

Dokulara Uygulanacak İşlemler

- ☐ Organ parçaları (ortalama 1 gr) steril havan konur.
- ☐ Çok az miktarda steril kum üzerine dökülür ve steril havanda ile ezilir.
- ☐ Organlar yeteri kadar homojenize edildikten sonra antibiyotik solüsyonu [Penisilin (2000ünit/ml)-Streptomycin (2mg/ml), Gentamysin (50µg/ml) ve Mycostatin (1000 ünit/ml)] içeren 10 ml vasata eklenir ve yeniden homojenize edilir.
- ☐ Organ homojenizenizasyonu steril 10 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılır ve 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
- ☐ Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant tavuk embriyo primer hücre kültürü inokülasyonu için steril tüpe alınır ve saklanır.
- ☐ 1-2 saat oda sıcaklığında beklemeye bırakılır. Eğer bu mümkün değilse birkaç gün +4°C'de saklanabilir.
- ☐ Bakteriyal kontaminasyona karşı inokülasyondan önce 0.2µm'lik filtrelerden geçirilir.

Tavuk embriyo primer hücre kültürünün hazırlanması

- ☐ 3 tane 9-11 günlük yumurtalar, yumurta kontrol kutusu ile karanlık bir ortamda fertilité muayenesine tabi tutulup, fertil olanlarda embriyonun yeri ve yumurtanın hava boşluğu kurşun kalem ile çizilir. .
- ☐ Steril kabin (Lamin-air) içerisinde, yumurtaların üst kısımları %70 ethanol ya da seyreltilmiş tentürdiyot ile pamuk yardımıyla silinerek dezenfekte edilir.
- ☐ Hava kesesini belirleyen çizginin 1-2 mm makas yardımı ile kesilerek yumurta kabuğu kaldırılır.
- ☐ Embriyolar steril petri kutularına alınarak, baş, ayak ve kanat kısımları steril makasla kesilerek uzaklaştırılır.
- ☐ Geriye kalan kısımlar makasla küçük parçalara ayrılır. Daha sonra içerisinde 20 ml PBS bulunan tüplere aktararak yıkanır. Bu işlem 3 defa tekrar edilir. Üst kısım atılır.
- ☐ Yıkanmış doku parçaları steril bir kaşık yardımı ile içerisinde manyetik çubuk bulunan erlanmayerlere aktarılır.
- ☐ Üzerine 37°C'de ısıtılmış % 0.05 tripsin içeren 20 ml versen solüsyonu ilave edilerek oda derecesinde 30 dk. veya tercihen 37°C'de 15 dk. bir manyetik döndürücü üzerinde ön tripsinizasyona bırakılır.

- ☐ Bu işlem 3 veya 4 defa tekrar edilir.
- ☐ Her etabın sonunda hücre süspansiyonları steril tülbentten süzülme suretiyle alınarak bir şişe de toplanır ve şişeye eşit miktarda % 10 dana serumlu DMEM F-12 Ham besiyeri konur.
- ☐ Toplanan hücre süspansiyonu steril çift katlı tülbentlerden santrifüj tüpüne süzülür. 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilir.
- ☐ Santrifüj sonrası üstteki sıvı dökülür, dipte kalan hücreler %10 dana serumlu DMEM F-12 Ham besiyeri konur.
- ☐ 200 µl hücre süspansiyonu 200 µl %0,4 trypanblue ile boyandıktan sonra haemocytometer ile hücre sayımı yapılarak her ml'de 300-500.000 hücre bulunacak şekilde sulandırılır.
- ☐ Sulandırılan hücre süspansiyonu 25 cm'lik flasklara alınarak 10 ml %10 dana serumlu DMEM F-12 Ham ilave edilerek etüve (37°C) kaldırılır.

Organ ve svaplardan hazırlanan inokulumun ekilmesi

Hücreler monolayer olunca serumsuz vasatla yüzeyleri yıkanır ve 0.2 ml süpheli inokulum hücreye ilave edilir. Üzerine 10 ml %10 dana serumlu DMEM F-12 konur. Aynı işlem kontrol olarak kullanılacak hücrede de yapılır ve 37°C deki etüve konulur. 24 saat aralıklar ile CEF mikroskop altında CPE görülünceye kadar kontrol edilir

CEF Toplanmasında Uygulanacak İşlemler

- ☐ 24 saat aralıklar ile CEF mikroskop altında CPE görülünceye kadar kontrol edilir. 2 gün aralıkla vasatı değiştirilir. 3-5 gün arasında CPE görüldüğü zaman flasklar -30°C'de dondurulur. 2 defa dondurulup çözülür. 5000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilir.
- ☐ Dezenfekte edilmiş steril kabin (Lamin-air) içerisinde, santrifüj sonrası üst sıvı 3 ml'lik cryo viallere alınarak -80°C'de saklanır.

7.5 Sonuçların değerlendirilmesi:

- ☐ İnokulasyon yapılan CEF 24 saat aralıklar ile mikroskop altında 3-5 gün içerisinde CPE görülünceye kadar kontrol edilir. CPE görülmediği zaman en fazla 7-10 gün içinde değerlendirilir. Hücre kontrol olarak kullanılan flaskta CPE'nin görülmemesi, inokule edilen hücrede CPE'nin görülmesi gerekmektedir.
- ☐ AGID ile tespit edilemeyen materyal inokulumların, negatif olarak raporlanmadan önce en az 2 kez daha CEF'de pasaj yapılmasını gereklidir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER:

- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008), Avian Infectious Laryngotracheitis, Bölüm 2.3.3.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS (ILT, İNFEKSİYÖZ LARİNGOTRACHEİTİS HASTALIĞI)'İN PCR İLE TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Kanatlılarda, İnfeksiyöz laringotrakeit hastalığı (ILT)'nden şüpheli hayvanlardan elde edilen trakea homejenatı, tracheal, kloakal ve oro-nasal sıvap örneklerinden PCR ile ILTV'nin tespit edilmesidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu, Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarları'nda ILT hastalığının teşhisinde kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

ILT: Tavukların larinks ve üst solunum yollarında enfeksiyona yol açan, mortalite ve morbiditesi yüksek bulaşıcı viral enfeksiyonudur.

ILTV: Infectious Laryngotracheitis Virus

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI:

Kanatlı trakea homejenatı ve tracheal, kloakal ve oro-nasal sıvap örneklerinden ve standardart ILTV antijeninden DNA ekstraksiyonun yapılması, ILTV spesifik primerler yardımıyla PCR yapılması ve PCR ürünlerinin agar jel elektroforeziste yürütülmesinden sonra ürün boyutunun bp olarak tespit edilmesidir.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Trake homejenatı

Tracheal, kloakal ve oro-nasal svap örnekleri

CAS sıvısı

Standart ILT Antijen

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Santrifüj
- ☐ Otomatik pipet ve pipet uçları
- ☐ 1.5 ml DNaz RNaz ependorf tüp
- ☐ 0.2 ml ependorf tüp
- ☐ PCR cihazı
- ☐ Elektroforez tankı
- ☐ Güç kaynağı
- ☐ Görüntüleme cihazı
- ☐ Laminar flow
- ☐ Su banyosu
- ☐ DNA ekstraksiyon kiti
- ☐ Vortek

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ Taq DNA Polymerase
- ☐ DNase RNase free distile su
- ☐ Primerler

ILTp32 U2; 5'-CTACGTGCTGGGCTCTAATCC-3'

ILTp32L2; 5'-AAACTCTCGGGTGGCTACTGC-3'

- ☐ Hedef DNA
- ☐ Ethidium bromide
- ☐ TAE / TBE buffer
- ☐ DNA ladder
- ☐ Loading dye

7.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA izolasyonu

Örneklerin hazırlanması DNA ekraksiyon kitindeki protokole göre yapılır.

PCR

Her PCR reaksiyonu 50 µl olarak hazırlanır. Pozitif kontrol olarak ILTV DNA'sı, negatif kontrol olarak su kullanılır.

PCR Bileşenleri

□ 10xReaction buffer	5 µl
□ MgCl ₂	1.5 mM
□ dNTP's	200 µM of each
□ Taq Polymerase enzimi	2.5 unit
□ Primer 1	10 pmol
□ Primer 2	10 pmol
□ DNA template	0.1-1.0 µg (2 µl)
Steril DNaz RNaz distile su	ile 50 µl'ye tamamlanır

PCR basamakları

İlk denatürasyon	95°C'de 5 dk.	1 siklus
Amplifikasyon	94°C'de 30 sn. 55°C'de 30 sn. 72°C'de 30 sn.	35 siklus

olarak DNA amplifiye edilir.

Elektroforez

- %2 lik agar TAE buffer içinde hazırlanır. Mikrodalga fırında eritilir ve içersine 0.5 µg/ml Ethidium bromide eklenir. Jel kастı hazırlanır tarak yerleştirilir ve hazırlanan agar içine dökülür.
- Agar mat renk alınca jel tankı içine yerleştirilir ve jel tankı agarın üzerini örtecek şekilde TAE buffer ile doldurulur.
- PCR ürününden 10ul alınır 1,5 µl jel loading dye ile karıştırılır ve agar üzerinde tarağın oluşturduğu deliklere doldurulur.
- İlk deliğe de DNA ladderi yüklenir.

Örnekler 60Voltta agarın 2/3ünü geçene kadar yürütülür

7.5. Sonuçların değerlendirilmesi

Agar UV ışığı altında incelenir. **588 bp**'lik bant ILT virusunun varlığını gösterir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER:

- ☐ Andrea Vögtlin, Lukas Bruckner, Hans-Peter Ottiger (1999). Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of vaccine contamination by infectious laryngotracheitis virus. 2501-2506.
- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008), Avian Infectious Laryngotracheitis, Bölüm 2.3.3.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLILARDA AVIAN METAPNEUMOVIRUS İNFEKSİYONLARININ TEŞHİSİNDE RT-PCR TESTİ

1. AMAÇ

Kanatlılarda, avian metapneumovirus infeksiyonları'na karşı üst solunum kanalından alınan klinik ve nekropsi örneklerinde etken RNA'sının N genine spesifik primerlerle saptanmasında kullanılan RT-PCR testinin standart bir şekilde yapılmasını sağlamaktır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu, avian metapneumovirus infeksiyonu şüpheli kanatlı hayvanların üst solunum kanalından alınan klinik ve nekropsi örneklerinde virüs RNA'sının RT-PCR ile tespitini yapan tüm Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarları'nda geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların infeksiyonuna yol açma riski nedeni ile infeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual", esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

aMPV: Avian metapneumovirus, hindi ve tavuklarda yüksek oranda bulaşıcı üst solunum kanalı infeksiyonuna neden olan akut bir viral hastalıktır. Hastalığın hindilerdeki formu hindi rhinotracheitisi, tavuklardaki formu ise şişkin baş sendromu (swollen head syndrome, SHS) olarak da bilinmektedir.

cDNA: Komplementer deoksiribonukleik asit

RNA: Ribonukleik asit

RT: Reverz Transkripsiyon

RT-PCR: Reverz Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TBE: Tris Borate EDTA

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

RT-PCR Testi, viral RNA'nın farklı materyallerde (standart suşlar, klinik örnekler, nekropsi materyalleri, vb.) saptanmasına yönelik moleküler bir tekniktir. Bu teknik, RNA izolasyonu (ekstraksiyonu), RT aşaması ile cDNA eldesi, PCR ile elde edilen cDNA'daki spesifik bölgelerin amplifikasyonu (çoğaltılması) ve bu işlemler sonucunda elde edilen ürünlerin elektroforeze edilerek görüntülenmesi aşamalarından oluşmaktadır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Virus sadece sinuslar ve turbinatlarda ve çok kısa bir süre için bulunabileceğinden, virus deteksiyonu amacıyla örneklerin infeksiyonun erken aşamalarında toplanması önem arz etmektedir. İdeal olarak, hastalığın akut devresindeki kanatlılardan steril svablar kullanılarak üst solunum kanalından örnekleme yapılması gerekmektedir. En uygun örnekler, nazal eksudatlar, koanal yarık svabları, sinus ve turbinat dokusu kazıntı örnekleridir. Virus infekte hindi palazlarının trakea ve akciğerleri ve nadiren iç organlarından da örneklenebilmektedir.

Örneklerin teşhis laboratuvarına bekletilmeden soğuk zincirde transportu önemlidir. Üç günden uzun sürecek olan gecikmeler söz konusu olduğunda ise örnekler gönderilmeden önce dondurulmalıdır. PCR analizi için alınan svab örnekleri ise kuru şekilde, ancak yine buz üzerinde ya da dondurulmuş olarak gönderilmelidir.

Testte kullanılacak diğer materyaller ise;

- ☐ Pozitif kontrol RNA (Aşı suşlarından ekstrakte edilmiş Avian metapneumovirus RNA'sı)
- ☐ Negatif kontrol (Steril distile su, PCR grade water, Template DNA içermeyen PCR karışımı)

7.2 Kullanılan ekipman

- ☐ Steril kabin (Laminar flow, Class II tip)
- ☐ Thermal cycle
- ☐ Derin Dondurucu (en az -70°C'lik)
- ☐ Otomatik pipetler ve bunlarla uyumlu DNase RNase ari filtreli steril pipet uçları,
- ☐ Elektroforez tankı ve güç kaynağı
- ☐ Buz kutuları (ice box)
- ☐ Kuru ısıtma blokları
- ☐ Soğutmalı santrifüj

- ☐ Vorteks
- ☐ UV transilluminator veya bilgisayar bağlantılı biyogörüntüleme sistemleri
- ☐ RNA ekstraksiyon kitleri (spin kolon teknolojisi kullanan)
- ☐ RT-PCR kitleri

7.3. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

RNA İzolasyonu

RT-PCR'da kullanılacak template RNA, homojenize dokulardan, trakeal sıvı, supernatant ve sinüs sıvısından silika kolon kullanan ticari kitler veya manyetik boncuk kullanan ticari RNA ekstraksiyon solüsyonlarıyla kit protokolündeki talimatlara uyularak ekstrakte edilebilmektedir.

Primerler

Tablo 1. Avian metapneumovirus altgruplarından A, B, C ve D'nin N geninin saptanmasına kullanılan primerler.

Hedef Gen	Primer ismi	5'-3' Dizisi	Pozisyonu	Ürün büyüklüğü
N Geni	Nc	TTCTTTGAATTGTTTGAGAAGA	632-653	RT-primeri
	Nx	CATGGCCCAACATTATGTT	830-812	115
	Nd	AGCAGGATGGAGAGCCTCTTTG	716-737	115

RT-PCR'in Uygulanması

RT-PCR testi, RT ve PCR reaksiyonlarının aynı tüpte şekillendiği tek aşamalı bir şekilde (one step RT-PCR) veya önce RT aşamasının bunu takiben de PCR'ın uygulandığı 2 aşamalı (two step RT-PCR) şekilde kit protokollerine uygun olarak gerçekleştirilebilmektedir. Her iki yöneme yönelik ticari kitler bulunmaktadır.

- ☐ Bu amaçla, izole edilen RNA'dan komplementer DNA (cDNA) sentezi 20µl'lik final hacim içerisinde Nc RT primeri ve (ya da oligodT veya PCR'da kullanılacak olan primer çiftinin reverse primeri ile) tercih edilecek RT enzimi (ayrı olarak temin edilebilen ya da ticari kitle birlikte gelen) ile gerçekleştirilebilir.
- ☐ Bundan sonra PCR amplifikasyonu Taq DNA polimeraz enzimi kullanılarak üretici ve/veya kullanılan kit protokol önerilerine uygun bir şekilde uygulanır.
- ☐ Amplifikasyon koşulları şu şekildedir: 15 dk. 94°C'de ön denatürasyonu takiben 94°C'de 20 sn, 51°C'de (Nd/Nx primer çifti için) 45 sn., 72°C'de 45 sn.'lik 30 siklusluk amplifikasyon sonrasında 72°C'de 10 dk. final ekstansiyon.

Elektroforez

Bu aşama diğer tüm aşamalardan ayrı bir oda veya bölmede yapılır.

Agaroz jel, 0.5xTBE buffer içinde %1.50 agaroz eritilerek hazırlanır. Erimiş jele final konsantrasyonu

0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür ilave edilir ve kalıba dökülür. Jel, donmasını takiben running buffer olarak 0.5xTBE buffer içeren elektroforez tankına yerleştirilir. PCR ürünleri (10 µl), 6xloading buffer (2 µl) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenir. Ayrıca uygun moleküler marker (100bp) da yüklenir. Elektrotlar arası mesafeye göre her bir cm'ye 5-10 V hesabıyla doğru akım uygulanır.

Elektroforezi takiben jel UV transillüminatör altında veya bir jel görüntüleme sisteminde gözlenir.

7.4. Sonuçların Değerlendirilmesi

Jelde pozitif kontrol ve test örneklerinde **115 bp**'lik bantların görülmesi, negatif kontrolde ise herhangi bir bant görülmemesi test örneklerinin aMPV RNA'sı yönünden pozitif olduğunu ortaya koymaktadır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2009), Turkey Rhinotracheitis (avian metapneumovirus infections), Bölüm 2.3.15.
- ☐ Laboratory Biosafety Manual - Third Edition (<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>)
- ☐ Bayon-Auboyer MH, Jestin V, Toquin D, Cherbonnel M, Eterradosi N (1999). Comparison of F-, G-, and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virüs. Arch. Virol. 144, 1091-1109.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

TAVUKLARDA AVIAN METAPNEUMOVİRUS (aMPV) İNFEKSİYONLARININ ELISA TESTİ İLE SEROLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Tavuklarda avian metapneumovirus (aMPV) infeksiyonlarının serolojik teşhisi ve tavuk kan serumlarında aMPV (ART) antikorlarının miktarının belirlenmesinde ELISA testinin standart bir şekilde yapılmasını sağlamaktır.

2. UYGULAMA ALANI

Açıklanan yöntem, tavukların kan serumlarında aMPV antikorlarının miktarının ELISA ile saptanmasında kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalıklar ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların infeksiyonuna yol açma riski nedeni ile infeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

ELISA ile ilgili uyarı/önlemler/dikkat edilecek hususlar:

- ☐ Kit ve bütün reagentler 2-8°C’de muhafaza edilmelidir.
- ☐ Son kullanma tarihi geçmiş kitler ve ilgili reagentler kullanılmamalıdır.
- ☐ Farklı serilerdeki kitlerin malzemeleri ve reagentleri karıştırılarak kullanılmamalıdır.
- ☐ Her örnek için ayrı pipet ucu kullanılmalıdır.
- ☐ Substrat solusyonu oksidan ajanlarla ve kuvvetli ışığa maruz bırakılmamalıdır.
- ☐ Ağızla pipetleme yapılmamalıdır.

Test sırasında çıkan atıklar toksik madde içerebildiğinden bunlar ayrı bir yerde toplanarak Atık İmha Prosedürüne göre imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

aMPV: Avian metapneumovirus, hindi ve tavuklarda yüksek oranda bulaşıcı üst solunum kanalı infeksiyonuna neden olan akut bir viral hastalıktır. Hastalığın hindilerdeki formu hindi rhinotracheitisi, tavuklardaki formu ise tavuk rhinotracheitisi (ART) veya şişkin baş sendromu (swollen head syndrome, SHS) olarak da bilinmektedir.

ART: Avian Rhinotracheitis

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

IgG: Immunglobulin G

pNPP: p-Nitrophenyl fosfat

SHS: Swollen Head Syndrome

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

ART şüpheli tavuk kan serumlarında bu etkene karşı oluşan antikorları tespit etmeye yönelik bir indirekt ELISA test yöntemidir. Bu yöntemle hastalığın serolojik tanısı yapılabildiği gibi antikor düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesi ve büyük sürülerin bağışıklık durumunun izlenmesi de mümkündür. ELISA, katı bir faza bağlı olarak Antijen-Antikor (Ag-Ab) kompleksinin oluşabilmesi ve enzim ile işaretlenmiş konjugeyt olarak isimlendirilen ikinci ajan ve uygun bir substrat ile reaksiyon sonucunda renkli son ürün şeklinde Ag-Ab kompleksinin varlığın saptanması için uygulanan test metottur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal: Tavuklarda aMPV infeksiyonlarının serolojik teşhisi ve ART (aMPV) antikorlarının miktar ve homojenitesinin belirlenmesi için uygulanan ELISA testinde tüm sürüyü temsilen 20-24 (optimal numune sayısı 23 olarak belirlenmiştir) hayvandan kan serumları örneklenerek bunlar laboratuvara soğuk zincirde gönderilir. Hemolizli kontamine vb serumlar test için kullanılmaz. Serumlar hemen test edilmeyecekse +4°C'de 3 gün süreyle -20°C'de yıllarca saklanabilir.

7.2. Kullanılan ekipman:

- ☐ Ticari ELISA kitleri (ART kaplı plateler, konjugat, substrat, substrat tamponu, stop solüsyonu, örnek sulandırma sıvısı, yıkama tamponu, negatif ve pozitif kontroller)
- ☐ 8 ya da 12 kanallı otomatik pipet
- ☐ Otomatik pipetler (1-10 µl/10-100 µl, 100-1000 µl)
- ☐ Numune dilusyonları için plastik endorf tüpler (1.5-2 ml)
- ☐ Distile ya da deiyonize su

- ☐ Kit protokolünde önerilen filtreli mikrotitre plate okuyucu
- ☐ Mikro titre plate yıkayıcı
- ☐ Bilgisayar
- ☐ Sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan bilgisayar yazılımı

7.3. Kullanılan kimyasallar:

ELISA testi yapılırken kullanılacak kit bileşenleri kimyasal ve biyolojik maddelerden oluşur. Bunların bir kısmı kit içerisinde kullanıma hazır halde bulunmaktadır, diğer bir kısmı ise kullanımdan önce hazırlanması gerekir. Kullanımdan önce hazırlanması gereken reagentlerin dilusyonları kit protokolüne uygun olarak hazırlanır. Hazırlanan reagentler kitte belirtilen süre ve sıcaklıkta saklanır.

Reagentlar kullanılmadan önce ısıları oda sıcaklığına (18-25°C) ulaşmaya kadar beklenmelidir. Test için uygun oda sıcaklığı ELISA Kitleri arasında farklılık gösterebilir.

7.4. Testin Uygulanması

- ☐ Her bir test numunesini (serumları) sulandırma sıvısı kit protokolünde belirtilen oranda sulandırılır.
- ☐ ART virus antijenleri ile kaplanmış olan plateleri poşetlerinden çıkarılır ve her bir numunenin nereye eklendiğini kaydedilir.
- ☐ Pleytteki A1 ve B1 gözlerine kit protokolünde belirtilen hacimde negatif kontrol eklenir.
- ☐ Pleytteki C1 ve D1 gözlerine kit protokolünde belirtilen hacimde negatif kontrol eklenir.
- ☐ Bazı kitlerde bulunan referans kontrol serumu gözlerine kitin protokolüne uygun hacimde konur
- ☐ Sulandırılmış test edilecek serum örneklerinden gözlerine kitin protokolüne uygun hacimde konur.
- ☐ Üzeri kapatılmış olan pleyt kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürede inkübe edilir.
- ☐ Süre sonunda içerik dökülür ve ELISA pleytinin her bir gözü test protokolünde önerilen konsantrasyonda hazırlanmış olan yıkama solusyonu ile 3-5 kez yıkanır.
- ☐ Son yıkamadan sonra pleyt ters çevirilip kurutma kâğıdına vurularak kalan solüsyonun iyice emdirilmesi sağlanır.
- ☐ Belirtilen hacimde Konjugat Solüsyonu tüm gözlere ilave edilir.
- ☐ Üzeri kapatılmış olan pleyt kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürede inkübe edilir.
- ☐ Yıkama prosedürü 5. ve 6. basamakta anlatıldığı gibi tekrarlanır.
- ☐ Her göze protokole uygun miktarda Substrat Solüsyonu konur ve kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürede inkübe edilir
- ☐ Reaksiyonu durdurmak için her göze belirtilen hacimde Stop Solüsyonu ilave edilir.

Test sonuçları bir ELISA okuyucuda kit protokülünde önerilen dalga boyunda okunur.

ELISA'da test edilen örnekler, pozitif, negatif ve referans kontrol gözleri için okunan OD değerleri ile kit protokülünde ve kitin kalite kontrol sertifikasında verilen OD değerleri karşılaştırılır, geçerli sınırlar içerisinde ise test edilen örnekler pozitif ve negatif şeklinde ifade edilerek kalitatif ve/veya kantitatif olarak değerlendirilir. Değerlendirmede kite ait hazır bilgisayar programları da kullanılabilir.

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

ELISA'da testte kullanılan pozitif, negatif ve varsa referans kontrollerin beklenen standart seviyelerde çıkması halinde test geçerli olarak kabul edilir. Referans serum yok ise laboratuvarın kendisine ait standart pozitif kontrol ve negatif kontrollerin beklenen değerler içinde olup olmadığı kontrol edilir. Kit protokülünde ve kitin kalite kontrol sertifikasında verilen OD değerleri ile ölçülen OD değerleri karşılaştırılarak testin geçerliliği kontrol edilir.

Değerlendirme sonuçları kaydedilir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ Idexx, Biocheck veya Synbiotics gibi Türkiye'de kullanım için izin veya ruhsat almış kitlelere ait kit kullanım kılavuzu.
- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2009), Turkey Rhinotracheitis (avian metapneumovirus infections), Bölüm 2.3.15.
- ☐ Laboratory Biosafety Manual - Third Edition (<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>)

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

TAVUKLARDA INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS (IBDV, İNFEKSİYÖZ BURSAL HASTALIK VİRUSU)'UN RT-PCR TESTİ İLE MOLEKÜLER TANISI

1. AMAÇ

Tavuklarda, İnfeksiyöz Bursal Hastalık (IBD)'ye neden olan virusların tespiti ve tiplendirilmesinde kullanılan RT-PCR testinin standart bir şekilde yapılmasını sağlamaktır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu, İnfeksiyöz Bursal Hastalık (IBD) şüpheli tavukların bursa Fabricius'larında virüs RNA'sının RT-PCR ile tespitini yapan tüm Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarları'nda geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual", esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

IBD: İnfeksiyöz Bursal Hastalık (Gumboro Hastalığı, IBD), 3-6 haftalık yaştaki genç tavuklarda ölümler ve immunosupresyon ile karakterize bulaşıcı bir viral hastalıktır.

IBDV: İnfeksiyöz Bursal Hastalık Virusu

cDNA: Komplementer deoksiribonukleik asit

DMSO: Dimetil sülfoksit

RNA: Ribonukleik asit

RT: Reverz Transkripsiyon

RT-PCR: Reverz Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

RT-PCR üç adımda gerçekleştirilmektedir: çalışılan örnekten nükleik asitlerin ekstraksiyonu, IBDV RNA'sının cDNA'ya reverz transkripsiyonu (RT) ve elde edilen cDNA'nın PCR ile amplifikasyonu. Son iki aşama için araştırmacı primerler adı verilen virüs spesifik nükleotid diziye komplementer kısa diziler belirlemelidir. Primerlerin seçildiği lokasyona bağlı olarak genomun farklı bölgeleri çoğaltılabilmektedir. Aşağıdaki örnekte dış kapsid proteini olan VP2'yi kodlayan genin orta orta 1/3'lük kısmının amplifikasyonunu sağlamaktadır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1 Materyal

Hastalığın akut aşamasındaki şüpheli 5 tavuktan aseptik olarak bursa Fabricius'lar elde edilir. Bursalar çift bistüri kullanılarak parçalanır. Az miktarda steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ya da PBS (phosphate buffered saline) eklenerek bursalar doku homojenizatöründe homojenize edilir. Homojenat 3000 g'de 10 dk. santrifüje edilir. Supernatant sıvı aşağıda tanımlanan incelemelerde kullanılmak üzere toplanır.

- ☐ Pozitif kontrol IBDV RNA (Intermediate aşı suşları, D78 suşu)
- ☐ Negatif kontrol

7.2 Kullanılan ekipman:

- ☐ Steril kabin (Laminar flow, Class II tip)
- ☐ Thermal cycle
- ☐ Derin Dondurucu (en az -70°C'lik)
- ☐ Otomatik pipetler ve bunlarla uyumlu DNase RNase ari filtreli steril pipet uçları,
- ☐ Elektroforez tankı ve güç kaynağı
- ☐ Buz kutuları (ice box)
- ☐ Kuru ısıtma blokları
- ☐ Soğutmalı santrifüj
- ☐ Vorteks
- ☐ UV transilluminator veya bilgisayar bağlantılı biyogörüntüleme sistemleri
- ☐ RNA ekstraksiyon kitleri (spin kolon teknolojisi kullanan)
- ☐ RT-PCR kitleri

7.3 Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

RNA İzolasyonu

IBDV RNA'sı bazı firmalardan elde edilebilen ticari kitler (spin kolon teknolojisi, guanidinium thiocyanate içeren hazır solüsyonlar) kullanılarak infekte dokulardan ekstrakte edilebilir.

Alternatif olarak, 700 µl virüs süspansiyonlarına (bursal doku homojenatları) %1 (ağırlık/hacim final konsantrasyonu)'lik sodyum dodesil sülfat ve 1mg/ml proteinaz K ilave edilerek IBDV RNA'sı ekstrakte edilebilir. 37°C'de 60 dk. beklenir. Daha sonra standart bir fenol/kloroform ekstraksiyon

protokolü (fenol toksik olduğundan dikkatli çalışılmalı ve uzaklaştırılmalıdır) kullanılarak nükleik asitler elde edilebilir. Nükleik asit final sıvı fazdan etanol presipitasyonu ile toplanır ve RNase-ari distile su içerisinde yeniden süspanse edilir. Suda dilue edilen RNA -20°C'den daha düşük bir sıcaklıkta kullanılabilece kadar saklanmalıdır.

RT-PCR Testi

Primerler

IBDV'nin dış kapsid proteini olan VP2'yi kodlayan genin orta 1/3'lük kısmının amplifikasyonunda kullanılan primerler aşağıda gösterilmiştir.

□ (Segment A'da VP2 genine spesifik olan) U3 ve L3 IBDV-spesifik PCR primerlerinin nükleotid dizileri:

Upper U3: 5'-**TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT**-GCA-TGC-GGT-ATG-TGA-GGC-TTG-GTG-AC-3'

Lower L3: 5'-**CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-GAA-TTC-GAT-CCT-GTT-GCC-ACT-CTT-TC**-3'

□ (Segment B'de VP1 genine spesifik olan) +226 ve -793 IBDV-spesifik PCR primerlerinin nükleotid dizileri:

Upper +290: 5'-**TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT**-GAA-TTC-AGA-TTC-TGC-AGC-CAC-GGT-CTC-T-3'

Lower -861: 5'-**CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-CTG-CAG-TTG-ATG-ACT-TGA-GGT-TGA-TTT-TG**-3'

U3 ve L3 primerleri 44 nükleotid uzunlukta iken, +290 ve -861 primerleri 46 ve 47 nükleotid uzunlukta.

Bu 4 primerin tamamı IBDV-spesifik 3' ucuna sahip (yukarıda italik gösterilen diziler) olup, U3 ve L3 primerleri sırasıyla IBDV A segmentinin 657-676 ve 1193-1212 nükleotid pozisyonlarına karşılık gelirken (Aksesyon No. X84034 P2 suşunun A segmenti); +290 ve -861 primerlerinin IBDV B segmentinin 290-311. nükleotid pozisyonları ve 861-883. nükleotid pozisyonlarına karşılık gelmektedir (Aksesyon No. D6948 suşunun B segmenti).

IBDV-spesifik ucu upper ve lower primerlerinin M13 ve RM13 universal primerlerine denk gelen non-IBDV 5' ucu (dizide kalın puntolu kısım)'na bağlanmaktadır. M13 ve RM13 universal primerleri DNA dizileme reaksiyonlarında primerler olarak kullanılmaktadır.

U3/L3 ve +290/-861 primer çiftleri ile amplifikasyon sonucunda elde edilen saflaştırılmış PCR ürünleri her iki yönde kolaylıkla dizilenebilmektedir.

U3/L3 primer çifti 604 bp'lik ürün meydana getirirken, bunun 516 bp'lik kısmı çoğaltılan IBDV dizisine spesifik olup, VP2 proteininin çok değişken (hipervariable) bölgesini kodlayan bölgeyi kapsamaktadır.

+290/-861 primer çifti ise 642 bp'lik ürün meydana getirmekte, bunun 549 bp'lik kısmı çoğaltılan IBDV dizisine spesifiktir.

Her iki ürün de filogenetik analize uygun genomik bölgelerden elde edilmiştir

Reverz Transkripsiyon (RT)

Ticari olarak farklı reverz transkriptaz enzimleri ve RT-PCR kitleri bulunmaktadır. RT reaksiyon karışımının hazırlanmasında üreticinin direktiflerine uyulması yeterlidir. Reverz transkripsiyon için reverse primer (antisense/lower primer) kullanılmalıdır. Alternatif olarak cDNA sentezini başlatmak için random primerler (heksanukleotidler) de kullanılabilir.

RT reaksiyon karışımına transfer edilmeden önce IBDV RNA matriksinin denature edilmesi gerekmektedir. Hacim olarak bir birim moleküler biyoloji derecesinde dimetilsülfoksidin (DMSO) 4 birim çözdürülmüş IBDV RNA'sına eklenmesi gerekmektedir. Bu karışım 92°C'de 3 dk. ısıtılır ve buz üzerinde hızla dondurulur. Gerekli hacimdeki denature matriks reaksiyon karışımına ilave edilir. Enzim üreticinin önerileri doğrultusunda sonraki işlemler (inkubasyon süre ve sıcaklıkları) gerçekleştirilir.

RT aşamasından sonra elde edilen cDNA solüsyonu -20°C'nin altında (Örn.-70°C) bir sıcaklıkta dondurulmuş olarak saklanmalıdır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR için uygun olan farklı çeşitte DNA polimeraz enzimleri ve PCR kitleri ticari olarak bulunmaktadır. PCR reaksiyon karışımının hazırlanması üretici önerilerine göre gerçekleştirilmektedir. Örneğin, U3/L3 ve +290/-861 PCR primer çiftleri, sırasıyla, serotip 1 IBDV suşlarının A segmentindeki VP2 geninin orta 1/3'lük kısmının ve segment B'nin 5' ucundaki bir bölgenin amplifikasyonunda başarılı olup önerilmektedir.

PCR amplifikasyonuna ilk olarak ön denatürasyon adımı ile başlanır. Bunu 35 sikluskuk her biri bir denaturasyon, bir primer bağlanma ve bir de uzama aşamalarını içeren amplifikasyon protokolü takip eder. Denaturasyon 95°C'de 30 sn., primer bağlanması 64°C'de 45 sn. (bu aşama hem U3/L3 ve hem de +290/-861 primer çiftleri için ortaktır. Uzama adımının parametreleri kullanılan kit protokol önerilerine göre düzenlenmelidir.

Her bir cDNA örneği için karışımlarda olası PCR inhibitörlerine bağlı yanlış negatif sonuçların elimine edilmesi için 3 PCR reaksiyonu (direkt, 10 ve 100 katlı sulandırılmış olmak üzere) gerçekleştirilmelidir.

Her bir PCR negatif ve pozitif kontrol reaksiyonları içermelidir.

Elektroforez

Bu aşama diğer tüm aşamalardan ayrı bir oda veya bölmede yapılır.

Agaroz jel, 0,5xTBE buffer içinde %1,50 agaroz eritilerek hazırlanır. Erimiş jele final konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür ilave edilir ve kalıba dökülür. Jel, donmasını takiben running buffer olarak 0,5xTBE buffer içeren elektroforez tankına yerleştirilir. PCR ürünleri (10 µl), 6x loading buffer (2 µl) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenir. Ayrıca uygun moleküler marker (100bp) da yüklenir. Elektrotlar arası mesafeye göre her bir cm'ye 5-10 V hesabıyla doğru akım uygulanır.

Elektroforezi takiben jel UV transillüminatör altında veya bir jel görüntüleme sisteminde gözlenir. Ethidium bromid'in toksik ve karsinogenik olduğu ve dikkatli çalışılıp uzaklaştırılması gerektiği unutulmamalıdır.

7.4 Sonuçların Değerlendirilmesi

U3/L3 primer çiftinin kullanıldığı PCR **604 bp**'lik ürün meydana getirirken, bunun 516 bp'lik kısmı çoğaltılan IBDV dizisine spesifik olup, VP2 proteininin çok değişken (hipervariable) bölgesini kodlayan bölgeyi kapsamaktadır.

+290/-861 primer çifti ise **642 bp**'lik ürün meydana getirmekte, bunun 549 bp'lik kısmı çoğaltılan IBDV dizisine spesifiktir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008), Infectious Bursal Disease (Gumboro disease), Bölüm 2.3.12.
- ☐ Laboratory Biosafety Manual - Third Edition (<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>)
- ☐ Eterradossi N, Arnauld C, Tekai F, Toquin D, Le Coq H, Rivallan G, Guittet M, Domenech J, Van Den Berg TP, Skinner MA (1999). Antigenic and genetic relationships between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate. Avian Pathol, 28, 36-46.
- ☐ Eterradossi N, Arnauld C, Toquin D, Rivallan G (1998). Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. Arch Virol, 143, 1627-1636.
- ☐ Le Nouen C, Rivallan G, Toquin D, Darlu P, Morin Y, Beven V, De Boisseson C, Cazaban C, Gardin Y, Eterradossi N (2006). Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment B-reassorted isolate. J Gen Virol, 87, 209-216.
- ☐ Le Nouen, Rivallan G, Toquin D, Eterradossi N (2005). Significance of the genetic relationships deduced from partial nucleotide sequencing of infectious bursal disease virus genome segments A or B. Arch Virol, 150, 313-325.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

INFECTIOUS BURSAL DISEASE (IBD, İNFEKSİYÖZ BURSAL HASTALIK, GUMBORO)'İN AGAR JEL İMMUNODİFÜZYON (AGID) TESTİ İLE TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Kanatlılarda, İnfeksiyöz Bursal Hastalık Virüsü (IBDV)'na karşı serumdaki spesifik antikorların ya da bursal dokulardaki viral antijen veya antikorların saptanmasında kullanılan Agar Jel İmmunodifüzyon testinin standart bir şekilde yapılmasını sağlamaktır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu, IBD şüpheli tavuk serumlarında IBDV'lere karşı oluşan antikorların ve/veya şüpheli tavuk bursa Fabricius'larında IBDV antijen ve antikorlarının tespitini Agar Jel İmmunodifüzyon testi ile yapan tüm Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarları'nda geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların infeksiyonuna yol açma riski nedeni ile infeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual", esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

IBD: İnfeksiyöz Bursal Hastalık (IBD), 3-6 haftalık genç yaştaki tavuklarda ölümler ve immunosupresyon ile karakterize bulaşıcı bir viral hastalıktır.

IBDV: İnfeksiyöz Bursal Hastalık Virüsü

AGP (AGID): Agar Jel İmmünodifüzyon.

SPF (Spesific Pathogen Free) Sürü: Önemli kanatlı hastalıklarının etkenlerini ve bu etkenlere karşı oluşmuş antikorları taşımayan sürü.

PBS: Phosphate Buffered Saline

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Agar Jel Presipitasyon testi, antijen ve antikor moleküllerinin birbirine doğru yayılabildiği jel gibi yarı katı ortamlarda yapılır. Böyle bir ortamda birbirine doğru yayılan antijen ve antikor optimal oranda bulundukları bölgelerde karşılaştıklarında antijen-antikor kompleksi oluşturarak presipitasyon bandı halinde jel içerisinde görünür hal alır.

AGID Test Metodu temel olarak iki şekilde kullanılır;

Kan serumunda viral etkenlere karşı oluşan presipitan antikorların varlığını tespit etmek ya da yapılan aşılamalara karşı oluşmuş immun yanıtın seviyesini belirlemek amacıyla kan serumlarının bilinen standart antijenlerle test edilmesi.

Virolojik teşhis metodu olarak, hasta ve/veya hastalıktan şüpheli hayvanlardan alınan bursa Fabricius ve/veya diğer doku örneklerinden elde edilen homojenat ile bilinen standart pozitif antiserumlar ile test edilmesi.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Hastalıkta serolojik tanı amacıyla, kan numuneleri mümkün olduğunca erken alınmalı ve ilk örnekleme takiben 3 hafta sonra da ikinci serum örnekleri alınmalıdır. Virüs hızla yayıldığından sürüyü temsilen az sayıdaki örneğin (20-24 örnek) alınması yeterlidir.

Bursa Fabricius'taki antijenin saptanması için hastalığın akut dönemindeki yaklaşık 10 tavuktan bursalar aseptik olarak çıkartılmalıdır.

Test amacıyla alınan materyalin en kısa sürede soğuk zincirde laboratuvara gönderilmesi gerekmektedir.

Standart Antijen

Standart pozitif ve negatif kontrol serumları

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Değişik ölçülerde petriler,
- ☐ Otomatik pipet ve pipet uçları,
- ☐ Vidalı kapaklı şişeler,
- ☐ Şablon, boru şeklinde kesici, ince uçlu kürdan

7.3. Agar Jel İmmunodifüzyon (AGID) Test Metodu

Agarın Hazırlanması

Bir litre distile su içerisinde 80 g sodyum klorür ve 5 g fenol (fenol toksik olduğu için dikkatli bir şekilde kullanılmalı ve uzaklaştırılmalıdır). Bu karışıma 12.5 g agar (Noble Agar) eklenir ve agar

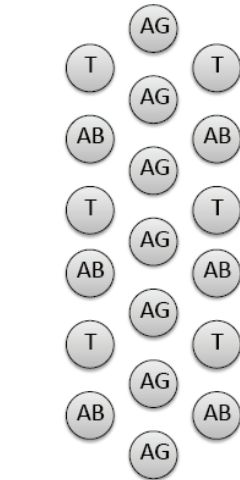
çözülene kadar ısıtılır. Fenolün neden olabileceği sağlık ve çevresel hasarın önlenmesi için başka bir agar hazırlama yöntemi şu şekildedir:

Sodyum klorür (80 g), kalsiyum dihidrojenfosfat (0.45 g), sodyum hidrojenfosfat dihidrat (1.19 g), agar (10 g) tartılarak distile su ile 1 litrelik final hacime tamamlanır (20-25°C'de pH 7.1 olmalıdır). Bu solüsyon karıştırılarak sıcaklığı 90°C'ye çıkartılır. Karışım halen çok sıcakken selüloz filtreden geçirilir ve 20ml'lik cam şişelere paylaştırılır. Fenol içermeyen agar 115°C'de 15 dk. otoklavlanabilir. Şişeler 4°C'de kullanılabileceği kadar saklanır.

Testin Uygulanması

Pleytler kullanılmadan 24 saat ila 7 gün öncesinden hazırlanmalıdır. Agarlar sıcak su banyosunda veya Koch cihazında ısıtılmak suretiyle çözündürülür. Şişelere su girmesi önlenmelidir. Her bir şişe içeriği düz bir zemin üzerine yerleştirilmiş 9 cm'lik plastik petri kaplarına dökülür. Petri kaplarının kapakları kapatılarak agarın donması beklenir, daha sonra petriler 4°C'ye kaldırılır. Dökülmüş petriler 4°C'de 7 gün saklanabilmektedir. Eğer petriler döküldükleri gün kullanılacaklarsa bunlar 37°C'de kapakları üzerinde ters çevrilerek 30 dk.-1saat boyunca kurutulmalıdır. Bir şablon ve bir tubuler kesici kullanılarak birbirinden 3 mm uzaklıkta ve 6 mm çapında 3 vertikal sıra halinde kuyular/gözlere hazırlanır. Gözlerden kesilen agarlar aspirasyon ya da bir kalem kullanılarak gözlere zarar vermeyecek bir şekilde uzaklaştırılmalıdır. Bir pipet yardımıyla 50µl test serumu Şekil 1'de gösterilen şekilde kuyucuklara eklenir.

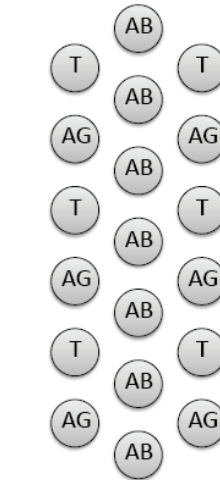
AB = Pozitif Antiserum



T = Test serumu

Şekil 1. Antikorların test edilmesine yönelik protokol

AG = Pozitif Antijen



T = Test dokuları

Şekil 2. Antijenlerin test edilmesine yönelik protokol

Notlar:

Yukarıdaki test düzeni dışında altıgen test düzeni de kullanılabilir. Bu test düzeninde doku homojenatlarında IBDV antijeni aranırken ortaya pozitif kontrol serum çevredeki gözlere pozitif kontrol antijeni ve test örnekleri, serum örneklerinde IBDV antikorları aranırken ise ortaya pozitif

kontrol antijeni çevredeki gözlere ise pozitif kontrol antiserumu ve test serumları eklenir.

Gözlerin derinliği 3mm, çapı 6mm birbirine uzaklığı ise 6mm olmalıdır.

Ya da bursadaki antijenlerin saptanması için,

- ☐ Küçük bursa parçaları ince kıvrık uçlu pens yardımıyla Şekil 2’de gösterilen şekilde gözlere eklenir. Alternatif olarak, parçalanmış dokuların dondurulup çözündürülmesiyle elde edilen eksudat ile gözler doldurulabilir.
- ☐ Pozitif ve negatif antijenler 50 µl’lik hacimlerde ilişkili gözlere ilave edilir.
- ☐ Petri pleytler nemli atmosferde 22-37°C’lerde agarların kuruması engellenerek 48 saat inkübe edilir.
- ☐ 24-48 saat sonra pleytler koyu zemin üzerinde bir oblik ışık kaynağında incelenir.

Eğer altıgen test düzeni uygulanacak ise;

- ☐ **Şüpheli serumlar test edilecekse;** Ortaya standart antijen, etraftaki çukurlara şüpheli serumlar ve uygun çukurlara standart pozitif ve negatif kontrol serumları konulur.
- ☐ **Şüpheli materyal test edilecekse;** Ortaya standart pozitif serum, etraftaki çukurlara ise IBVDV şüpheli hayvanlara ait bursal dokulardan hazırlanan inokulum ve uygun çukurlara standart pozitif ve negatif kontrol serumları konulur.
- ☐ Tüm bu çalışmalar kayıt edilir.
- ☐ Petriler 22°C-37°C arasında, rutubetli bir ortamda 24–48 saat süre ile inkübe edilir,
- ☐ Presipitin bantları yaklaşık 24–48 saat sonra görülebilir hale gelirler. Ancak bu süre, antikor ve antijenin konsantrasyonlarına bağlı olarak değişebilir.
- ☐ Oluşan presipitin bantlarının değerlendirilmesi en iyi şekilde, arkadan ışık verilip koyu bir zemine karşı gözlenerek yapılır.

7.4. Sonuçlarının Değerlendirilmesi

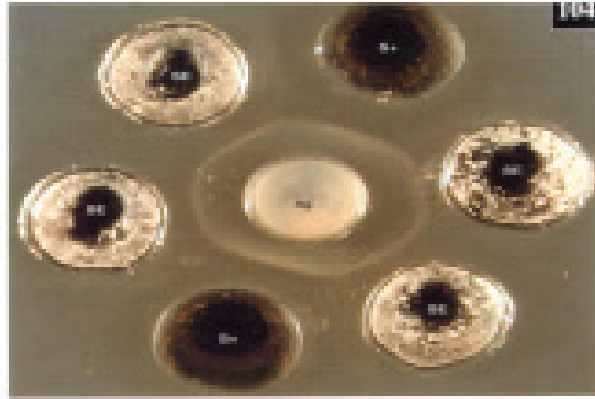
- ☐ Standart antijen/pozitif kontrol serumu ile arasında presipitin bantı oluşan çukurlardaki şüpheli serum/materyal = **Pozitif**,
- ☐ Standart antijen/pozitif kontrol serumu ile arasında presipitin bantı oluşmamış olan çukurlardaki şüpheli serum /materyal = **Negatif** olarak ifade edilir.

Aşağıdaki kriterler karşılandığında test geçerli olur:

- ☐ Petride uygun çukurlara konulmuş olan standart pozitif serum ile standart antijen arasında oluşan presipitin bantlarının varlığı,
- ☐ Negatif kontrol serum ile standart antijen arasında presipitin bandının oluşmamasına göre değerlendirilir.



Şekil 1. Ortadaki çukurdaki standart antijen ile arasında presipitin bantı oluşan kenarlardaki çukurlardaki şüpheli serumlar **Pozitif** olarak değerlendirilir.



Şekil 2. Ortadaki çukurdaki Standart pozitif serum ile arasında presipitin bantı oluşan kenarlardaki çukurlardaki şüpheli materyal **Pozitif** olarak değerlendirilir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008), Infectious Bursal Disease (Gumboro disease), Bölüm 2.3.12.
- ☐ Laboratory Biosafety Manual - Third Edition (<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>)

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

TAVUKLARDA INFECTIOUS BURSAL DISEASE (IBD, İNFEKSİYÖZ BURSAL HASTALIK)'NİN ELISA TESTİ İLE SEROLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Tavuklarda Infectious Bursal Disease (İnfeksiyöz Bursal Hastalık, IBD)'in serolojik teşhisi ve IBD antikorlarının miktarının belirlenmesinde ELISA testinin standart bir şekilde yapılmasını sağlamaktır. Bu test aynı zamanda IBD'ye karşı optimal aşı gününün belirlenmesinde de kullanılmaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Açıklanan yöntem, tavukların kan serumlarında IBD antikorlarının miktarının ELISA ile saptanmasında kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların infeksiyonuna yol açma riski nedeni ile infeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

ELISA ile ilgili uyarı/önlemler/dikkat edilecek hususlar:

- ☐ Kit ve bütün reagentler 2-8°C'de muhafaza edilmelidir.
- ☐ Son kullanma tarihi geçmiş kitler ve ilgili reagentler kullanılmamalıdır.
- ☐ Farklı serilerdeki kitlerin malzemeleri ve reagentleri karıştırılarak kullanılmamalıdır.
- ☐ Her örnek için ayrı pipet ucu kullanılmalıdır.
- ☐ Substrat solusyonu oksidan ajanlarla ve kuvvetli ışığa maruz bırakılmamalıdır.
- ☐ Ağızla pipetleme yapılmamalıdır.

Test sırasında çıkan atıklar toksik madde içerebildiğinden bunlar ayrı bir yerde toplanarak Atık İmha Prosedürüne göre imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

IBD: İnfeksiyöz Bursal Hastalık (Gumboro Hastalığı, IBD), 3-6 haftalık yaştaki tavuklarda ölümler ve immunosupresyon ile karakterize bulaşıcı bir viral hastalıktır.

IBDV: İnfeksiyöz Bursal Hastalık Virusu

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

IgG: Immunglobulin G

pNPP: p-Nitrophenyl fosfat

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

IBD şüpheli tavuklardan örneklenen kan serumlarında bu etkene karşı oluşan antikorları tespit etmeye yönelik bir indirekt ELISA test yöntemidir. Bu yöntemle hastalığın serolojik tanısı yapılabildiği gibi antikor düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesi ve büyük sürülerin bağışıklık durumunun izlenmesi de mümkündür. ELISA, katı bir faza bağlı olarak Antijen-Antikor (Ag-Ab) kompleksinin oluşabilmesi ve enzim ile işaretlenmiş konjugey olarak isimlendirilen ikinci ajan ve uygun bir substrat ile reaksiyon sonucunda renkli son ürün şeklinde Ag-Ab kompleksinin varlığın saptanması için uygulanan test metottur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal: Tavuklarda IBD'nin serolojik teşhisi, IBD antikorlarının miktar ve homojenitesinin belirlenmesi ve/veya optimal aşı günü tayini için uygulanan ELISA testinde tüm sürüyü temsilen 20-24 (optimal numune sayısı 23 olarak belirlenmiştir) hayvandan kan serumları örneklenerek bunlar laboratuvara soğuk zincirde gönderilir. Hastalık teşhisi söz konusu olduğunda infeksiyon sürüde hızla yayıldığı için sürüyü temsilen az sayıdaki örnekleme bile yeterli olmaktadır. Hemolizli kontamine vb serumlar test için kullanılmaz. Serumlar hemen test edilmeyecekse +4°C'de 3 gün süreyle -20°C'de yıllarca saklanabilir.

7.2. Kullanılan ekipman:

- ☐ Ticari ELISA kitleri (IBD kaplı plateler, konjugat, substrat, substrat tamponu, stop solüsyonu, örnek sulandırma sıvısı, yıkama tamponu, negatif ve pozitif kontroller)
- ☐ 8 ya da 12 kanallı otomatik pipet
- ☐ Otomatik pipetler (1-10 µl/10-100 µl, 100-1000 µl)
- ☐ Numune dilusyonları için plastik ependorf tüpler (1.5-2 ml)
- ☐ Distile ya da deiyonize su
- ☐ 405 nm filtreli mikrotitre plate okuyucu
- ☐ Mikro titre plate yıkayıcı
- ☐ Bilgisayar

- ☐ Sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan bilgisayar yazılımı

7.3. Kullanılan kimyasallar:

ELISA testi yapılırken kullanılacak kit bileşenleri kimyasal ve biyolojik maddelerden oluşur. Bunların bir kısmı kit içerisinde kullanıma hazır halde bulunmaktadır, diğer bir kısmı ise kullanımdan önce hazırlanması gerekir. Kullanımdan önce hazırlanması gereken reagentlerin dilusyonları kit protokolüne uygun olarak hazırlanır. Hazırlanan reagentler kitte belirtilen süre ve sıcaklıkta saklanır.

Reagentlar kullanılmadan önce ısıları oda sıcaklığına (18-25°C) ulaşmaya kadar beklenmelidir. Test için uygun oda sıcaklığı ELISA Kitleri arasında farklılık gösterebilir.

7.4. Testin Uygulanması

- ☐ Her bir test numunesini (serumları) sulandırma sıvısı kit protokolünde belirtilen oranda sulandırılır.
- ☐ IBD virus antijenleri ile kaplanmış olan plateleri poşetlerinden çıkarılır ve her bir numunenin nereye eklendiğini kaydedilir.
- ☐ Plateteki A1 ve B1 gözlerine kit protokolünde belirtilen hacimde negatif kontrol eklenir.
- ☐ Plateteki C1 ve D1 gözlerine kit protokolünde belirtilen hacimde negatif kontrol eklenir.
- ☐ Bazı kitlerde bulunan referans kontrol serumu gözlerine kitin protokolüne uygun hacimde konur
- ☐ Sulandırılmış test edilecek serum örneklerinden gözlerine kitin protokolüne uygun hacimde konur.
- ☐ Üzeri kapatılmış olan pleyt kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürede inkübe edilir.
- ☐ Süre sonunda içerik dökülür ve ELISA pleytinin her bir gözü test protokolünde önerilen konsantrasyonda hazırlanmış olan yıkama solüsyonu ile 3-5 kez yıkanır.
- ☐ Son yıkamadan sonra pleyt ters çevirilip kurutma kâğıdına vurularak kalan solüsyonun iyice emdirilmesi sağlanır.
- ☐ Belirtilen hacimde Konjugey Solüsyonu tüm gözlere ilave edilir.
- ☐ Üzeri kapatılmış olan pleyt kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürede inkübe edilir.
- ☐ Yıkama prosedürü 5. ve 6. basamakta anlatıldığı gibi tekrarlanır.
- ☐ Her göze protokole uygun miktarda Substrat Solüsyonu konur ve kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürede inkübe edilir
- ☐ Reaksiyonu durdurmak için her göze belirtilen hacimde Stop Solüsyonu ilave edilir.
- ☐ Test sonuçları bir ELISA okuyucuda kit protokülünde önerilen dalga boyunda okunur.

ELISA'da test edilen örnekler, pozitif, negatif ve referans kontrol gözleri için okunan OD değerleri ile kit protokolünde ve kitin kalite kontrol sertifikasında verilen OD değerleri karşılaştırılır, geçerli sınırlar içerisinde ise test edilen örnekler pozitif ve negatif şeklinde ifade edilerek kalitatif ve/veya kantitatif olarak değerlendirilir. Değerlendirmede kite ait hazır bilgisayar programları da kullanılabilir.

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

ELISA'da testte kullanılan pozitif, negatif ve varsa referans kontrollerin beklenen standart seviyelerde çıkması halinde test geçerli olarak kabul edilir. Referans serum yok ise laboratuvarın kendisine ait standart pozitif kontrol ve negatif kontrollerin beklenen değerler içinde olup olmadığı kontrol edilir. Kit protokolünde ve kitin kalite kontrol sertifikasında verilen OD değerleri ile ölçülen OD değerleri karşılaştırılarak testin geçerliliği kontrol edilir.

Değerlendirme sonuçları kaydedilir.

Aşılı ya da aşılanmamış sürüler için her laboratuvar kendi kriterlerini uygulamalıdır.

Genel olarak sürünün izlenmesi ve S/P oranlarının hesaplanması için IBD kitleri ile kullanılabilecek uygun bilgisayar yazılım programı kitleri üreten firmalardan elde edilebilmektedir. Bu programlarla elde edilen sonuçlar aynı zamanda optimal aşı günü tayini için de kullanılabilmektedir. Ayrıca, optimal aşı günü tayinine yönelik bilgisayar yazılımları da bulunmaktadır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008), Infectious Bursal Disease (Gumboro disease), Bölüm 2.3.12.
- ☐ Laboratory Biosafety Manual - Third Edition. (<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>)
- ☐ Idexx, Biocheck veya Synbiotics gibi Türkiye'de kullanım için izin veya ruhsat almış ELISA kitlere ait kit kullanım kılavuzu.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

TAVUK EMBRİYO PRİMER HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE ŞÜPHELİ MATERYALDEN MAREK'S DISEASE VIRUS (MDV) İZOLASYONU

1. AMAÇ

Kanatlılarda Marek Hastalığı (MD)'nin teşhisi için Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gelen evcil veya yabani kanatlıların otopsi sonrası alınan doku ve kanat tüyü örneklerinden hazırlanan inokulum sıvılarının tavuk embriyo hücre kültürlerinde izolasyonu amacıyla yapılır.

2. UYGULAMA ALANI

Kanatlı Hastalıkları Teşhis laboratuvarına sahadan gelen kanatlı hayvanlarda MD hastalığının teşhisi veya rutin kontrolleri amacıyla yapılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual", esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

Marek Hastalığı (MD): Tavukların çeşitli organ (karaciğer, dalak, böbrek, yumurtalık, testis, pankreas, bursa fabrisius) ve dokularında (deri, kas) tümörlere neden olan bulaşıcı ve öldürücü viral bir hastalıdır.

Tavuk embriyo primer hücre kültürü (CEF): 9-11 günlük SPF yumurtalardan elde edilen hücreleri

SPF: Spesific Pathogen Free

İnokulum: Virus izolasyon çalışmalarında kullanılmak üzere organ ve kanat tüylerinden alınan örneklerinin parçalanmasıyla hazırlanmış materyal

CPE: Sitopatik etki

6. TEST METODUN KISA TANIMI:

Virolojik teşhis metodu olarak hasta veya hastalıktan şüpheli kanatlılardan alınan materyallerden viral etken izolasyonu için hazırlanan süpernatantın tavuk embriyo primer hücre kültürüne inokule edilmesidir.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal ve viral taşıma vasatı

Ölü Kanatlılardan karaciğer, dalak,böbrek,bursa fabrisius alınır. Bu örnekler Viral Transport Medium (İzotonik PBS, pH 7,0-7,4 hazırlanıp içersine koruyucu olarak %10 glycerol, antibiyotik (penicillin 10.000 U/ml, streptomcin 10 mg/ml ve gentamycin 250 µg/ml) ve Mycostatin 1000 ünite/ml katılır.) içinde laboratuara soğuk zincir içinde gönderilir. Canlı kanatlılardan alınan kanat tüyleri ve heparinli kandan elde edilen lökositler kullanılır.

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Otopsi malzemesi (makas, dişli pens, otopsi masası, marazi madde kapları vb.)
- ☐ Steril Havan ve tokmağı
- ☐ Steril Kum
- ☐ Santrifüj tüpü (10 ml lik)
- ☐ Santrifüj
- ☐ Minisart 0.2µm'lik filtre. Steril enjektör (5 cc'lik veya 10 cc'lik)
- ☐ Yumurta kontrol kutusu
- ☐ Steril delici
- ☐ Steril enjektör (1 veya 2 cc. lik, 0.1 cc. taksimatlı)
- ☐ 15 ml'lik steril tüpler ve tüp spor
- ☐ Silinmeyen özellikte kalem,
- ☐ Laminar flow cabinet
- ☐ Etüv
- ☐ Buzdolabı
- ☐ Steril eğri uçlu küçük makas
- ☐ Tek dişli küçük pens
- ☐ Otomatik pipeti
- ☐ Tek kullanımlık steril pastör pipeti
- ☐ CO₂ etüv
- ☐ İnvert mikroskop
- ☐ Flask

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ Fosfat Buffer Saline
- ☐ Viral Transport Medium
- ☐ Penicilinle-Streptomycine stok solüsyonun (500x)
- ☐ Gentamycin
- ☐ Mycostatin
- ☐ DMEM F12 Ham vasat
- ☐ Fötal dana serum
- ☐ %70'lik Ethanol / Tentürdiyot
- ☐ Dezenfektan

7.4. Metot

Dokulara Uygulanacak İşlemler

- ☐ Organ parçaları (ortalama 1 gr) steril havan konur.
- ☐ Çok az miktarda steril kum üzerine dökülür ve steril havanda ile ezilir.
- ☐ Organlar yeteri kadar homojenize edildikten sonra antibiyotik solüsyonu [Penisilin (2000 ünit/ml)-Streptomycin (2mg/ml), Gentamycin (50µg/ml) ve Mycostatin (1000 ünit/ml)] içeren 10 ml vasata eklenir ve yeniden homojenize edilir.
- ☐ Organ homojenizenizasyonu steril 10 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılır ve 2500 rpm' de 10 dakika santrifüj edilir.
- ☐ Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant tavuk embriyo primer hücre kültürü inokülasyonu için steril tüpe alınır ve saklanır.
- ☐ 1-2 saat oda sıcaklığında beklemeye bırakılır. Eğer bu mümkün değilse birkaç gün +4°C'de saklanabilir.
- ☐ Bakteriyal kontaminasyona karşı inokülasyondan önce 0.2µm'lik filtrelerden geçirilir.

Heparinli Kanda Uygulanacak İşlemler

Kan örnekleri EDTA içeren antikuagulanlı 10 ml'lik tüplere alınacak ve 2000 rpm' de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek lökositler ayrılacak ve 3 defa PBS ile yıkanmalarının ardından 1 ml PBS ile sulandırılarak hazırlanacaktır.

Tavuk embriyo primer hücre kültürünün hazırlanması

- ☐ 3 tane 9-11 günlük yumurtalar, yumurta kontrol kutusu ile karanlık bir ortamda fertilite muayenesine tabi tutulup, fertil olanlarda embriyonun yeri ve yumurtanın hava boşluğu kurşun kalem ile çizilir. .
- ☐ Steril kabin içerisinde, yumurtaların üst kısımları %70'lik etanol ya da seyreltilmiş tentürdiyot ile pamuk yardımıyla silinerek dezenfekte edilir.

- ☐ Hava kesesini belirleyen çizginin 1–2 mm makas yardımı ile kesilerek yumurta kabuğu kaldırılır.
- ☐ Embriyolar steril petri kutularına alınarak, baş, ayak ve kanat kısımları steril makasla kesilerek uzaklaştırılır.
- ☐ Geriye kalan kısımlar makasla küçük parçalara ayrılır. Daha sonra içerisinde 20 ml PBS bulunan tüplere aktararak yıkanır. Bu işlem 3 defa tekrar edilir. Üst kısım atılır.
- ☐ Yıkamış doku parçaları steril bir kaşık yardımı ile içerisinde manyetik çubuk bulunan erlanmayerlere aktarılır.
- ☐ Üzerine 37°C'de ısıtılmış % 0.05 tripsin içeren 20 ml versen solüsyonu ilave edilerek oda derecesinde 30 dk. veya tercihen 37°C'de 15 dakika bir manyetik döndürücü üzerinde ön tripsinizasyona bırakılır.
- ☐ Bu işlem 3 veya 4 defa tekrar edilir.
- ☐ Her etabın sonunda hücre süspansiyonları steril tülbentten süzülme suretiyle alınarak bir şişede toplanır ve şişeye eşit miktarda % 10 dana serumlu DMEM F-12 Ham besiyeri konur.
- ☐ Toplanan hücre süspansiyonu steril çift katlı tülbentlerden santrifüj tüpüne süzülür.
- ☐ 1500 rpm'de 5 dk. santrifüj edilir.
- ☐ Santrifüj sonrası üstteki sıvı dökülür, dipte kalan hücreler %10 dana serumlu DMEM F-12 Ham besiyeri konur.
- ☐ 200 µl hücre süspansiyonu 200 µl %0.4 trypanblue ile boyandıktan sonra haemocytometer ile hücre sayımı yapılarak her ml'de 300-500.000 hücre bulunacak şekilde sulandırılır.
- ☐ Sulandırılan hücre süspansiyonu 25 cm'lik flasklara alınarak 10 ml %10 dana serumlu DMEM F-12 Ham ilave edilerek etüve (37°C) konur.

Doku, lökosit ve kanat tüylerinden hazırlanan inokulumun ekilmesi

Hücreler monolayer olunca serumsuz vasatla yüzeyleri yıkanır ve 0,2 ml süpheli inokulum hücreye ilave edilir. Üzerine 10 ml %10 dana serumlu DMEM F-12 konur. Aynı işlem kontrol olarak kullanılacak hücrede de yapılır ve 37°C'deki etüve konulur. 24 saat aralıklar ile CEF mikroskop altında CPE görülünceye kadar kontrol edilir

CEF Toplanması Uygulanacak İşlemler

- ☐ 24 saat aralıklar ile CEF mikroskop altında CPE görülünceye kadar kontrol edilir. 2 gün aralıkla vasatı değiştirilir. 3-5 gün arasında CPE görüldüğü zaman flasklar -30°C' de dondurulur. 2 defa dondurulup çözülür. 5000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilir.
- ☐ Dezenfekte edilmiş steril kabin içerisinde, santrifüj sonrası üst sıvı 3 ml'lik cryo viallere alınarak -80°C'de saklanır.

7.5. Sonuçların değerlendirilmesi:

- ☐ İnokulasyon yapılan CEF 24 saat aralıklar ile mikroskop altında 3-5 gün içerisinde CPE görülünceye kadar kontrol edilir. CPE görülmediği zaman en fazla 7-10 gün içinde değerlendirilir. Hücre kontrol olarak kullanılan flaskta CPE'nin görülmemesi, inokule edilen hücrede CPE'nin görülmesi gerekmektedir.
- ☐ AGID ile tespit edilemeyen materyal inokulumların, negatif olarak raporlanmadan önce en az 2 kez daha CEF'de pasaj yapılması gereklidir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER:

- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2010), Marek's Disease, Bölüm 2.3.13.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLILARDA MAREK HASTALIĞI (MAREK'S DISEASE)'NIN PCR İLE TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Kanatlılarda, Marek Hastalığı (MD) şüpheli hayvanlardan elde edilen organ homejenatları, kan ve marek şüpheli etkenle infekte primer hücre kültürü üst sıvısından PCR ile Marek Hastalığı virusunun (MDV) tespit edilmesidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu, tüm Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarları'nda geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual", esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

Marek: Tavukların çeşitli organ (karaciğer, dalak, böbrek, yumurtalık, testis, pankreas, bursa fabrisius) ve dokularında (deri, kas) tümörlere neden olan bulaşıcı ve öldürücü viral bir hastalıdır.

MDV: Marek's Disease Virus

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

6. TEST METODUN KISA TANIMI:

Kanatlı iç organ homejenatları, kan, Marek şüpheli etkenle infekte primer hücre kültürü üst sıvısı ve standart Marek antijeninden DNA ekstraksiyonun yapılması, Marek spesifik primerler kullanılarak PCR yapılması ve PCR ürünlerinin agar jel elektroforeziste yürütülmesinden sonra ürün boyutunun bp olarak tespit edilmesidir.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

- ☐ Marek şüpheli primer hücre kültürü süpernatantı
- ☐ Orhan homejenatı
- ☐ Kan
- ☐ Standart Marek Antijen

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Santrifüj
- ☐ Otomatik pipet ve pipet uçları
- ☐ 1.5 ml DNaz RNaz ependorf tüp
- ☐ 0.2 ml ependorf tüp
- ☐ PCR cihazı
- ☐ Elektroforez tankı
- ☐ Güç kaynağı
- ☐ Görüntüleme cihazı
- ☐ Laminar flow
- ☐ Su banyosu
- ☐ DNA ekstraksiyon kiti
- ☐ Vortek

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ Taq DNA Polymerase
- ☐ DNase RNase free distile su
- ☐ Primerler

MDV(Beck)-F 5'-TACTTCCTATATAGATTGAGACGT-3'

MDV(Beck)-R 5'-GAGATCCTCGTAAGGTGTAATATA-3'

- ☐ Hedef DNA
- ☐ Ethidium bromide
- ☐ TAE / TBE buffer
- ☐ DNA ladder
- ☐ Loading dye

7.4. Metot

DNA izolasyonu

Örneklerin hazırlanması DNA ekraksiyon kitindeki protokole göre yapılır.

PCR

Her PCR reaksiyonu 50 µl olarak hazırlanır. Pozitif kontrol olarak Marek (Charles River), negatif kontrol olarak su kullanılır.

PCR Bileşenleri

- 10xReaction buffer 5 µl
- MgCl₂ 1.5 mM
- dNTP's 200 µM of each
- Taq Polymerase enzimi 2.5 unit
- Primer 1 0.2 nmol
- Primer 2 0.2 nmol
- DNA template 0,1-1,0 µg (2 µl)

Steril DNaz RNaz distile su ile 50 µl'ye tamamlanır.

PCR basamakları

İlk denatürasyon	95°C'de 1dak.	1 siklus
Amplifikasyon	94°C'de 1dak. 55°C'de 1dak. 72°C'de 1dak.	35 siklus
Son zincir uzaması	72°C'de 5 dak	1 siklus

olarak DNA amplifiye edilir.

Elektroforez:

- %2 lik agar TAE buffer içinde hazırlanır. Mikrodalga fırında eritilir ve içersine 0.5 µg/ml Ethidium bromide eklenir. Jel kastı hazırlanır tarak yerleştirilir ve hazırlanan agar içine dökülür.
- Agar mat renk alınca jel tankı içine yerleştirilir ve jel tankı agarın üzerini örtecek şekilde TAE buffer ile doldurulur.
- PCR ürününden 10 µl alınır 1,5 µl jel loading dye ile karıştırılır ve agar üzerinde tarağın oluşturduğu deliklere doldurulur.
- İlk deliğe de DNA merdiveni yüklenir.
- Örnekler 60Vltta agarın 2/3ünü geçene kadar yürütülür

7.5. Sonuçların değerlendirilmesi

Agar UV ışığı altında incelenir. 132bp ve katları şeklindeki bantlar Marek virusunun varlığını gösterir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER:

- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2010), Marek's Disease, Bölüm 2.3.13.

9.REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

MAREK HASTALIĞI (MAREK'S DISEASE)'NIN AGAR JEL PRESPİTASYON (AGP) TESTİ İLE TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Kanatlılarda, Marek Hastalığı (MD) şüpheli kanatlılardan izole edilen viral etkenlerin identifikasyonu ve Marek virusuna karşı oluşmuş antikorların tespiti amacı ile kullanılan Agar Jel Presipitasyon testinin standart bir şekilde yapılmasını sağlamaktır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu, Marek şüpheli virus izolatlarının identifikasyonunu ve viral etkenlere karşı oluşan antikorların tespitini Agar Jel Presipitasyon testi ile yapan tüm Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarında geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

Marek: Tavukların çeşitli organ (karaciğer, dalak, böbrek, yumurtalık, testis, pankreas, bursa fabrisius) ve dokularında (deri, kas) tümörlere neden olan bulaşıcı ve öldürücü viral bir hastalıdır.

AGP (AGID): Agar Jel Presipitasyon, Agar Jel Immünodifüzyon.

Antikor (Ab): Çok hücreli hayvansal organizmaların bağışıklık sistemi tarafından; kendi organizmalarına ait olmayan organik yapılara karşı geliştirilen glikoprotein yapısındaki moleküller

Antijen (Ag): Vücuda yabancı maddeler girdiği anda bağışıklık sistemince antikor oluşturulmasına neden olan moleküllerdir.

SPF (Specific Pathogen Free) Sürü: Önemli kanatlı hastalıklarının etkenlerini ve bu etkenlere karşı oluşmuş antikorları taşımayan sürü.

PBS: Phosphate Buffered Saline

6. TEST METODUN KISA TANIMI:

Agar Jel Presipitasyon testi, antijen ve antikor moleküllerinin birbirine doğru yayılabildiği jel gibi yarı katı ortamlarda yapılır. Böyle bir ortamda birbirine doğru yayılan antijen ve antikor optimal oranda bulundukları bölgelerde karşılaştıklarında antijen-antikor kompleksi oluşturarak presipitasyon bandı halinde jel içerisinde görünür hal alır.

AGP Test Metodu temel olarak iki şekilde kullanılır;

- ☐ Kan serumunda viral etkenlere karşı oluşan presipitan antikorların varlığını tespit etmek ya da yapılan aşılamalara karşı oluşmuş immün yanıtın seviyesini belirlemek amacıyla kan serumlarının bilinen standart antijenlerle test edilmesi.
- ☐ Virolojik teşhis metodu olarak, hasta ve/veya hastalıktan şüpheli hayvanlardan alınan bursa Fabricius ve/veya diğer doku örneklerinden elde edilen homojenatın, izolasyon amacıyla uygun ortamlarda üretilmesi sonucu elde edilen materyal ile bilinen standart pozitif antiserumlar ile test edilmesi.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

- ☐ Marek şüpheli primer hücre kültürü süpernatantı
- ☐ Şüpheli serumlar
- ☐ Standart Antijen
- ☐ Standart pozitif ve negatif kontrol serumları

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Değişik ölçülerde petriler,
- ☐ Otomatik pipet ve pipet uçları,
- ☐ Vidalı kapaklı şişeler,
- ☐ Şablon, boru şeklinde kesici, ince uçlu kürdan

7.3. Kullanılan Kimyasallar

Fosfat Buffer Saline

Noble Agar

Hazırlanması:

- ☐ Testte genellikle 100 ml PBS içerisinde 1 gr Noble agar / Agaroz ve 7.2 gr NaCl eritilerek hazırlanan agar kullanılır.
- ☐ Hazırlanan agar 100°C'de eritilir ve otoklavda buhar açık şekilde 15 dk. steril edilir veya mikrodalga fırında orta derecede 3-4 dakika iyice erimesi sağlanır.
- ☐ Agar kullanımdan 24 saat önce petrilere dökülerek hazırlanır (9 cm'lik petrilere 20 ml agar döküldüğünde 3 mm yüksekliğinde agar elde edilir). Agar dökülmüş petriler +4°C'de 7 güne kadar saklanabilir.

7.4. Metot

Şüpheli Serumların Hazırlanması

- ☐ 2 ml' lik tüpler içerisinde laboratuvara getirilen kanlar oda ısısında bekletilir.
- ☐ Bu bekleme sürecinde kanın pıhtılaşarak serumunun ayrılması sağlanır (bu süreci kısaltıp kanın hemoliz olmasını engellemek ve kan pıhtılaştığında serumun rahatça
- ☐ ayrılabilmesini sağlamak için kan pıhtısı ile tüp çeperi arasındaki bağlantı kesilecek şekilde çizilerek oda ısısında bekletilir).
- ☐ Daha sonra serum kan pıhtısından ayrılarak temiz bir tüpe alınır.
- ☐ Non-spesifik reaksiyonları önlemek amacıyla analiz edilecek tüm şüpheli serumlar 56°C'de 30 dk. inaktive edilir.
- ☐ İnaktive edilmiş olan serumlar hemen test edilmeyecekse + 4°C'de saklanır.

Şüpheli Materyalin Hazırlanması

- ☐ Marek (MD enfeksiyonlarından şüphelenilen hayvanlardan alınan organ, tüy örneklerinden etken izolasyonu için primer hücre kültürüne ekimler yapılır.
- ☐ Yapılan ekimler sonucu elde edilen şüpheli materyalle infekte olmuş primer hücre kültürü üst sıvısı teste kullanılır.

Testin Uygulanması

- ☐ Boru şeklinde bir delici yardımıyla çapı 5-7mm ve çukurlar arası mesafe 2-5mm olan ortada bir ve kenarlarda altı daire bulunan şablon kullanılarak agar da çukurlar açılır.
- ☐ Çukurlardaki agar bir kürdan ile çukurun duvarlarını zedelemekten dikkatlice çıkarılır.
- ☐ Her çukura eşit miktarda, yaklaşık 0.050 ml test materyali konulur.

Şüpheli serumlar test edilecekse; Ortaya standart antijen, etraftaki çukurlara şüpheli serumlar ve uygun çukurlara standart pozitif ve negatif kontrol serumları konulur.

Şüpheli materyal test edilecekse; Ortaya standart pozitif serum, etraftaki çukurlara ise hücre kültüründen hazırlanan inokulum ve uygun çukurlara standart pozitif ve negatif kontrol serumları konulur.

- ☐ Tüm bu çalışmalar kayıt edilir.
- ☐ Petriler 22°C -37°C arasında, rutubetli bir ortamda 24-48 saat süre ile inkübe edilir,
- ☐ Presipitin bantları yaklaşık 24-48 saat sonra görülebilir hale gelirler. Ancak bu süre, antikor ve antijenin konsantrasyonlarına bağlı olarak değişebilir.
- ☐ Oluşan presipitin bantlarının değerlendirilmesi en iyi şekilde, arkadan ışık verilip koyu bir zemine karşı gözlenerek yapılır.

7.5. Sonuçların değerlendirilmesi:

- ☐ Standart antijen/pozitif kontrol serumu ile arasında presipitin bantı oluşan çukurlardaki şüpheli serum/materyal = **Pozitif** olarak kabul edilir.
- ☐ Standart antijen/pozitif kontrol serumu ile arasında presipitin bantı oluşmamış olan çukurlardaki şüpheli serum /materyal = **Negatif** olarak ifade edilir.
- ☐ Bu sonuçlara göre;
- ☐ Petride uygun çukurlara konulmuş olan standart pozitif serum ile standart antijen arasında oluşan presipitin bantlarının varlığı,
- ☐ Negatif kontrol serum ile standart antijen arasında presipitin bandının oluşmamasına göre değerlendirilir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER:

- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2010), Marek's Disease, Bölüm 2.3.13.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLI ÇİÇEĞİ (FOWLPOX)’NİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) İLE TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Kanatlılarda, Kanatlı Çiçek Virüsü (KÇV) ile infekte olduğundan şüphelenilen hayvanlardan elde edilen trakea homejenatı, trakeal, kloakal ve oro-nazal sıvı örneklerinden PCR ile KÇV’nin tespit edilmesidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu, Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı’nda geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR

KÇV: Kanatlı Çiçek Virüsü

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

6. TEST METODUN KISA TANIMI:

Kanatlı trake homejenatı ve trakeal, kloakal ve oro-nasal sıvı örneklerinden ve standart KÇV antijeninden DNA ekstraksiyonun yapılması, KÇV spesifik primerler kullanılarak PCR yapılması ve PCR ürünlerinin agar jel elektroforezde yürütülmesinden sonra ürün boyutunun bp olarak tespit edilmesidir.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Trake homejenatı

Tracheal, kloakal ve oro-nasal swap örnekleri

Standart KÇV Antijen

7.2. Kullanılan Ekipman

Santrifüj

Otomatik pipet ve pipet uçları

1.5 ml DNaz RNaz ependorf tüp

0.2 ml ependorf tüp

PCR cihazı

Elektroforez tankı

Güç kaynağı

Görüntüleme cihazı

Laminal flow

Su banyosu

DNA ekstraksiyon kiti

Vortek

7.3. Kullanılan Kimyasallar

Taq DNA Polymerase

DNase RNase free distile su

Primerler FPV P1 5'-CAGCAGGTGCTAAACAACAA-3'

 FPV P2 5'-CGGTAGCTTAACGCCGAATA-3'

Hedef DNA

Ethidium bromide

TAE / TBE buffer

DNA ladder

Loading dye

7.3. Metot

DNA İzolasyonu

Örneklerden DNA izolasyonu DNA ekstraksiyon kiti protokolüne göre yapılır.

PCR

Her PCR reaksiyonu 50 µl final hacimde hazırlanır. Pozitif kontrol olarak KÇV (Charles River), negatif kontrol olarak su kullanılır.

PCR Bileşenleri

□ 10xReaction buffer	5 µl
□ MgCl ₂	1.5 mM
□ dNTP's	200 µM
□ Taq Polymerase enzimi	1 ünite
□ Primer 1	10 pmol
□ Primer 2	10 pmol
□ DNA template	10 µl

Steril DNaz RNaz distile su ile 50 µl'ye tamamlanır.

PCR basamakları

İlk denatürasyon	95°C de 5dk.	1 siklus
Amplifikasyon	94°C'de 30 sn. 55°C'de 1 dk. 72°C'de 2 dk.	34 siklus

olarak DNA amplifiye edilir.

Elektroforez:

- %2 lik agar TAE/TBE buffer içinde hazırlanır. Mikrodalga fırında eritilir ve içersine 0.5µg/ml ethidium bromide eklenir. Jel kastı hazırlanır tarak yerleştirilir ve hazırlanan agar içine dökülür.
- Agar mat renk alınca jel tankı içine yerleştirilir ve jel tankı agarın üzerini örtecek şekilde TAE/TBE buffer ile doldurulur.
- PCR ürününden 10 µl alınır 1,5 µl jel loading dye ile karıştırılır ve agar üzerinde tarağın oluşturduğu deliklere doldurulur.
- İlk deliğe de DNA merdiveni yüklenir.
- Örnekler 60 Voltta agarın 2/3ünü geçene kadar yürütülür

7.4. Sonuçların değerlendirilmesi

Agar UV ışığı altında incelenir. **578 bp** büyüklüğündeki bant KÇV'nin varlığını gösterir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER:

- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008), Fowlpox, Bölüm 2.3.10.
- ☐ Lee LH, Lee KH (1997). Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. Journal of Virological Methods, 63, 113-119.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

Bakteriyel Hastalıkların Teşhisinde Kullanılan Metotlar



KANATLI İÇ ORGANLARINDAN SALMONELLA GALLINARUM İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU

1. AMAÇ

Salmonella Gallinarum'un kanatlı iç organlarından (karaciğer ve dalak) izolasyonu ve serolojik, biyokimyasal yöntemler ile identifikasyonunu kapsar.

2. UYGULAMA ALANI

Kanatlı Hastalıkları Teşhis laboratuvarına getirilen kanatlı cinsi hayvanlarda Kanatlı Tifosu hastalığının teşhisinde kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual", esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

***Salmonella* Gallinarum:** *Enterobacteriaceae* familyasından, gram negatif, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz ve asido-rezistans olmayan bir mikroorganizmadır. Neden olduğu Tavuk Tifosu Hastalığı ihbarı mecburidir.

Biyokimyasal özellik: Bakterilerin identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal özellikler.

İç organ: Bakterilerin aranacağı yeni ölmüş kanatlı iç organlarıdır.

Besiyeri: Bakterinin şüpheli materyalden izolasyonuna ya da biyokimyasal reaksiyonların saptanmasına imkan sağlayan bakterinin üremiş olduğu ortam.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI:

Kanatlı hayvanlarda *Salmonella* Gallinarum'un etken izolasyonu ve etkenin serolojik ve biyokimyasal testlerle identifikasyonunu kapsamaktadır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal : Enfeksiyondan şüpheli kanatlı hayvanlara ait iç organlar (karaciğer ve dalak)

Gönderilecek materyalin mümkün olduğunca en kısa sürede soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılması gerekmektedir.

7.2. Kullanılan Ekipman:

- ☐ Otoklav
- ☐ Etüv
- ☐ Analitik teraziler (± 0.1 g ve ± 0.1 mg hassasiyette)
- ☐ Su banyosu ($35-100^{\circ}\text{C}$ 'ler arasında $\pm 1^{\circ}\text{C}$ hassasiyette ayarlanabilen)
- ☐ pH metre (en az 0.1 birim göstergeli)
- ☐ Bunzen beki
- ☐ Steril bıçak, pens, spatül, v.b. malzemeler
- ☐ Tüp karıştırıcı
- ☐ Özeler
- ☐ Plastik steril petriler
- ☐ Steril pipetler, 1 ml (0.01 ml bölmeli), 5 ve 10 ml (0.1 ml bölmeli)
- ☐ Deney tüpleri (16' 150 mm) ve tüp taşıyıcıları
- ☐ Erlen, beher, mezür v.b. standart laboratuvar cam malzemesi

7.3. Kullanılan besi yerleri, solusyonlar, ayıraç ve Salmonella O anti serumu

- ☐ Salmonella Omnivalent antiserum
- ☐ Salmonella O antiserum D1 grup, faktör 1, 9, 12 içeren
- ☐ Kanlı Agar (B.37)
- ☐ XLD (B.93)
- ☐ Brilliant Green Novobiocin (BGN) Agar (B.80)
- ☐ Nutrient Agar (B.92)
- ☐ Triple Sugar Iron (TSİ) Agar (B.72)
- ☐ Tryptophan medyum (B.94)
- ☐ Lysine Iron agar (B.06):
- ☐ Üre Agar (B.07)
- ☐ Arginin ve ornitin dekarboksilaz besi yerleri (B.08)

- ☐ Karbonhidrat fermentasyon besi yeri (B15)
- ☐ %10 Glikoz Solüsyonu (S.34)
- ☐ %10 Dulcitol Solüsyonu (S.84)
- ☐ %10 Maltoz Solüsyonu (S.51)
- ☐ %10 Mannitol Solüsyonu (S.50)
- ☐ Glikoz fermentasyon besi yeri (B96)
- ☐ Dulcitol fermentasyon besi yeri (B98)
- ☐ Maltoz fermentasyon besi yeri (B97)
- ☐ Mannitol fermentasyon besi yeri (B99)
- ☐ Kovaks ayırıcı (R.01)
- ☐ Fizyolojik Tuzlu Su (S.28)

7.4. Metot

Gelen materyaller $+4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmalıdır. Örnekler donmuş halde ise analiz edilene kadar donmuş olarak saklanmalıdır.

İzolasyon

Otopsi yapıldıktan sonra T(P 17)02 kanatlıların karaciğer ve dalaklarından direkt kanlı agara (B.37), Brilliant Green Novobiocin Agar'a (B.80) ve XLD Agar'a (B.93) ekim yapılır. Besiyerleri $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de aerobik koşullarda 24-48 saat inkube edilir.

Salmonellalar kanlı agarda 1-2 mm çapında yuvarlak, parlak, pürüzsüz ve kubbe şeklinde, XLD Agar'da besiyeri ile aynı renkte, yarı saydam, bazen siyah merkezli koloniler şeklinde, BGN Agar'da pembe koloniler halinde üreme gösterirler. Serolojik teyit için her petriden 5 tipik yada şüpheli koloni *Salmonella* Omnivalent antiserum ile lam tekniği kullanılarak inceleme yapılır. 5 kolonide aglütinasyon oluşmamış ise test negatif olarak değerlendirilir ve ileri kontrol muayenelerine devam edilmez. 5 kolonide aglütinasyon oluşmuş ise test pozitif olarak değerlendirilir ve ileri kontrol muayenelerine devam edilir.

Salmonella şüpheli kolonilerden nutrient agarda saf kültür için $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de aerobik koşullarda 20-24 saat inkube edilir.

Salmonella olduğu tespit edilen suşlar *Salmonella* O antiserum D1 grup, faktör 1, 9, 12 içeren antiserum ile serolojik teste tabi tutulur. Serolojik test pozitif sonuç verirse hareket muayenesi için yarı katı agara ekilir ve suşların hareketsiz olduğu tespit edildiğinde *S. Gallinarum* ve *S. Pullorum*'un biyokimyasal özellikleri Tablo 1'de gösterdiği gibi ayrımı yapılır.

İdentifikasyon

Doğrulama: Agarlı besiyerinde üreyen tipik koloniler Nutrient Agar'a (B.92), tek koloni düşmesi sağlayacak şekilde ekilir ve 37°C 'de 20-24 saat inkübe edilir. Nutrient Agar üzerinde üreyen koloniler doğrulama testlerinde kullanılır.

Biyokimyasal Testler:

Hareket muayenesi: Yarı katı besiyerine (B.03) şüpheli koloniden ekim yapılır. 37°C'de 20-24 saat edilir. Hareketsiz suşlar besiyerinin tam ortasında inokulasyon hattı boyunca sınırlı bir üreme göster. Hareketli suşlar tüpün her tarafında homojen üreme görülmesi hareketin müspet olduğunu gösterir. *Salmonella* Gallinarum hareketsizdir.

TSI Agar Testi: Özeyle alınan kültür önce besiyerinin (B.72) dip kısmına daha sonra yüzeye sürülerek ekim yapılır. 24-48 saat 37°C'de inkübe edilir. Oluşan değişiklikler şöyle yorumlanır.

Dip Kısım

Nedeni

Sarı renk	Glukozun fermentasyonu
Kırmızı veya renk değişikliği	Glukozun fermente olmaması
Siyah renk	Hidrojen sülfür oluşumu
Gaz kabarcıkları	Glukozdan gaz oluşumu

Yüzey kısım

Sarı renk Laktöz ve/ veya sukrozun fermentasyonu

Kırmızı veya renk değişikliği yok Laktöz ve/ veya sukrozun fermente olmaması

Salmonella Gallinarum glukozu fermende eder ve laktöz, sakkarozu fermente etmez.

Ürenin hidrolizi: Şüpheli koloniden üre agara (B.07) ekim yapılır. 37°C'de 24 saat inkübe edilir. Reaksiyon 2-4 saat sonra gerçekleşir, eğer reaksiyon üreaz varlığı yönünden pozitif olarak gerçekleşirse; üre, amonyak açığa çıkartır, renginin sarıdan kırmızıya dönüşür. *Salmonella* Gallinarum üreyi hidroliz etmez.

İndol oluşumu: Şüpheli koloniden 5 ml tryptophan medyumunu (B.94) içeren tüpe ekim yapılır. 37°C'de 24 (±3) saat inkübe edilir. Daha sonra 1 ml Kovacs reaktifi ilave edilir. Kırmızı halka pozitif reaksiyon, sarı-kahverengi bir halkanın oluşması negatif reaksiyonun olarak değerlendirilir. *Salmonella* Gallinarum indol üretmez.

Lizin Dekarboksilaz Testi: Şüpheli koloniden Lysine Iron agara (B.06) ekim yapılır. 37°C'de 24 (±3) saat inkübe edilir. Mor renk oluşumu pozitif reaksiyon olarak, sarı renk negatif reaksiyon değerlendirilir. *Salmonella* Gallinarum lizin dekarboksilaz enzimine sahiptir.

Ornitin dekarboksilaz testi: Ornitin içeren dekarboksilaz (B.08) besiyerine şüpheli koloni ile inokule edilerek 37°C 'de 3-4 gün inkube edilir. Besiyerinin renginin koyulaşması pozitif, açılması negatif olarak değerlendirilir. *Salmonella* Gallinarum ornitin dekarboksilaz enzimine sahip değildir.

Şeker fermentasyon testi: Brom creosol purple ve ayrı ayrı % 1 oranında karbonhidratları (glukoz, maltoz, dulsitol ve mannitol) içeren peptonlu su (B96, B97, B98, B99) içeren tüplere ekilir ve karıştırıldıktan sonra 37°C'de 48 saat inkübe edilir. Sarı renk oluşumu şekerlerin fermentasyon açısından pozitif olarak değerlendirilir. *Salmonella* Gallinarum glukoz, maltoz, dulsitol ve mannitolu fermende ederler.

Gaz Oluşturma Testi: Durham tüplü brom creosol purple içeren karbonhidratlı (glikoz, maltoz, dulsitol ve mannitol) besiyerinde inkübasyondan sonra durham tüplerinde gaz birikmesi pozitif olarak değerlendirilir. *Salmonella* Gallinarum glikoz, mannitol'dan gaz oluşturmaz.

Serolojik Testler

Otoagglutinasyon yapmayan saf kolonilerin (O) antijenleri varlığının tespiti için *Salmonella* O antiserum D1 grup, faktör 1, 9, 12 içeren antiserum ile lam tekniği kullanılarak inceleme yapılır.

***Salmonella* Polyvalent (O) Testi :** Lam ikiye ayrılır ve ayrılan her iki kısma birer damla fizyolojik tuzlu su konur. Üzerine nutrient agardaki 24-48 saatlik kolonilerden 3 mm'lik özesinin yarısı dolu olarak alınır ve karıştırılır. Lamin bir kenarı birinin üzerine 1 damla *Salmonella* O antiserum D1 grup, faktör 1, 9, 12 içeren antiserum damlatılır. 30 sn.-1 dk. kadar rotasyon hareketi ettirilerek karıştırılır. Siyah zemine karşı incelenir. Eğer kültür + fizyolojik tuzlu su çözeltisi + polyvalent serum karışımında aglütinasyon oluşmuş, kültür + fizyolojik tuz su çözeltisi karışımında aglütinasyon oluşmamış ise test pozitif olarak değerlendirilir.

Tablo 1. *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum*'un biyokimyasal özellikleri

Test	<i>S. Pullorum</i>	<i>S. Gallinarum</i>
TSI Glikoz fermantasyonu (asit oluşturma)	+	+
TSI Glikoz (gaz oluşturma)	v	-
TSI Laktoz fermantasyonu (Asit Oluşturma)	-	-
TSI Sakkaroz fermantasyonu (Asit Oluşturma)	-	-
TSI Hidrojen sulfid	v	v
Glikozdan gaz oluşumu (Durham tüplü kültürde)	+	-
Ürenin hidrolizasyonu	-	-
Lysine decarboxylation	+	+
Ornithine decarboxylation	+	-
Maltoz fermantasyonu (Asit Oluşturma)	- veya geç +	+
Dulsitol fermantasyonu (Asit Oluşturma)	-	+
Mannitol fermantasyonu (Asit Oluşturma)	+	+
Mannitoldan gaz oluşumu (Durham tüplü kültürde)	+	-
İndol oluşumu	-	-
Hareket	-	-

+ = 1 veya 2 gün içinde % 90 veya daha fazla pozitif reaksiyon

- = negatif reaksiyon

v = değişken reaksiyon

7.5. Sonuçların değerlendirilmesi

- ☐ Talimatın etkinliği Standart S. Gallinarum suşu, Etlik Merkez Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarı ile yapılan karşılaştırmalı doğrulama testi ile ispatlanır.
- ☐ İzolasyonda kullanılan besiyerlerinin *Salmonella* spp. üretebilme yeteneği ve identifikasyonda kullanılan her bir besi yeri ile her bir testin çalışıp çalışmadığı, standart ve sertifikalı S. Gallinarum suşu (NCTC 10532) ve *E. coli* suşu (ATCC 25922) ile kontrol edilir.
- ☐ Laboratuvar şartları gerektirdiğinde hastalıklı materyalden S. Gallinarum suşunun izolasyon ve identifikasyonu Vitek Compact 2 cihazı kullanılarak da yapılır ancak bu durumda akredite yöntem sayılmaz ve analiz raporunda 'Akredite analiz işareti' kullanılmaz.
- ☐ Analizi yapan kişi; testi, yapılan mikroorganizma adını, kullanılan besiyerini, inkübasyon süresini, ısısını ve sonuçları laboratuvar analiz defterine kaydeder.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012), Fowl Typhoid and Pullorum Disease, Bölüm 2.3.11.
- ☐ Babila A, Akçadağ B (1986) Studies on fowl Typhoid vaccines. The Journal of Pendik Animal Diseases Central Research Institute Istanbul- Turkey 18, 28-36
- ☐ Bilgehan H. (1992) Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 1. Baskı. Fakülteler Kitabevi, Barış Yayınları, İzmir.
- ☐ Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmeleri Yönetmeliği Uygulama Talimatı, Tarih ve No: 30.11.2007/43
- ☐ Saif YM., Fadly AM., Glisson JR., McDougald LR., Nolan KL., Swayne DE (2008). Diseases of Poultry, 12 edition Wiley-Blackwell.
- ☐ Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Laboratuvar Metot Birliği / Twinning Projesi “*Salmonella* İzolasyonu (ISO 6579).

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLI PARATİFO İNFEKSİYONLARININ TEŞHİSİ

1. AMAÇ

İnsanlarda infeksiyona neden olan ve gıda patojeni *Salmonella* serotiplerinin, hayvanlarda izlenmesi amacıyla hayvan dışkılarından, çevresel kaynaklardan, yemlerden ve hayvansal gıdalardan izolasyonu ve identifikasyonu için kullanılan laboratuvar teşhis yöntemlerinin açıklanması amaçlanmıştır.

2. UYGULAMA ALANI

Açıklanan teşhis yöntemi, kanatlı hayvanların dışkılarından, çevresel kaynaklardan, yemlerden ve hayvansal gıdalardan hareketli *Salmonella* serotiplerinin (Paratifo infeksiyonuna neden olan serotipler) varlığını belirlenmeye yönelik hazırlanmıştır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların infeksiyonuna yol açma riski nedeni ile infeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

TPS: Tamponlanmış Peptonlu Su

RVS: Rappaport–Vassiliadis Soy Buyyon

BGA: Brilliant Green Phenolred agar

XLD: Xylose Lysine Deoxycholate

MKTn: Mueller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin

TSI: Triple Sugar/ Iron

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Teşhis için kullanılacak materyallerden *Salmonella* serotiplerinin izolasyon ve identifikasyon yönteminin detayları ile moleküler ve serolojik teşhis ile ilgili genel uygulamaları tanımlar.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal: Klinik belirti gösteren ve bireysel izleme yapılacak kanatlılardan iç organ materyali ve/veya kloakal svaplar aseptik koşullarda alınmalıdır. Klinik vakalarda, belirtilerin ortaya çıkmasını takiben materyal alınmalı ve bu hayvanlarda antibiyotik kullanılmamalıdır. Kümeslerde enterik kolonizasyonu belirlemek amacıyla, kümeslerden altlık, toz ve çevresel örnekler drag/çorap svap şeklinde alınmalıdır. Bu örnekleme yöntemi ile kümeslerde ve örnek alınan yüzeylerde *Salmonella* varlığı belirlenebilir. Konakçı-spesifik serotiplerin dışkıdan ve çevresel örneklerden izolasyonu zordur. Paratifo etkenlerinin izolasyonu için kesim aşamasına gelen broiler/hindi ve iki haftalıktan büyük damızlık ve yumurtacı kümeslerden kloakal svap, drag/çorap svap ve kümes tozu alınabilir. Ayrıca direkt olarak sekal içerik, dışkı örneği bir kaba alınarak izolasyon amacıyla kullanılabilir. Kesimhanede karkaslar materyal olarak kullanılabilir. Ayrıca yem fabrikasından çevresel kaynaklardan alınan drag svaplar, hayvan yemleri ve gıdalar da direkt olarak *Salmonella* varlığı yönünden incelenebilir. Alınan materyaller aynı gün içinde soğukta laboratuara ulaştırılmalıdır.

7.2. Kullanılan Ekipman: Bu kapsamda gerekli ekipman, klasik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan ekipmanlardır.

- ☐ Otoklav
- ☐ Etüv
- ☐ Petri kutusu
- ☐ Mikrobiyolojik güvenlik kabini (Class II)
- ☐ Mikroskop

7.3. Kullanılan Kimyasallar

Fizyolojik Tuzlu su

İçerik:

Sodyum klorür (NaCl).....8.5 g
Distile su.....1000 ml

Hazırlanışı:

Distile suyun içerisinde sodyum klorür çözündürülür.

121°C'de 15 dk. otoklavda sterilize edilir.

pH 25 °C'de 7,0 ± 0,2'e ayarlanır.

Potasyum Hidroksit Solüsyonu

İçerik:

Potasyum hidroksit.....	40 g
Distile su.....	100 ml

Hazırlanışı:

Potasyum hidroksit distile su içinde çözündürülür.

7.4. Kullanılan Besiyerleri

Tamponlanmış Peptonlu Su

İçerik:

Pepton.....	10.0 g
Sodyum klorür (NaCl).....	5.0 g
Disodyum hidrojen fosfat dodecahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).....	9.0 g
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4).....	1.5 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanışı:

Tüm içerik distile suda çözündürüldükten sonra 225 ml'lik erlen mayerlere paylaştırılır.

121°C'de 15 dk. otoklavda sterilize edilir.

pH 25°C'de 7.0 ± 0.2 'e ayarlanır.

Rappaport-Vassiliadis Soy Broth (RVS Broth)

İçerik:

Base

Soy Pepton	5.0 g
Sodyum klorür(NaCl).....	8.0 g
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4).....	1.4 g
Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4).....	0.2 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanışı:

Tüm içerik 70 °C'de ısıtılarak çözündürülür.

Magnezyum klorür solüsyonu

Magnezyum klorür heksahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$).....400 g
Distile su.....1000 ml

Malaşit yeşili solüsyonu

Malaşit yeşili oksalat.....0.4 g
Distile su.....100 ml

Birleşim Besiyeri

Base.....1000 ml
Magnezyum klorür solüsyonu.....100 ml
Malaşit yeşili solüsyonu.....10 ml

Hazırlanışı:

Base içerisine solüsyonlar eklenerek karıştırılır.
Tüplere 10 ml hacimde olacak şekilde paylaştırılır.
121°C'de 15 dk. otoklavda sterilize edilir.
pH 5.2 ± 0.2 'e ayarlanır.

Mueller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth (MKTn)

İçerik:

Base

Et ekstraktı.....4.3 g
Pepton.....8.6 g
Sodyum klorür ($NaCl$).....2.6 g
Kalsiyum karbonat ($CaCO_3$).....38.7 g
Sodyum tiosülfat pentahidrat ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$).....47.8 g
Safratuzusu.....4.78 g
Brillant green.....9.6 mg
Distile su.....1000 ml

Hazırlanışı:

Tüm içerik distile suda çözündürülür ve 5 dk. kaynatılır.
pH 25°C'de 8.2 ± 0.2 'e ayarlanır.

İyot ve Potasum İyodine solüsyonu

İyot.....	20.0 g
Potasyum iyodin (KI).....	25.0 g
Distile su.....	100 ml

Novobiocin solüsyonu

Novobiocin sodyum tuzu.....	0.04 g
Distile su.....	5 ml

Hazırlanışı

Novobiocin sodyum tuzu distile suda çözündürülür ve filtrasyon ile sterilize edilir.

Birleşim Besiyeri

Base.....	1000 ml
İyot-Potasyum iodine solüsyonu.....	100 ml
Novobiocin solüsyonu.....	5 ml

Hazırlanışı:

Novobiocin solüsyonu ve base karıştırıldıktan sonra iyot solüsyonu eklenir. Tüm içerik karıştırıldıktan sonra vida kapaklı tüplere 10 ml olacak şekilde paylaştırılır.

Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD Agar)

İçerik:

Base

Maya ekstraktı.....	3.0 g
Sodyum klorür (NaCl).....	5.0 g
Ksiloz.....	3.75 g
Laktoz.....	7.5 g
Sukroz.....	7.5 g
L-lizin hidroklorid.....	5.0 g
Sodyum tiyosülfat.....	6.8 g
Demir (III) amonyum asetat.....	0.8 g
Fenol kırmızısı.....	0.08 g
Sodyum deoksikolat.....	1.0 g
Agar.....	9-18 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanışı:

Agar eriyinceye kadar kaynar su banyosunda tutulur.

Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur.

Aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır.

pH'sı 25°C'de 7.4±0.2'e ayarlanmalıdır.

Nutrient Agar

İçerik:

Et ekstraktı.....	3.0 g
Pepton.....	5.0 g
Agar.....	9-18 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanışı:

Agar 121°C'de 15 dk. otoklavda sterilize edilir.

pH 25°C'de 7.0 ± 0.2'ye ayarlanır.

Triple Sugar/ Iron Agar (TSI agar)

İçerik:

Et ekstraktı.....	3.0 g
Maya ekstraktı.....	3.0 g
Pepton.....	20.0 g
Sodyum klorür (NaCl).....	5.0 g
Laktoz.....	10.0 g
Sukroz.....	10.0 g
Glukoz.....	1.0 g
Demir (III) sitrat.....	0.3 g
Sodyum tiyosülfat.....	0.3 g
Fenol kırmızısı.....	0.024 g
Agar.....	9-18 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanışı:

Agar vida kapaklı tüplere 10 ml olacak şekilde paylaştırılıp 121°C'de 15 dk. otoklavda sterilize edilir.

Tüpün dibindeki agar 2.5-5 cm olacak şekilde yatık vaziyette dondurulur.

Üre Agar (Christensen)

İçerik:

Base

Pepton.....	1.0 g
Glukoz.....	1.0 g
Sodyum klorür (NaCl).....	5.0 g
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄).....	2.0 g
Fenol kırmızısı.....	0.012 g
Agar.....	9-18 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanışı:

Tüm bileşenler distile suda çözündürülür ve 121°C'de 15 dk. otoklavda sterilize edilir.
pH 25°C'de 6.8 ± 0.2'ye ayarlanır.

Üre solüsyonu

Üre.....	400 g
Distile su.....	final hacim 1000 ml

Hazırlanışı:

Üre distile suda çözündürülür ve filtrasyon ile sterilize edilir.

Birleşim Besiyeri

Base.....	950 ml
Üre solüsyonu.....	50 ml

Hazırlanışı:

Base sterilize edildikten sonra 44°C-47°C'ye soğutulur ve üre solüsyonu eklenir.
Tüplere 10 ml olacak şekilde paylaştırılır; yatık vaziyette dondurulur.

L-Lizin Dekarboksilaz Besiyeri

İçerik:

L-Lizin monohidroklorid.....	5.0 g
Maya ekstraktı.....	3.0 g
Glukoz.....	1.0 g
Bromkrezol purpur.....	0.015 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanışı:

Besiyeri vida kapaklı tüplere 2-5 ml olacak şekilde paylaştırılıp 121°C'de 15 dk. otoklavda sterilize edilir.

pH 25°C'de 6.8 ± 0.2 'ye ayarlanır.

β -Galaktosidaz Test Besiyeri

İçerik:

Tampon solüsyon

Sodyum dihidrojen fosfat(NaH_2PO_4).....	6.9 g
Sodyum hidroksit(10 mol/l).....	3 ml
Distile su.....	final hacmi 50 ml

ONPG solüsyonu

<i>o</i> -Nitrofenil β -D-galaktopiranozid (ONPG).....	0.08 g
Distile su.....	15 ml

Birleşim Besiyeri

Tampon solüsyonu.....	5 ml
ONPG solüsyonu.....	15 ml

Hazırlanışı:

Tampon solüsyonu ONPG solüsyonuyla karıştırılır.

Voges Proskauer Besiyeri

İçerik:

Pepton.....	7.0 g
Glukoz.....	5.0 g
Dipotasyum hidrojen fosfat(K_2HPO_4).....	5.0 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanışı:

Vida kapaklı tüplere 3 ml olacak şekilde paylaştırılıp 121°C'de 15 dk. otoklavda sterilize edilir.

pH 25°C'de 6.9 ± 0.2 'ye ayarlanır.

Voges Proskauer Ayıraçları

Kreatin solüsyonu (N-amidinosarcosine)

Kreatin monohidrat.....	0.5 g
Distile su.....	100 ml

Naftol etanol solüsyonu

1-Naftol.....	6 g
Etanol(96 %).....	100 ml

Trypton/Triptofan Besiyeri

İçerik:

Trypton.....	10 g
Sodyum klorür (NaCl).....	5 g
DL-Triptofan.....	1 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanışı:

Vida kapaklı tüplere 5 ml olacak şekilde paylaştırılıp 121°C'de 15 dk. otoklavda sterilize edilir.
pH 25°C'de 7.5 ± 0.2'ye ayarlanır.

İndol Test Ayırıcı

Kovaks

4-Dimetilaminobenzadehid.....	5 g
Hidroklorik asit	25 ml
2-Metilbütan-2-ol.....	75 ml

7.5. İzolasyon ve identifikasyon: Paratifoid *Salmonella* serotipleri, ender olarak kanatlı hayvanlarda sistemik infeksiyonlara neden olmaktadır. Genel olarak hayvan dışkılarında bulunmakta ve hayvansal gıdalara bulaşmaktadır. Bu nedenle izolasyon ve identifikasyon, materyal orijinine göre aşağıdaki basamaklar kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

İzolasyon: Sistemik infeksiyon görülen sürülerden bireysel örnekleme ile alınan materyallerden direkt genel besiyerlerine ekim yapılırken; kanatlı hayvanlardan enterik kolonizasyonu, kümes ve çevresel kaynaklarda ve ayrıca hayvansal gıdalardan alınan materyallerden *Salmonella* varlığını belirlemek amacıyla, belirli zenginleştirme ortamları kullanılarak izolasyon ve identifikasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla alınan materyaller uluslararası standart metodlarla incelenmelidir. Bu amaçla ISO 6579:2002 en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu metot, ön zenginleştirme, selektif

zenginleştirme ve selektif-diferansiyel agarda izolasyon aşamalarından oluşmaktadır. *Salmonella* şüpheli kolonilerin identifikasyonu ise, izolasyon aşamasından sonra biyokimyasal özellikleri ve serolojik doğrulama aşamaları ile yapılmaktadır. Yöntem aşağıda detaylandırılmıştır.

Ön zenginleştirme: Dışkı, yem, hayvansal gıdalardan 25 gr. numune veya drag/çorap svaplar aseptik koşullarda steril Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS; %10) ile homojenize edilir. 37°C'lik etüvde 18-24 saat inkübe edilerek ön zenginleştirme sağlanır.

Selektif zenginleştirme: Ön zenginleştirme sonunda ikinci gün kültürden içinde 10 ml Rappaport–Vassiliadis Soy Buyyonu (RVS) bulunan tüpe 0.1 ml ve içinde 10 ml. Tetrathionate Buyyon (Müller-Kauffman) bulunan tüpe 0.1 ml. aktararak 42°C'de 18-24 saat zenginleştirme için inkübe edilir.

Selektif-diferansiyel agarda izolasyon: İnkübasyon sonunda üçüncü gün bir öze dolusu kültür alınarak izolasyon için Brilliant Green Phenolred agar (BGA) ve XLD agara azaltma yöntemiyle ekilir. 24-48 saat 37°C'de inkübasyondan sonra *Salmonella* şüpheli kolonilerden (XLD'de siyah merkezli kırmızı; BGA'da pembe) dördüncü gün Nutrient agar'da saf kültürü yapılır.

İdentifikasyon: Besiyerinde saf olarak üreyen koloniler, biyokimyasal özelliklerine göre identifikasyonu yapılır (Tablo 1). Bu testere ilave olarak polivalan serumlarla lamda ve/veya tüpte aglütinasyon ile doğrulaması yapılır.

Tablo 1. *Salmonella* identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal özellikler

Biyokimyasal Testler	Sonuç
Triple Sugar Iron Testi	H ₂ S pozitif
Üre Hidroliz Testi	-
İndol Testi	-
Lizin Dekarboksilaz Testi	+
Voges Proskauer	-
B-Galaktosidaz Testi	-

Serotiplendirme: *Salmonella* spp. olarak identifiye edilen koloniler, “O” somatik, “H” fimbria ve “Vi” antijenlerine göre serotiplendirmeleri gerçekleştirilir.

Moleküler teşhis: Hayvan dışkılarından, çevresel örneklerden, yem ve gıdalardan *Salmonella* izolasyon ve identifikasyonunun zaman alması nedeniyle hızlı sonuç veren moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında, immunomanyetik separasyon (IMS), ELISA, konvansiyonel ve Real-Time PCR sayılabilir. Bu yöntemlerde teşhis süresi 24-48 saattir ve otomatize sistemler de geliştirilmiştir. Ancak tüm bu çabuk yöntemlerin standardizasyonu için detaylı çalışmalar yapılması ve kontrollerle birlikte çalışılması önemlidir.

Serolojik testler: Hayvanlarda salmonella infeksiyonlarının teşhisi için serolojik testler kullanılmaktadır. Bu testlerden boyalı antijenle kanla yapılan aglütinasyon testleri uzun yıllardır teşhiste kullanılmaktadır ancak kanatlı spesifik salmonella seotipleri için kullanılabilir bir yöntemdir. İnsan sağlığını etkileyen serotipler arasında, *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium infeksiyonlarının teşhisine yönelik ticari ELISA temelli teknikler/kitler bulunmaktadır ve laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Bu testlerde ticari yumurtacılarda bu infeksiyonların teşhisinde serum ve yumurta sarısı materyal olarak kullanılmaktadır.

7.6. Sonuçların değerlendirilmesi: İnsan sağlığını etkileyen paratifooid serotiplerin teşhisinde, standart yöntem olan zenginleştirme yöntemi sonrasında şüpheli koloniler biyokimyasal özelliklerine göre identifiye edilmesi ve *Salmonella* spp. olarak identifiye edilen suşların serolojik doğrulamadan sonra kesin tanı yapılmalıdır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR/KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2010), Salmonellosis, Bölüm 2.9.9.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR (1999). Clinical Veterinary Microbiology. Mosby, Edinburgh, Harcourt Publishers Ltd., 648 pp.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

SALMONELLA PULLORUM / GALLINARUM LAM AGLÜTİNASYON TESTİ

1. AMAÇ

Salmonella Pullorum / Gallinarum antijeni kullanarak kanatlı serumlarında antikor aramaktır. Sahadan laboratuvarımıza gelen kanatlı serumlarında *Salmonella* Pullorum / Gallinarum enfeksiyonunun saptanması ve damızlık sürülerin taranması için kullanılır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu Kanatlı Hastalıkları Teşhis laboratuvarında uygulanmaktadır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR

Aglütinasyon: Antijen ile kendi antikorlarının birleşmesi olayıdır.

***Salmonella* Pullorum:** Genç kanatlılarda genellikle septisemik ve öldürücü, erginlerde kronik ve lokalize formlarla seyreden, bulaşıcı enfeksiyöz bir hastalığa neden olan bir bakteridir.

***Salmonella* Gallinarum:** Başta tavuk olmak üzere diğer evcil kanatlıların perakut, akut, subakut ve kronik seyirli bir hastalığa neden olan bir bakteridir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI:

Oda ısısında olan kanatlı kan serumu ve *Salmonella* Pullorum / Gallinarum antijeni bir fayans üzerine eşit miktarda (0.02 ml) damlatılır. Serum ve antijen iyice karıştırılır. Plak'a 5 saniye rotasyon hareketi yaptırılır. İlk dakikanın sonunda, plak tekrar 5 saniye çevrilerek sonuçlar en geç 2 dakika

içinde okunur. Bu sürenin dışındaki reaksiyonlar negatif olarak değerlendirilir. Pozitif olgularda antijenin kümelenmesi görülür. Negatif olgularda karışım homojen olarak kalır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Kan serumu

7.2. Kullanılan Ekipman:

- ☐ Mikropipet (5 µl-50 µl)
- ☐ Tips (10 µl-100 µl)
- ☐ Salmonella pullorum/gallinarum antijeni
- ☐ Yağsız, tozsuz, kuru, çok temiz beyaz fayans
- ☐ Karıştırmak için kürdanlar

7.3. Kullanılan Kimyasallar ve Reagentler:

Sg antijeni, pozitif ve negatif kontrol serumlar

7.4. Metot

Bu test oda derecesinde 0.02 ml test serumu ile 0.02 ml (eşit miktarda) test antijeninin karıştırılması ile yapılır. Kullanılmadan önce antijen ve test serumlarının oda derecesinde ısınması sağlanır. Test serumları 0.02 ml miktarında ayrı pipetlerle veya standart öze ile aralıklı olarak sıra ile damlatılır. Belli sayıda sınırlı örnekler (20 den fazla olmamalı) bir defada yerleştirilir. Antijen şişesi dikey tutularak serumların yayına antijen damlatılır. Serumla antijen iyice karıştırılır. Plak'a 5 saniye rotasyon hareketi yaptırılır. İlk dakikanın sonunda, plak tekrar 5 saniye çevrilerek sonuçlar en geç 2 dakika içinde okunur. Bu sürenin dışındaki reaksiyonlar negatif olarak değerlendirilir. Pozitif olgularda antijenin kümelenmesi görülür.

Negatif olgularda karışım homojen olarak kalır. Testin her yapılışında titresini bilinen pozitif ve negatif serumlarla antijenin kontrolü yapılır. Non-spesifik reaksiyonlarda partiküller arası boşlukların belirgin olmadığı gözlenen bir aglutinasyon 2 dakika veya belirgin olarak 2 dakikadan sonra meydana gelir. Donmuş, dekompoze olmuş, hemolizli ve fibrinli serumlar yanıltıcı pozitif reaksiyona sebep olduğundan kullanılmamalıdır. Test yapılacak fayans veya cam, tozsuz ve yağsız olmalı, temiz su ile yıkanmalı ve temizlikte alkol, deterjan kullanılmamalıdır. Ortam tozsuz ve ısı derecesinin 20-25°C arası olması sağlanmalıdır.

7.5. Sonuçların değerlendirilmesi:

İlk dakikanın sonunda, plak tekrar 5 saniye çevrilerek sonuçlar en geç 2 dakika içinde okunur. Bu sürenin dışındaki reaksiyonlar negatif olarak değerlendirilir. Pozitif olgularda antijenin kümelenmesi görülür. Negatif olgularda karışım homojen olarak kalır. Non-spesifik reaksiyonlarda partiküller arası boşlukların belirgin olmadığı gözlenen bir aglutinasyon 2 dakika veya belirgin

olarak 2 dakikadan sonra meydana gelir. Testin her yapılışında titresi bilinen pozitif ve negatif serumlarla antijenin kontrolü yapılır.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ T.C. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı Kuluçkahane ve Damızlık İşletmelerinin Sağlık Kontrol Yönetmeliğı ve Talimatı, Ankara 1998
- ☐ National Poultry Improvement Plan and Auxillary Provisions June 1994.
- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012), Fowl Typhoid and Pullorum Disease, Bölüm 2.3.11.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLI KOLERASI (FOWL CHOLERA) ETKEN İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU

1. AMAÇ

Kanatlı kolerası, kanatlı hayvanların perakut, akut, septisemik ve kronik seyreden bulaşıcı ve öldürücü bakteriyel bir hastalığıdır. Hastalık etkeni *Pasteurella multocida*'dır. Bu test ile, Kanatlı kolerası etkenin izolasyonu ve identifikasyonu amaçlanmıştır.

2. UYGULAMA ALANI

Kanatlı kolerası enfeksiyonunun teşhisinde kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Kanatlı hayvanlarda Kanatlı kolerası (Pasteurellosis) hastalığında etken izolasyonu ve identifikasyonu (*P. multocida*) için bakteriyolojik test metodunu içerir.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

- Canlı ve ölü hayvanlardan alınan karaciğer, kemik iliği, dalak gibi iç organlar
- Kalp kanı
- Hastalığın kronik formundaki kanatlının eksudatif lezyonları,
- Kronik olgularda yada hayvanda postmortem otoliz şekillenmiş ise, kemik iliği

7.2. Kullanılan ekipman;

- ☐ Otoklav
- ☐ Etüv
- ☐ Buzdolabı
- ☐ Petri kutusu
- ☐ Otopsi malzemesi (makas, pens, bıçak, bistürü)
- ☐ Class II mikrobiyolojik güvenlik kabini
- ☐ Mikroskop

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ Karbonhidratlar (glukoz, mannoz, galaktoz, fruktoz, sukroz., ramnoz, sellobioze, rafinoz, inulin, eritritol, adonitol, m-inositol, salisin, mannitol, arabinoz, maltoz, laktoz, dekstrin, ksiloz, trehaloz, gliserol ve sorbitol)
- ☐ Kristal Viyole Çalışma Solüsyonu
- ☐ Lügol Çalışma Solüsyonu
- ☐ Sulu fuksin Çalışma solüsyonu
- ☐ Giemsa Boya Solusyonu

7.4. Kullanılan Besiyerleri

- ☐ Kanlı Agar (%5-7 koyun kanı ilaveli)
- ☐ MacConkey Agar
- ☐ Trypticase Soy Agar
- ☐ Dextrose starch agar

7.5. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

Bakteri İzolasyonu

Hastalığın akut formunda ölen kanatlının otopsi yapılarak ve biyogüvenlik önlemleri alınarak laboratuara getirilen canlı ve ölü hayvanlardan alınan materyaller karaciğer, kemik iliği, dalak gibi iç organlardan, kalp kanından veya hastalığın kronik formunda bulunan kanatlının eksudatif lezyonlarından izolasyon kolaylıkla yapılabilir. Kronik olarak etkilenen ve aşırı zayıflık ve güçsüzlük dışında hastalığa ait hiçbir semptom göstermeyen kanatlılarda izolasyon genellikle güçtür. Bu tip vakalarda ve ölmüş hayvanlarda postmortem otoliz şekillenmişse izolasyon için tercih edilecek doku kemik iliği olmalıdır.

Kültür alınacak dokunun dış yüzeyi kızgın bir spatula ile dağlanır ve steril bir swap ya da öze ile ısı ile steril edilmiş yüzeyden girilerek örnek alınır. Örnek daha sonra tryptose ya benzeri bir sıvı besi yerine alınır, birkaç saat inkübe edildikten sonra agar besi yerine alınır ve inkübe edilir. *Pasteurella multocida*, fakültatif anaerob bir bakteridir, en iyi şekilde 35-37°C'de ürer. Primer izolasyon

genellikle kanlı agar, dextrose starch agar, trypticase soy agar gibi besi yerleri kullanılarak yapılır.

Bakteriyoskopi

Uygun koşullarda 8-24 saatlik inkübasyon sonunda katı besi yerinde genellikle birbirinden ayrı, parlak, S tipli yuvarlak şekilli, 1- 3 mm çapında bombeli koloniler meydana gelir. Kapsüllü organizmler genellikle kapsülsüz olanlara nazaran daha büyük koloniler oluştururlar. Sulu-mukoid koloni formu kanatlı izolatlarında nadir görülür. Etken Gram negatif kokobasil, kısa çomak şeklinde, genellikle 0.2-0.4 X 0.6-2.5 mm büyüklüğünde, tek ya da çiftler halinde görülürler. doku sürme preparatlarında bulunanlar Giemsa boyama ile boyandığında bipolar ve genellikle kapsüllüdür.

Bakteri identifikasyonu

Biyokimyasal testler

İdentifikasyon biyokimyasal test sonuçlarına dayanarak yapılır. İdentifikasyonda karbonhidrat fermentasyon reaksiyonları temeldir.

Fermente olan karbonhidratlar şunlardır; glukoz, mannoz, galaktoz, fruktoz ve sukroz. Fermente olmayanlar ise; ramnoz, sellobioze, rafinoz, inulin, eritritol, adonitol, m-inositol ve salisin. Mannitol genellikle fermente olur. Arabinoz, maltoz, laktoz ve dekstrin genellikle fermente olmazlar. Ksiloz, trehaloz, gliserol ve sorbitol ile değişken reaksiyonlar oluşur. *P. multocida* kanlı agarda hemoliz oluşturmaz, hareketli değildir ve MacConkey agarda üremez. Bunlar katalaz, oksidaz ve ornitin dekarboksilaz üretirler, fakat ureaz, lisin dekarboksilaz beta-galaktosidaz ya da arjinin dihidroloaz üretmezler. Fosfotaz üretimi çeşitlidir. Nitratlar nitritlere indirgenir; indol ve hidrojen sulfid üretilir ve metil red ve Voges-Proskaver testleri negatiftir.

P. multocida'yı kanatlılardan izole edilen diğer *Pasteurella* türleri ve *Riemerella anatipestifer*'den ayrılımları genellikle Tablo 1'de belirtilen testler kullanılarak yapılabilir (*Pastörella anatipestifer* son zamanlarda *Riemerella anatipestifer* olarak tekrar klasifiye edilmiştir). Laboratuvar tecrübeleri *P. multocida*'nın koloni morfolojisi ve Gram boyama ile en kolaylıkla identifiye edildiğini göstermiştir. Indole ve ornithine decarboxylase pozitif reaksiyonları identifikasyonda ayırt edici biyokimyasal testlerdir.

Tablo 1. *Pasteurella multocida*'yı diğer kanatlı *Pasteurella* türlerinde ve *Riemerella anatipestifer*'den ayırmada kullanılan testler

Test*	<i>Pasteurella</i>			
	<i>multocida</i>	<i>haemolytica</i>	<i>gallinarum</i>	<i>R. anatipestifer</i>
Kanlı agarda hemoliz	-	+	-	d
MacConkey agarda üreme	-	+ r	-	-
Indole üretimi	+	-	-	-
Gelatin sıvılaştırılması	-	-	-	+r

Catalase üretimi	+	+r	+	+
Urease üretimi	-	-	-	d
Glucose fermentasyonu	+	+	+	-
Lactose fermentasyonu	-r	+r	-	-
Sucrose fermentasyonu	+	+	+	-
Maltose fermentasyonu	-r	-	+	-
Ornithine decarboxylase	+	-	-	-

*Test reaksiyonu sonuçları

(-) = reaksiyon yok, (+) = reaksiyon var, d= değişken reaksiyonlar, (-r)= genellikle reaksiyon yok
(+r) = genellikle bir reaksiyon var

7.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

Boyama ve biyokimyasal test sonucuna göre değerlendirilir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008), Fowl Cholera, Bölüm 2.3.9.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

Gram Boyama

Gerekli Solüsyonlar

- % 5 Crystal violet (jansiyana moru)
- Lugol solüsyonu (iodine 1 g, potassium iodide 2 g, distile su 100 ml)
- Absolut alkol ya da aseton
- 1:10 carbol fuchsin

Crystal Violet (Jansiyana Moru) Boyası

□ Stok Solusyon (%5)

Jansiyana moru	5 g
Alkol (%95)	100 ml

Bir havana konulan Jansiyana moruna azar azar alkol ilave edilerek ezilir ve erimesi sağlanır. Buradan bir şişeye alınıp, ara sıra çalkalanarak 24 saat bekletildikten sonra filtre kağıdından süzülür. Etiketlenir. Bir yıl süre ile saklanabilir.

□ Kullanma Solusyonu (%0.5)

Jansiyana moru	5 g
Distile su (%1 fenol'lü)	100 ml

Lugol Solusyonu

İodine	1 g
Potassium iodide	2 g
Distile su	200 ml

Iodine ve Potassium iodide bir havanda azar azar distile su ilave edilerek ezilir. Kapaklı bir şişeye konular, gerekirse erimesi için sıcak benmaride çalkalanarak bir süre tutulur. Etiketlenir. Altı ay süre ile saklanabilir.

Fuksin Boyası

□ Konsantre Karbol Fuksin (Ziehl-Neelsen da kullanılan fuksin)

Bazik fuksin	1 g
Alkol (%95)	10 ml
Distile su (%5 fenol'lü)	100 ml

Bazik fuksin havanda alkol ile ezildikten sonra fenollü suyun bir kısmı ilave edilerek karıştırıldıktan sonra kalan su ile havan çalkalanarak şişeye ilave edilir. Etiketlenir. Bir yıl süre ile saklanabilir.

□ Sulandırılmış (1/10 dilue) Karbol Fuksin (Gram ve Modifiye Ziehl-Neelsen da kullanılan fuksin)

Konsantre karbol fuksin	10 ml
Distile su	100 ml

Boyama Metodu

- Preparat hazırlanır, kurutulur ve tesbit edilir.
- Crystal violet solüsyonu ile 2-3 dk. boyanır.
- Boya dökülür ve preparat üzerine lugol solüsyonu konarak 1-2 dk. beklenir. Lugol solüsyonu dökülür.
- Absolut alkolde dekolore edilir (preparatın üzerine %96'lık etil alkol dökülerek sağa sola eğip

doğrultmak suretiyle yıkanır ve bu şekilde alkol 2-3 defa değiştirilerek preparattan mor renk akmayıncaya kadar işlem sürdürülür).

-Su ile yıkanır.

-Sulu fuksin ile 30 saniye boyanır.

-Su ile yıkanır, kurutulur ve incelenir.

Sonuç :

Gram pozitif mikroorganizmalar mor

Gram negatif mikroorganizmalar pembe

Giemsa Boyama

Gerekli Solüsyonlar

- ☐ Giemsa boyası (%10'luk)
- ☐ Giemsa boyasının hazırlanışı: Her 1ml distile suya 1 damla Giemsa solüsyonundan damlatılır. Taze hazırlanır.

Boyama Metodu :

- Preperat hazırlanır ve metanol veya ısı ile tesbit edilir.
- Üzerine giemsa boyası damlatılır ve 45 dk. boyanır.
- Su ile yıkanır.
- Kurutulur ve mikroskopta incelenir.

Kanlı agar

Ticari kanlı agar besiyeri istenilen miktarda tartılarak distile su içerisinde eritilir, otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir. Sterilizasyon işleminden sonra su banyosunda bekletilerek 45-50°C'ye kadar soğutulur. İçerisine %5.0 (v/v) oranında, steril şartlarda alınmış ve steril cam boncuklu şişede defibrine edilmiş koyun kanı ilave edilir, karıştırılır ve steril petri kutularına dağıtılır. Bakterilerin oluşturdukları koloni özelliklerinin yanı sıra, hemolitik bakterileri hemolitik olmayanlardan ayırt etmek ve oluşturdukları hemolizin tipini incelemek amacıyla kullanılır. Hemolizinler, bazı bakteriler tarafından oluşturulan ve eritrositleri parçalayan enzimlerdir. b-hemoliz yapan bakteriler eritrositlerin tamamen parçalanmasına yol açarak koloni etrafında renksiz veya açık sarı renkli bir halka oluştururlar. Bazıları ise hemoglobini methemoglobine dönüştürür ve koloni etrafında yeşil renkli bir halka oluştururlar. Bu tür hemoliz a-hemoliz (veya inkomplet hemoliz) olarak tanımlanır. Hemoliz oluşturmeyen bakterilere ise non-hemolitik bakteriler denir.

Üreaz testi

Üreaz, ürenin hidrolizini katalizleyen enzimdir. Üreaz testi bakterilerin üreaz aktivitesini araştırmak için yapılır ve bu amaçla indikatör olarak fenol kırmızısı içeren Christensen üre besiyeri kullanılır. Ürenin hidrolizi sonucu ortaya çıkan amonyak alkali bir üründür ve besiyerinin rengini kırmızıya dönüştürür.

Jelatinaz testi

Jelatinaz testi, bakterilerin jelatinaz aktivitesini araştırmak amacıyla yapılır. Jelatin soğukta jel halindedir, sıcakta ise çözünür. Hidrolize olduğunda soğukta da jel haline gelmez ve sıvı halde kalır. Jelatin içeren besiyerine ekim yapıldıktan sonra tüpler 37°C'de inkübe edilir (inkübasyon süresi 30 güne kadar uzayabilir). İnkübasyondan sonra tüpler 30 dakika buzdolabında bekletilir. Besiyerinin jel haline gelmeyip sıvı halde kalması testin pozitif olduğunu gösterir.

MacConkey agar

Ticari MacConkey agar besiyeri istenilen miktarda tartılarak distile su içerisinde eritilir, otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir. Sterilizasyon işleminden sonra su banyosunda bekletilerek 45-50°C'ye kadar soğutulur ve steril petri kutularına dağıtılır.

Gram negatif bakterilerin üretilmesi ve laktozu parçalayanların, parçalamayanlardan ayrılması amacıyla kullanılır. Besiyerinin içerisinde laktoz, safra tuzları, kristal viyole ve indikatör olarak nötral kırmızısı bulunur. Laktozu parçalayan bakteriler pembe ve kırmızı, parçalamayanlar ise renksiz koloniler oluşturur.

Karbonhidrat (şeker) fermentasyonu

Birçok bakteri karbonhidratları parçalayarak asid ürünler oluşturken, bazıları hem asid ürünler hemde gazoluştururlar. Bu özellikleri incelemek amacıyla içerisinde substrat olarak bir karbonhidrat, pH indikatörü ve gaz oluşumunu göstermek için ters duran "Durham tüpü" bulunan karbonhidrat fermentasyon besiyerleri kullanılır.

Saf kültüründen bir öze dolusu koloni materyali, bakteri için uygun olan ve içerisinde sadece karbonhidrat bulunan besiyerine ekilir. Bakterinin üreyebilmesi için özel besiyeri gereksinimi yok ise genel sıvı besiyerine ekim yapılır. Bakteri türüne uygun sıcaklıkta uygun süre inkübe edilir.

Bazal mediumun hazırlanışı:

□ Pepton	5.0 g
□ Brom-Timol Mavisi	0.001 g
□ Distile Su	1 lt
□ Denenecek şeker	1.0 g

(Denenecek şeker: Arabinoz,dekstroz,ksiloz, sukroz, laktoz, maltoz, mannoz, glikoz,mellibiyoz, rafinoz, ramnoz,sellobiyoz, trehaloz... olabilir)

Bu besiyerine şeker ilavesinden sonra Durham tüpü ters çevrilerek havası alınmalı ve tindalizasyon ile sterilize edilmelidir.

Değerlendirme: 24-48 saatlik inkubasyon sonunda oluşan sarı renk ortamdaki şekerin fermentasyonu sonucunda asit oluştuğunu ve pozitif test sonucunu işaret eder.

İndol testi

İndol, triptofan'ın triptofanaz enzimi ile parçalanması sonucu oluşan nitrojenli bir bileşiktir ve aldehidlerle reaksiyona girdiğinde kırmızı renkli bir ürün oluşturur. İncelenecek bakteri triptofan içeren bir sıvı besiyerine inoküle edilir (bu amaçla genellikle peptonlu su veya buyyon kullanılır). En az 24 saatlik inkübasyondan sonra üzerine, tüpün kenarından yavaşça akıtılmak suretiyle, 0.5 ml Kovaks ayırıcı ilave edilir.

Lizin Dekarboksilaz Testi

Şüpheli koloniden Lysine Iron agara ekim yapılır. 37°C'de 24 (±3) saat inkübe edilir. Mor renk oluşumu pozitif reaksiyon olarak, sarı renk negatif reaksiyon değerlendirilir.

Ornitin dekarboksilaz testi

Ornitin içeren dekarboksilaz besiyerine şüpheli koloni ile inokule edilerek 37°C'de 3-4 gün inkübe edilir. Besiyerinin renginin koyulaşması pozitif, açılması negatif olarak değerlendirilir.

Katalaz testi

Katalaz, hidrojen peroksit (H_2O_2)'i parçalayarak su ve oksijene dönüştüren enzimdir. Bakterilerde katalaz aktivitesini araştırmak için, şüpheli bakteri kolonisinden alınan bir parça, temiz bir lam üzerinde bir damla fizyolojik tuzlu su içerisinde süspanse edilir ve üzerine 1-2 damla %3'lük H_2O_2 damlatılır. Oksijen kabarcıklarının oluşması testin pozitif olduğunu gösterir. Eritrositlerde de katalaz enzimi bulunduğundan dolayı, test edilecek bakteri kan içermeyen bir besiyerinden alınmalıdır.

PASTEURELLA MULTOCIDA’NIN AGAR JEL İMMUNODİFFÜZYON TEST İLE SOMATİK SEROTİPLENDİRİLMESİ

1. AMAÇ

Kanatlı kolerası enfeksiyonunda *Pasteurella multocida*’nın antijenik karakterizasyonunu belirlemek için somatik serotiplendirilmesi amaçlanmıştır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test, Kanatlıların *Pasteurella* enfeksiyonunda *P. multocida*’nın antijenik karakterizasyonunu belirlemek için uygun teşhis reagentleri bulunduran özel donanımlı laboratuvarlarda uygulanır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

PBS: Phosphate Buffered Saline

AGID: Agar Jel İmmuno Diffüzyon

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Kanatlı kolerası enfeksiyonunda *P. multocida*’nın antijenik karakterizasyonunu belirlemek için Somatik serotiplerin agar jel immunodiffüzyon (AGID) testi ile tespit edilmesidir. Somatik bir serotip, test antijen ile karşısında yer alan 16 serotip-spesifik antiserumdan herhangi biri ile arasında presipitasyon çizgisi oluşturmasıyla ortaya konulur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

- ☐ Serotip- Spesifik Tavuk Serumı
- ☐ Kültürden Hazırlanan Test Antijeni

7.2. Kullanılan ekipman;

- ☐ Etüv
- ☐ Benmari
- ☐ Santrifüj
- ☐ ClassII mikrobiyolojik güvenlik kabini
- ☐ Mikroskop
- ☐ Standart Mikroskop Lamı
- ☐ Agar delici

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ Formalin % 0.3
- ☐ Sodyum Klorür
- ☐ Noble Agar

7.4. Kullanılan Besiyerleri

- ☐ Dextrose Starch Agara
- ☐ Phosphate Buffered Saline (PBS)
- ☐ Noble Agar

7.5. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

P. multocida'nın antijenik karakterizasyonu, kapsuler serogruplanması ve somatik serotiplendirilmesi ile yapılır. Kapsüllü serogruplar pasif hemaglutinasyon testi ile ortaya konulur. Serogrup A, B, D, E ve F rapor edilmiştir, serogrup E'nin dışındakilerin tümü avian konakçılardan izole edilmişlerdir. Son zamanlarda spesifik muccopolysaccharidase'ları Serogrup A, D ve F'den ayıran non-serolojik disk diffüzyon testi geliştirilmiştir.

Somatik serotipler genellikle agar jel immunodiffüzyon (AGID) testi ile tespit edilirler. Serotip 1-16 rapor edilmiştir; serotype 8 ve 13 dışındaki tüm serotipler avian konakçılardan izole edilmiştir. Gerek serogrup ve gerekse serotipin belirlenmesinde en etkilisi karakterizasyona dayandırılarak yapılandır.

Bunları belirlemek için uygun teşhis reagentleri bulunduran özel donanımlı laboratuvarlar gerekmektedir.

Agar Jel İmmuno Diffüzyon Test Prosedürü

- ☐ Dextrose starch agara yoğun şekilde *P. multocida* ekilir ve pleyt 18-24 saat inkübe edilir.
- ☐ Agar yüzeyindeki üreme sıyrılarak alınır ve % 0.3 formalin ihtiva eden 2.5 ml phosphate buffered saline (PBS) içerisinde çözündürülür.
- ☐ Bakteriye hücre süspansiyonu su banyosunda 100°C de 1 saat boyunca ısıtılır.
- ☐ 13300 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir.
- ☐ Hücreler uzaklaştırılır ve supernatant sıvı test antijeni olarak kullanılır.
- ☐ % 0.9 konsantrasyonunda Noble agar %8.5 sodyum chlorid solusyonuna katılır, ısı ile eritilir, her lam için 4 ml miktarında agar kullanılarak standart mikroskop lamı üzerine dökülür.
- ☐ Noble agar üzerinde 3 mm çapında ve 3 mm uzaklığında çukurlar açılır.
- ☐ Çukurlar test antijeni ile ve karşılarındaki çukurlar serotip- spesifik tavuk serumu ile doldurulur. Lamalar 37°C'de 48 saat inkübe edilir.
- ☐ Somatik bir serotip, test antijen çukuru ile karşısında yer alan 16 serotip- spesifik antiserumdan herhangi biri ile arasında presipitasyon çizgisi oluşturmasıyla ortaya konulur.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008), Fowl Cholera, Bölüm 2.3.9.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

İNFEKSİYÖZ KORİZA (INFECTIOUS CORYZA)'NIN İZOLASYON ve İDENTİFİKASYONU

1. AMAÇ

Bu test, *Avibacterium paragallinarum* (AP)'den ileri gelen İnfeksiyöz Koriza vakalarında kanatlı hayvanlara ait şüpheli doku, swap örneği vb materyallerden *A. paragallinarum* (AP)'nin bakteriyolojik izolasyon ve identifikasyonu ile teşhisi amacıyla yapılır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu *A. paragallinarum* (AP)'nin bakteriyolojik izolasyon ve identifikasyonu ve PCR için alt yapısı bulunan bütün Teşhis Laboratuvarlarında uygulanır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların infeksiyonuna yol açma riski nedeni ile infeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

İK: İnfeksiyöz Koriza

AP: *Avibacterium paragallinarum*

X faktör: Hemin

V faktör: Nicotinamide adenin dinucleotid (NAD)

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Laboratuvara gelen infeksiyöz koriza semptomları (tek taraflı infraorbital sinusitis, solunum güçlüğü burun ve göz akıntısı vb.) gözlenen tavuklara ait infraorbital sinus ve trahea boşluğundan alınan swaplardan % 5-10 lize at kanı içeren At kanlı çikolata agara ekimler yapılır ve % 5-10 CO₂'li ortamda 24-48 saat süreyle 37°C de inkübasyona bırakılır. *A. paragallinarum* şüpheli küçük, parlak gri renkli kolonilerden etken identifikasyonu yapılır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Laboratuvara gelen infeksiyöz koriza semptomları (tek taraflı infraorbital sinusitis, solunum güçlüğü burun ve göz akıntısı vb.) gözlenen tavukların göz altındaki deri ısıtılmış bir spatül ile dağlanır ve steril bir makas ile sinüs içine doğru kesilir. Steril bir swap çubuğu ile sinüs içeriğine ait örnek alınır. Ayrıca tracheadan da swap örnekleri alınarak uygun besi yerlerine ekimler yapılır.

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Lam
- ☐ Steril bıçak, pens, spatül, öze v.b. malzemeler
- ☐ Otomatik pipet ve steril pipet ucu
- ☐ Standart laboratuvar cam malzemesi
- ☐ Mikroskop
- ☐ pH metre
- ☐ Vorteks
- ☐ Santrifüj
- ☐ Pipetör
- ☐ Eldiven- Maske
- ☐ İnkubatör (37°C'lik)

7.3. Numunenin Hazırlanması ve analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

Bakteriyoskopi:

AP Gram negatif ve hareketsiz olup, sinüs eksudatından hazırlanan preparatlarda bipolar görünebilirler. 48 saatlik katı ve sıvı kültürden yapılan boyamalarda kısa çomaklar veya kokobasil şeklinde bazen filamentöz formda görülür.

Bakteriyolojik İzolasyon

AP üremesi için V faktörüne ihtiyaç duyar (Başlangıçta hem X hem de V faktörüne ihtiyacı olduğu düşünülmüştür). AP izolasyonu için %5-10 lize at kanı içeren çikolata agar, V faktörü üreten *S. aureus* veya *S. epidermidis* ekilmiş kanlı agar, ya da suplementi bulunan ticari besiyerleri kullanılabilir. Ancak çikolata agar AP izolasyonunda en başarılı besiyeridir. Bazı AP türleri için besiyerine %1 tavuk serumu da ilave etmek gerekir.

AP fakültatif anaerobik olduğu için rutin izolasyonda CO₂ kullanmak gerekir. Ekim yapılan besiyeri % 5-10 CO₂'li ortamda 37-38 °C'de 3-4 gün inkube edilmelidir. İnkubasyon sonunda küçük parlak gri renkli koloniler meydana gelir.

Bakteriyolojik İdentifikasyon

Biyokimyasal testler

Biyokimyasal testleri yapmak için ticari olarak temin edilebilen NAD (NADH; 1.56-25 ug/ml

medium) ve %1 tavuk serumu ilave edilmiş Test Medium Broth (TMB) ve Test Medium Agar (TMA) kullanılabileceği gibi NAD (NADH; 1.56-25 ug/ml medium) ve % 1 tavuk serumu ilave edilmiş Fenol red broth base veya agarı da kullanılabilir. *A. paragallinarum*'un biyokimyasal özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

A. paragallinarum'un biyokimyasal özellikleri (Tablo 1)

Biyokimyasal Testler	<i>A. paragallinarum</i>
X faktör ihtiyacı	-
V faktör ihtiyacı	+
Katalaz	-
Oksidaz	-
Üremeyi indükleyen CO ₂ ihtiyacı	+
Hemoliz	-
İndol	-
Ürease	-
Nitrat	+
Glukoz	+
Maltoz	+
Mannitol	+
Sorbitol	D
Sakaroz	D
Trehaloz	-

7.4. Sonuçların Değerlendirilmesi

Besiyerinde üreme özellikleri ve biyokimyasal testlere göre değerlendirilir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- Quinn P. J., Carter M. E., Markey B., and Carter G. R.(1994) Clinical Veterinary Microbiology chapter 12 Wolf Publishing in Spain
- Blackall, P.J. & Matsumoto, M. (2003). Infectious coryza. In Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald & D.E. Swayne (Eds.), Diseases of Poultry, 11th edn (pp. 691-703). Ames:Iowa State University Press.
- Blackall, P.J. (1999). Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. Clinical Microbiology Reviews , 12, 627-632.

9.REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

İNFEKSİYÖZ KORİZA (INFECTIOUS CORYZA)’NIN PCR İLE TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Bu test, *Avibacterium paragallinarum* (AP)’den ileri gelen İnfeksiyöz Koriza vakalarında kanatlı hayvanlara ait şüpheli doku, svap örneği vb materyallerden ve bakteri kültürlerinden *A. paragallinarum* (AP)’nin PCR ile teşhisi amacıyla yapılır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu *A. paragallinarum* (AP)’nin PCR için alt yapısı bulunan bütün Teşhis Laboratuvarlarında uygulanır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların infeksiyonuna yol açma riski nedeni ile infeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

İK: İnfeksiyöz Koriza

AP: *Avibacterium paragallinarum*

X faktör: Hemin

V faktör: Nicotinamide adenin dinucleotid (NAD)

PCR: Polymerase Chain Reaction

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

PCR metodu klasik izolasyon ve identifikasyon metoduna alternatif olarak veya izolasyon sonrası identifikasyonun tamamlayıcısı olarak, infeksiyöz koriza semptomları gözlenen tavuklara ait

infraorbital sinus ve trahea boşluğundan alınan swaplardan ya da bakteriye ait kültürden AP' ye ait spesifik DNA'nın belirlenmesi esasına dayanır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

PCR için de *A. paragallinarum*'dan şüpheli kanatlı dokuları, infraorbital sinus ve tracheadan alınan swap örnekleri veya *A. paragallinarum* kültürleri.

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Analitik terazi (50-0.1 mg hassasiyette)
- ☐ Otomatik pipet ve steril pipet ucu (çeşitli hacimlerde)
- ☐ Buzdolabı
- ☐ Derin dondurucu (-20°C, -70°C)
- ☐ Mikrodalga fırın
- ☐ Biyogüvenlik Kabini
- ☐ Steril pens, spatül, bistüri v.b. malzemeler
- ☐ Vorteks
- ☐ Mikrosantrifüj
- ☐ Benmari veya kuru blok ısıtıcı
- ☐ Pastör pipeti
- ☐ Mikrosantrifüj tüpü,
- ☐ PCR tüpü
- ☐ Thermocycler
- ☐ Elektroforez sistem
- ☐ Güç kaynağı
- ☐ UV transillüminatör veya Jel Görüntüleme sistemi

7.3. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

Sıvı örneklerinden DNA izolasyonu

Laboratuvara gelen infeksiyöz koriza semptomları (tek taraflı infraorbital sinusitis, solunum güçlüğü burun ve göz akıntısı vb.) gözlenen tavukların göz altındaki deri ısıtılmış bir spatül ile dağlanır ve steril bir makas ile sinüs içine doğru kesilir. Steril bir swap çubuğu ile sinüs içeriğine ait örnek alınır. Ayrıca tracheadan da swap örnekleri alınarak 1ml PBS içine konur ve bir vorteks yardımı ile 2-3 dk iyice karıştırılır. Sıvı örnekleri çıkarılarak tüpte kalan sıvı ekstraksiyon için kullanılır. Kalan süspansiyon varsa kan hücrelerini çöktürmek için 2000 rpmde 3-5 dk santrifüj

edilir ve üst sıvı başka bir tüpe alınır. Süspansiyon 4°C'de 13 000 rpm de 15 dk santrifüj edilir. Süpernatant bir pastör pipeti ile dikkatlice alınıp atılır. Sediment DNA ekstraksiyonu için kullanılır. Pelet % 0.5 Nonidet p-40, % 0.5 Tween 20 ve 200 µl/ml proteinase K içeren 10-20 µl PCR buffer içinde yeniden süspanse edilir. Süspansiyon 56°C'de 1 saat inkube edilir. Daha sonra proteinase K'yı inaktive etmek için örnek 98°C'de 10 dk ve buz içinde 10 dk tutularak işlem tamamlanır. Elde edilen süspansiyon PCR'da kullanılır.

Yukarıda belirtildiği şekilde elde edilen pelet Ticari kitte belirtilen Gram negatif bakteri hücre lizatı kabul edilerek, bu bölümde belirtildiği şekilde DNA izolasyonuna gidilir.

Bakteri kültürden DNA İzolasyonu

Bu amaçla şüpheli örneklerden izole edilen AP kültürleri ile standart kontrol olarak kullanılan AP (Örn: *A. paragallinarum* 083 suşu) bakteri kültüründen 2-3 adet bakteri kolonisi alınarak 10-20 µl PCR çalışmalarına uygun distile su içinde süspanse edilir. Örnekler 98°C'de 10 dk kaynatılır ve 10 dk. buzda bekletilir. Elde edilen süspansiyon DNA örneği olarak PCR' da kullanılır.

Ticari kitin Gram negatif bakteri hücre lizatı için belirttiği yöntem kullanılarak da DNA izolasyonu yapılabilir. İzolasyon sırasında oluşabilecek hataların tespit edilebilmesi için her DNA izolasyonu sırasında standart pozitif örnekten (+ kontrol) ve PCR grade sudan (- kontrol) izolasyon yapılmalıdır.

Testin (HP-2 PCR) Yapılışı

Kullanılan Primerler (Chen ve ark 1998)

N1 5'-TGAGGGTAGTCTTGACGCGAAT-3',

R1 5'-CAGGGTATCGATCGTCTCTCTACT-3',

Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Reaksiyon karışımı ayrı temiz bir bölgede ve yalnız bu iş için kullanılan pipetlerle hazırlanır. 50 µl'lik PCR reaksiyonu için karışım aşağıdakilerden oluşur:

Reagent'ler	Miktarları
Ultra saf su (PCR grade)	31.75 µl
10 X PCR buffer (without MgCl ₂)	5.00 µl
dNTP karışımı (10 mM)	1.00 µl
MgCl ₂ (25 mM)	5.00 µl
Tag DNA polymerase(5 U/µl)	0.25 µl
primer N1 (20 pikomol/µl)	1.00 µl
primer R1 (20 pikomol/µl)	1.00 µl
Reagent'ler Toplamı	45.00 µl
Template (DNA)	5.00 µl

Her bir PCR tüpüne 45 µl (bir örnek için) reaksiyon karışımı konur. Tüpler diğer temiz bir bölgeye alınır ve her bir tüpe 5'şer µl DNA örneğinden ilave edilir. Her çalışmada 1adet pozitif ekstraksiyon kontrolü, 1 adet pozitif RNA reaksiyon kontrolü ve 1 adet negatif (su) ekstraksiyon kontrolü, 1 adet negatif reaksiyon kontrolü ile birlikte çalışılmalıdır.

PCR Reaksiyonu

Tüpler thermocycler'a yerleştirilir ve aşağıdaki PCR programına tabi tutulur:

Sıcaklık	Süre	Siklus sayısı
98°C	2,5 dakika	1 siklus
94°C	1 dakika	25 siklus
65°C	1 dakika	
72°C	72 dakika	
94°C	1 dakika	1 siklus
65°C	1 dakika	1 siklus
72°C	10 dakika	1 siklus

7.4. Elektroforez- Görüntüleme

Bu aşama diğer tüm aşamalardan ayrı bir oda veya bölmede yapılmalıdır.

Agaroz jel, 1x TBE buffer içinde %1 agaroz eritilerek hazırlanır. Erimiş jele final konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür ilave edilir ve kalıba dökülür. Jel, donmasını takiben running buffer olarak 1x TBE buffer içeren elektroforez tankına yerleştirilir. PCR ürünleri (5-10 µl), %20 oranında 6x loading buffer (2 µl) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenir. Ayrıca uygun moleküler marker (100 bp)'da yüklenir. 100 V'de 45 dk süreyle süre ile DNA ürünlerinin göçü sağlanır ve oluşan bantlar jel görüntüleme sistemi yardımı ile görüntülenir.

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

Oluşan PCR ürünlerinin büyüklüğü yaklaşık 500 bp olarak belirlenir. Sonuçların geçerli olabilmesi için pozitif kontrolle pozitif, negatif kontrolle negatif sonuç alınmalıdır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- Chen, X., Miflin, J. K., Zhanq, P. and Blackall, P. J. 1996. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis . 40: 398–407.
- Quinn P. J., Carter M. E., Markey B., and Carter G. R.(1994) Clinical Veterinary Microbiology chapter 12 Wolf Publishing in Spain
- Blackall, P.J. & Matsumoto, M. (2003). Infectious coryza. In Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald & D.E. Swayne (Eds.), Diseases of Poultry, 11th edn (pp. 691-703). Ames:Iowa State University Press.
- Blackall, P.J. (1999). Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. Clinical Microbiology Reviews , 12, 627-632.

9.REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

İNFEKSİYÖZ KORİZA (INFECTIOUS CORYZA)'NIN HEMAGLUTİNASYON-İNHİBİSYON (HI) TESTİ İLE TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Bu prosedür Laboratuvar'a gelen İnfeksiyöz koriza şüpheli tavuk kan serumlarında hastalığın etkeni olan *Avibacterium paragallinarum*'a karşı oluşmuş antikorların varlığını Hemaglutinasyon İnhibisyon testi ile ortaya koymak amacıyla kullanılır.

2. UYGULAMA ALANI

A. paragallinarum'a karşı oluşmuş antikorların varlığını ortaya koymak amacıyla kullanılır.

Bu test metodu tüm Teşhis Laboratuvarları'nda geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların infeksiyonuna yol açma riski nedeni ile infeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual", esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

İK: İnfeksiyöz Koriza

AP: *Avibacterium paragallinarum*

A. paragallinarum serotip A

A. paragallinarum serotip B

A. paragallinarum serotip C

HA: Hemaglutinasyon

HI: Hemaglutinasyon İnhibisyon

HAU: Hemaglutinasyon Ünitesi

GA: Glutaraldehit

PBS: Phosphate Buffered Saline

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Laboratuvara gelen tavuk kan serumlarından *A. paragallinarum*'a karşı oluşmuş antikorların varlığını ortaya koymak için uygulanan hemaglutinasyon inhibisyon testini içerir.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Tavuk kan serumu: Serolojik muayeneler için, test materyali sürüyü örnekleyecek miktarda alınan kanların pıhtılaştırıldıktan sonra çizilerek elde edilen kan serumlarıdır. Hemolizli, kontamine vb. serumlar test için kullanılmaz. Teste başlamadan önce serumlar oda sıcaklığına getirilmeli ve otoaglutinasyon verip vermedikleri kontrol edilmelidir. Serumlar hemen test edilmeyecekse +4°C'de 3 gün süreyle -20°C'de yıllarca saklanabilir.

Pozitif ve Negatif Kontrol Serumları:

Ticari olarak temin edilen AP A, B ve C serotipine karşı antikor titresi bilinen antiserumlar.

Ticari olarak temin edilen SPF sürülerden elde edilmiş AP' ye karşı antikor içermeyen negatif kontrol.

Standart Antijen:

Antijen olarak AP serotip A (0083), serotip B (80222) ve serotip C (Modesto) standart suşları kullanılır. Bu amaçla suşlar %7 lize edilmiş at kanlı columbia agara ekilerek ve % 5-10 CO₂'li ortamda 24-48 saat süreyle 37°C'de inkübasyona bırakılır. Üreyen koloniler PBS (pH 7.2) ile toplanarak KSCN-tuzlu su solusyonu ile 650 nm'de 1.6 optik dansiteye ayarlanarak süspanse edilir. Süspanسیون 2 saat süreyle belli aralıklarla karıştırılarak +4°C'de tutulur ve sonike edilir (30s, %60 pulsed output). Antijenler thiomersal içeren PBS ile 3 kez yıkanır. PBS ile süspanse edilerek +4°C'de saklanır (Eaves ve ark. 1989).

GA ile Tespit Edilmiş Tavuk Eritrositinin Hazırlanması (Eaves ve ark. 1989)

Alsever solusyonu ile usulüne uygun olarak alınan tavuk kan serumu 0.15 M NaCl solusyonu ile 3 kez yıkanır. %1 GA içeren solusyon içinde %1-2'lik eritrosit süspanسیونu hazırlanır. Bu süspanسیون 30 dk +4°C'de karıştırılarak inkube edilir. İnkübasyon sonrası tespit edilen eritrosit hücreleri 400g'de santrifüj edilerek toplanır ve 5 kez 0.15 M NaCl solusyonu ile 5 kez de distile su ile yıkanır. Daha sonra eritrositler distile su içinde % 30'luk süspanسیون haline getirilerek 4°C'de saklanır.

İzotonik Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7.2)

Alsever Solüsyonu :

100 ml solüsyon hazırlanırken aşağıdaki belirtilen basmaklar izlenir:

Sitrik asit: 0.055 gr

Sodyum sitrat 0.8 gr

D-Glucose: 10.25 gr

NaCl: 2.10 gr

Distile su: 100 ml

Bu formüle göre 100 ml distile su içerisinde tüm reagentler çözündürülüp, hazırlanır ve şişelere taksim edilir. Ardından 116°C'de 10 dakika otoklavda sterilize edilir. Sterilite kontrolü açısından 37°C'de bir gece inkübe edildikten sonra +4°C'de saklanır.

7.2.Ekipmanlar

- ☐ 96 gözlü V tabanlı mikropleyt,
- ☐ 25-100 µl otomatik mikropipetler ve uçları,
- ☐ Pipet ve şarjlı pipettor
- ☐ Değişik ölçülerde vidalı kapaklı şişeler
- ☐ Santrifüj
- ☐ Enjektör
- ☐ Santrifüj tüpü
- ☐ Buzdolabı
- ☐ Laboratuvar saati

7.3. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

Reagentlar kullanılmadan önce ısıları oda sıcaklığına (20-27°C) ulaşmaya kadar beklenmelidir.

Çalışma Antijeninin HA titresinin belirlenmesi (Eaves ve ark. 1989).

HI testinde kullanılacak antijen solüsyonunun hazırlanabilmesi için öncelikle antijenin hemaglutinasyon (HA) titresinin belirlenmesi gerekmektedir. Test antijeninin hazırlanmasında aşağıdaki basamaklar takip edilir:

1. Test için PBS (pH 7.2) ile 1/10 dilisyonu yapılmış antijen kullanılır.
2. V veya U tabanlı mikropleyt in bir sırasının bütün gözlerine 50 şer µl BSA (%0.1 w/v) ve jelatin (% 0.001 w/v) içeren 0.15 M NaCl konur.
3. Sıranın ilk gözüne antijenden eşit miktarda konur ve 2 katlı dilusyonu yapılır.
4. Bütün gözlerle 50 µl %1-2'lik GA ile tespit edilmiş tavuk eritrositinden ilave edilir.
5. Pleyt oda sıcaklığında 60 dk inkube edilir. Eritrosit kontrol gözündeki düğme şeklinde

eritrositlerin çöktüğünden emin olmak gerekir.

6. Eritrositlerin tamamının aglutine olduğu gözlerden en yüksek dilusyon Hemaglutinasyon titresini verir.
7. HI için istenen 4 HAU hesaplamak için HA titresini 4'e bölünür. Çıkan sonuç bize antijeni ne kadar sulandıracağımızı gösterir.
8. HI testinde kullanmak üzere antijen 4HAU oranında PBS ile sulandırılır.
9. Sulandırılan antijen için yukarıdaki basamaklar tekrar uygulanır. Bu sefer 6. göze kadar çalışılır. Sonuçta 4. göze kadar HA görülmesi beklenir. Sonuç istenildiği gibi olmazsa antijen yeniden sulandırılarak 4HAU elde edinceye kadar yukarıdaki basamaklar tekrarlanır. Sonuç alındığı takdirde istenilen oranda 4HAU oranında sulandırılan antijen HI testinde kullanılır.

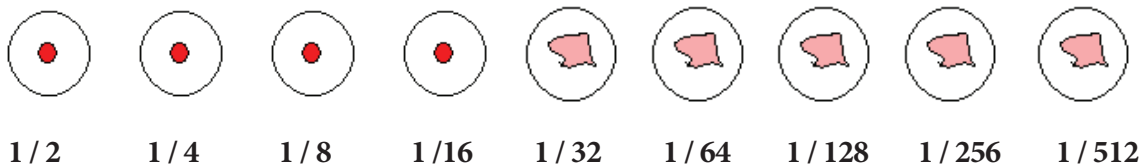
HI testinin yapılışı

HI testi için %0.1 Bovine serum albumin ve %0.0001 jelatin içeren PBS(pH 7.2) solusyonu kullanılır

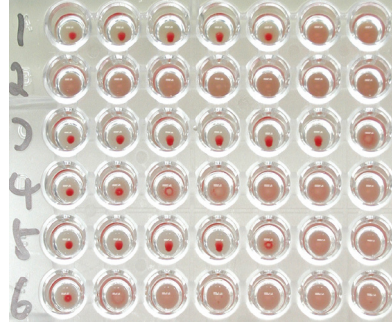
1. Test edilecek serum örnekleri ve pozitif ve negatif kontrol serumları jelatin ve BSA içeren PBS içinde 1/100 olarak sulandırılır.
2. Her sıranın ilk gözüne 1/100 sulandırılmış serumdan 100 µl konur.
3. Diğer gözlerle 50 µl PBS(jelatin ve BSA içeren) konur.
4. Bütün gözlerle 50 µl antijenden (Serotip A, Serotip B ve Serotip C antijenlerinden biri)ilave edilir.
5. Oda sıcaklığında 20 dk inkubasyona bırakılır.
6. Bütün gözlerle 50 µl gulutaraldahit ile tespit edilmiş %0.5'lik yıkanmış tavuk eritrositi suspansiyonundan ilave edilir. Oda sıcaklığında 20-30 dk bekledikten sonra sonuçlar değerlendirilir.
7. HA' un tam olarak inhibe edildiği dilusyon HI titresini olarak belirlenir.
8. Test sonunda $\leq 1/2$ negatif, $1/4$ şüpheli, $\geq 1/8$ pozitif, kabul edilir.

İnhibisyon (düğme formasyonu) olan gözler = Pozitif

İnhibisyon (düğme formasyonu) olmayan, dantela tarzında kalan gözler = Negatif olarak ifade edilir.



Şema 1 : HI (+) Test Sonucu Şematik Görüntü



HI (+)

HI (-)

HI (+)

HI (-)

HI (+)

HI (-)

Şema 2 : HI (+) ve HI (-) pleyt görünümü

Pozitiflik aşından ya da enfeksiyondan kaynaklanabilir. Aşısız sürülerde antikorun varlığı her zaman aktif bir enfeksiyonu göstermez. Ancak pozitif çıkan hayvanın daha önce AP ile karşılaştığını gösterir. Anamnez bilgilerine bakılarak pozitifliklerin aşı veya enfeksiyon kaynaklı olduğunu belirlemek her zaman mümkün olmamaktadır. Bu nedenle elde edilen sonuçların sürü ile ilgili kişiler tarafından değerlendirilmesi gerekir.

8.İLGİLİ DÖKÜMANLAR

- Blackall, P.J. & Matsumoto, M. (2003). Infectious coryza. In Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald & D.E. Swayne (Eds.), Diseases of Poultry, 11th edn (pp. 691-703). Ames:Iowa State University Press.
- Blackall, P.J. (1999). Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. Clinical Microbiology Reviews , 12, 627-632
- Eaves, L.E, Rogers, D.G., Blackall, P.J.(1989). Comparison of hemagglutinin and agglutinin scheme for the serological classification of *Haemophilus paragallinarum* and proposal of new hemagglutinin serovar. J. Clin. Microbiol. 27: 1510-1513

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

AVIAN CAMPYLOBACTERIOSIS (KANATLI KAMPİLOBAKTERİYOZİSİ) İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU PROSEDÜRÜ

1. AMAÇ

İnsan gastro-enteritisleri ile ilişkili *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli* türlerinin hayvan dışkılarından ve hayvansal gıdalardan izolasyonu ve identifikasyonu için kullanılan laboratuvar yöntemlerinin açıklanması amaçlanmıştır.

2. UYGULAMA ALANI

Açıklanan teşhis yöntemi, kanatlı hayvanların dışkılarından *C. jejuni* ve *C. coli* varlığını belirlenmeye yönelik hazırlanmıştır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

APW: Alkalın peptonlu su

mCCDA: Modifiye charcoal-sefaperozon-desoxycholate

CSM: Karmali agar; charcoal selektif medium

CAT agar: Sefoperazone, amphotericine, tericoplanin

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Kanatlı Kampilobakteriyozisinin teşhisinde izolasyon ve identifikasyon yönteminin detayları ile moleküler ve serolojik teşhis ile ilgili genel uygulamaları tanımlar.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Bu amaçla kesim aşamasına gelen broiler/hindiler ve iki haftalıktan büyük damızlık ve yumurtacılarından dışkı örnekleri materyal olarak kullanılmalıdır. Bu amaçla svablar, kloakadan ve/veya altlıktaki yeni dışkılarından sürme yöntemi ile alınabilir. Ayrıca direkt olarak sekal içerik, dışkı örneği bir kaba alınarak izolasyon amacıyla kullanılabilir. Kesimhaneden de materyal alınabilir. Bu amaçla sekumdan direkt olarak plastik poşetlere veya steril makasta kesilen sekum içeriği steril svaplarla ve/veya direkt dışkı örneği alınabilir. Alınan materyaller aynı gün içinde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Daha uzun süre sonra laboratuvara ulaştırılacaksa, transport mediumlar kullanılmalıdır ve laboratuvara ulaşınca kadar soğuk zincirde tutulmalıdır. Kültür yapılırca kadar materyaller, ani ısı şokundan sakınılmalıdır. Transport için en uygun ortamlar arasında, Carry-Blair, modifiye Carry-Blair, modifiye Stuart medium, Campythioglycolate medium, alkalın peptonlu su (APW) ve yarı katı Motility Test Medium sayılabilir. Toplanan materyaller en geç 3 gün içinde izolasyona alınmalıdır. Kuruyan svaplar ve materyallerden etkeni izole etmek zordur. Genel olarak *Campylobacter* türleri çevre koşullarına duyarlı olduğundan materyal alma, transport ve izolasyon işlemleri kısa süre içinde gerçekleştirilmelidir.

7.2. Kullanılan Ekipman: Bu kapsamda gerekli ekipman, klasik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan ekipmanlardır.

- ☐ Otoklav
- ☐ Etüv
- ☐ Petri kutusu
- ☐ Mikrobiyolojik güvenlik kabini (ClassII)
- ☐ Mikroskop
- ☐ Anaerobik jar

7.3. Kullanılan Kimyasallar

PBS (Phosphate buffered saline;	%0.9)
Dipotasyum hidrojen fosfat	1.1 g
Sodyum klorür	9.0 g
Potasyum dihidrojen fosfat	0.32 g
Sodyum klorür	8.5 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2 ± 0.2

Kimyasallar distile su içerisinde eritilir ve otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir.

FTS (Fizyolojik tuzlu su; %0.9)

Sodyum klorür (NaCl) 9.0 g

Distile su 1000 ml

Sodyum klorür distile su içerisinde eritilir ve otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir.

Sodyum Hippurat Solüsyonu (%1)

Natriumhippurat 10 g

PBS 990 ml

Kimyasallar iyice eritilir ve kriyotüplere 400 µl hacimde dağıtılıp -20°C'de saklanır.

Ninhidrin Solüsyonu (%3,5)

Ninhidrin 35 g

Butanol 500 ml

Aseton 500 ml

Kimyasallar iyice eritilir, ağzı sıkı kapanan şişelerde, +5°C'de karanlıkta saklanır.

İndoksil asetat solüsyonu (%10)

İndoksil asetat 100 g

Aseton 900 ml

İndoksil asetat aseton içinde iyice eritilir ve koyu renkli şişelerde, +4°C'de saklanır. 6 mm çaplı steril absorban kağıt diskler 50 µl %10'luk indoksil asetat solüsyonu emdirilir ve kurutulur. Kurutulan diskler koyu renkli cam şişelerde, +4°C'de nemden korunarak 12 ay saklanabilir.

7.4. Kullanılan Besiyerleri

mCCDA (Modified Charcoal Cefaperozone Desoxycholate Agar)

Sığır eti ekstraktı 10.0 g

Hayvansal doku peptik dijesti 10.0 g

Kazein enzimatik hidrolizat 3.0 g

Sodyum klorür 5.0 g

Sodyum deoksikolat 1.0 g

Demir sülfat 0.25 g

Sodyum pirüvat 0.25 g

Bakteriyolojik kömür 4.0 g

Distile su 1000 ml

pH 25°C 7.4 ± 0.2

CCDA Selektive Supplement

Cefoperazone	32.0 mg
Amphotericin B	10.0 mg

Besiyeri distile su içerisinde eritilir, otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir ve 50°C'ye soğutulur. Steril koşullarda besiyerine 32 mg cefoperazone ve 10 mg amphotericin B içeren bir şişe CCDA Selective Supplement eklenir ve iyice karıştırılır.

CSM (Charcoal Selective Medium) – Karmali Agar

Kazein pankreatik dijesti	12.0 g
Aktif kömür	4.0 g
Hayvansak dokuların peptik dijesti	5.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
Maya ekstraktı	3.0 g
Siğir eti ekstraktı	3.0 g
Mısır nişastası	1.0 g
*Hemin	32.0 mg
*Cycloheximide	0.1 g
*Cefoperazone	32.0 mg
Agar	13.5 g
Distile su	1000 ml
Final pH	7.4±0.2

Besiyeri bileşenleri * ile işaretli olanlar hariç distile su içerisinde eritilir, otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir ve 50°C'ye soğutulur.

Steril koşullarda içerisine * ile işaretli maddeler eklenir ve iyice karıştırılır.

CAT Agar (Cefoperazone, Amphotericine, Teicoplanin)

Nutrient broth	25.0 g
Bakteriyolojik kömür	4.0 g
Kazein hidrolizat	3.0 g
Demir II sülfat	0.25 g
Sodyum piruvat	0.25 g
*Cefoperazone	0.008 mg

*Amphotericine B	0.010 mg
*Teicoplanin	0.004 mg
Agar	12.0 g
Distile su	1000 ml
pH 25°C	7.5 ± 0.2

Besiyeri bileşenleri * ile işaretli olanlar hariç distile su içerisinde eritilir, otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir ve 50°C'ye soğutulur.

Steril koşullarda içerisine * ile işaretli maddeler eklenir ve iyice karıştırılır.

Preston Agar

`Lab-Lemco' tozu	10.0 g
Pepton	10.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
*Lize edilmiş at kanı	100 ml
Agar	12.0 g
Distile su	1000 ml
pH 25°C	7.5 ± 0.2

Campylobacter Selektive Supplement (Preston)

Polymyxin B	5.000 IU
Rifampicin	10.0 mg
Trimethoprim	10.0 mg
Cycloheximide	100.0 mg

Besiyeri distile su içerisinde eritilir, otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir ve 50°C'ye soğutulur.

Steril koşullar altında 100 ml lize edilmiş at kanı ve supplementler eklenir ve iyice karıştırılır.

Skirrow Agar

Kazein pepton	12.0 g
Meat Pepton	5.0 g
Maya ekstraktı	3.5 g
Sığır eti ekstraktı	3.0 g

Mısır nişastası	1.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
*Vancomycin	10 mg
*Trimetoprim lactate	5 mg
*Amphotericin B	2 mg
*Polymyxin B	2500 units
*Hemolizli koyun kanı	150 ml
Agar	13.5 g
Distile su	1000 ml
pH 25°C	7.5 ± 0.2

Besiyeri distile su içerisinde eritilir, otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir ve 50°C'ye soğutulur. Steril koşullar altında 150 ml lize hemolizli koyun kanı ve supplementler eklenir ve iyice karıştırılır.

Butzler Agar	
Meat Ekstrakt	10.0 g
Pepton	10.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
*Novobiocin	5.0 mg
*Bacitracin	25.000 IU
*Colistin	10.000 IU
*Cephazolin	15 mg
*Cycloheximide	50 mg
*Defibrine at kanı	% 7
Agar	12 g
Distile su	1000 ml
pH 25°C	7.5 ± 0.2

Besiyeri * ile işaretli olanlar hariç distile su içerisinde eritilir, otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir ve 50°C'ye soğutulur.

Steril koşullarda içerisine * ile işaretli bileşenler ve defibrine at kanı eklenir ve iyice karıştırılır.

Campy-Cefex Agar

Kazein enzimatik dijesti	10.0 g
Hayvan dokularının enzimatik dijesti	10.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
Maya ekstraktı	2.0 g
Dekstroz	1.0 g
Sodyum piruvat	0.5 g
Demir sülfat	0.5 g
Sodyum bisülfid	0.3 g
*Cycloheximide	0.2 g
*Yıkanmış at kanı	% 5
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH 25°C	7.5 ± 0.2

Besiyeri içerikleri cycloheximide hariç distile su içerisinde eritilir, otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir ve 50°C'ye soğutulur.

Steril koşullarda içerisine cycloheximide ve yıkanmış at kanı eklenir ve iyice karıştırılır.

Alkaline Peptone Water (APW)

Hayvansal dokuların peptik dijesti	20.0 g
Sodyum klorür	30.0 g
Distile su	1000 ml
Final pH 25°C	8.6 ± 0.2

İçerik distile su içerisinde eritilir, otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir.

Cary-Blair Transport Medium

Sodyum klorür	5.0 g
Disodyum fosfat	1.10 g
Sodyum thioglycollate	1.50 g
Kalsiyum klorür	0.09 g
Agar	5.50 g
Distile su	1000 ml
Final pH 25°C	8.4 ± 0.2

Eeklenmesi gerekenler

Resazurin 0.04 g

L-Cysteine 0.5 g

İçerik distile su içerisinde eritilir, otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir.

Modifiye Cary-Blair Transport Medium

Disodyum fosfat 1.10 g

Sodyum thioglycollate 1.50 g

Sodyum klorür 5.0 g

Fenol red 18.0 mg

*Kalsiyum klorür %1 'lik 9 ml

Agar 5.0 g

Distile su 1000 ml

Final pH 25°C 8.4 ± 0.2

Kalsiyum klorür hariç diğer bileşenler distile su içerisinde ısıtılarak eritilir.

Soğuduktan sonra 9 ml kalsiyum klorür eklenir ve otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir.

Modifiye Stuart Transport Medium

Sodyum gliserofosfat 10.0 g

Sodyum thioglycollat 0.5 g

Sistein hidroklorür 0.5 g

Kalsiyum klorür 0.1 g

Metilen blue 0.001 g

Distile su 1000 ml

Final pH 25°C 7.4 ± 0.2

Bileşenler distile su içerisinde eritilir, otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir.

Campylobacter Thioglycollate Transport Medium

Kazein pankreatik dijesti 17.0 g

Soya unu papaik dijesti 3.0 g

Dekstroz 6.0 g

Sodyum klorür 2.5 g

Sodyum thioglycollate	0.5 g
L-sistin	0.25 g
Sodyum sülfid	0.1 g
*Amphotericin B	2.0 mg
*Cephalothin	15.0 mg
*Trimetoprim	5.0 mg
*Vancomycin	10.0 mg
*Polymyxin B	2500.0 units
Agar	1.6 g
Distile su	1000 ml
Final pH 25°C	7.6 ± 0.2

Besiyeri * ile işaretli olanlar hariç distile su içerisinde eritilir, 121°C'de 15 dk. sterilize edilir ve 50°C'ye soğutulur.

Steril koşullarda içerisine * ile işaretli bileşenler eklenir ve iyice karıştırılır.

Motility Test Medium

Sığır eti ekstraktı	3.0 g
Jelatinin pankreatik dijesti	10.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
* Triphenyltetrazolium chloride %1'lik (TTC) 5 ml	
Agar	4.0 g
Distile su	1000 ml

TTC solüsyonu hariç bileşenler distile su içerisinde kaynatılarak eritilir.

TTC solüsyonu eklendikten sonra otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir.

7.5. İzolasyon ve identifikasyon: Termofilik *Campylobacter* türlerinin hayvan dışkılarından ve gıdalardan izolasyon ve identifikasyonu için aşağıdaki basamaklar kullanılmaktadır.

İzolasyon: Bu amaçla alınan materyal direkt olarak izolasyon besiyerine swap veya öze ile ekilmelidir. Herhangi bir ön zenginleştirmeye gerek duyulmaz. İzolasyon için kullanılan besiyerleri arasında modifiye charcoal-sefaperozon-desoxycholate agar (MCCDA) en çok tercih edilen besiyeridir. Bunun dışında charcoal içeren Karmali agar (CSM, charcoal selektif medium), CAT

agar (sefoperazone, amphotericine, tericopanin) ve kanla hazırlanan agarlar arasında Preston Agar, Skirrow agar, Butzler agar ve Camp-cefex besiyerleri izolasyon amacıyla kullanılmaktadır. Ekim için pasif filtrasyon tekniği de kullanılmaktadır. Bu yöntem, özellikle kullanılan suplementlere duyarlı *Campylobacter* izolasyonu için kullanılır. Bu amaçla alınan materyal öncelikle PBS ile 1/10 oranında sulandırılır. Ekim yapılacak besiyeri üzerine 0.45 µm veya 0.65 µm por çapına sahip filtreler yerleştirilir. Filtre üzerine çok dikkatli şekilde 100 µl materyal ilave edilir. 30-45 dakika beklenir ve varsa *Campylobacter*'lerin besiyerine geçmesi sağlanır. Daha sonra filtre dikkatli bir şekilde kaldırılır ve besiyeri inkubasyona kaldırılır. *Campylobacter* izolasyonu için ekilen tüm besiyerleri, mikroaerobik atmosfer koşullarında (%5-10 oksijen %5-10 karbondioksit) veya jarlarda gas generating kitlerle sağlanan ortamlarda 37-42°C de 48 saat inkubasyona bırakılır. Genellikle 42°C kullanılmaktadır.

İdentifikasyon: Karkoal içeren besiyerlerinde gri renkli, basık ve nemli, yaygın; kanla hazırlanan ortamlarda hafif pembe, yuvarlak, konveks, S tipli koloniler *Campylobacter* yönünden şüpheli olarak değerlendirilir. Kolonilerden FTS ile hazırlanan preparatlar, faz-kontras mikroskobunda incelendiğinde, tipik spiral-kıvrık hareketli çomaklar görülür. Eskimiş kültürlerde hareketli kokoid formlara da rastlanabilir. Bu kolonilere oksidaz testi yapıldığında, oksidaz pozitif sonuç alınır. Bu kolonilerden doğrulama için 25°C'de mikroaerobik ve 41.5°C'de aerobik üreme için selektif olmayan kanlı agara ekimler yapılarak 48 saat süreyle inkubasyona kaldırılır. Bu testler sonucunda üreme olmaması *Campylobacter* doğrulaması için önemlidir. Ayrıca Lateks aglütinasyon testleri ile *C. jejuni* / *C. coli* doğrulaması yapılır.

Tür düzeyinde identifikasyon: Hayvan orijinli materyallerde *C. jejuni* ve *C. coli* en dominant tür olması nedeniyle iki türün identifikasyonu önem taşır. Bu türlerin identifikasyonunda hippurat ve indoksil asetat hidrolizi testleri kullanılır ve tür düzeyinde identifikasyon yapılır (Tablo 1). Bu testlerin yapılmasında negatif ve pozitif kontrollerin kullanılması yarar sağlar.

- **Hippurat hidrolizi:** Şüpheli kolinler bir öze yardımı ile %1 lik Sodyum hippuratın solusyonundan 400 µl içinde süspanse edilir ve 37°C de 2 saat inkube edilir. İnkubasyon sonrasında 200 µl %3.5'lik ninhidrin solusyonu yavaşça ilave edilir. 37°C de 10 dakika yeniden inkube edilir ve reaksiyon renk değişimine göre değerlendirilir. Koyu mor/mavi renk pozitif reaksiyonu gösterir açık mavi veya gri renk negatif olarak değerlendirilir.
- **İndoksil asetat hidrolizi:** İndoksil asetat diskleri üzerine şüpheli kolonilerden öze ile sürülür ve bir damla distile su damlatılır ve 5-10 dakikada diskte oluşan renk değişimine göre reaksiyon değerlendirilir. Koyu mavi renk pozitif reaksiyonu gösterirken renk değişiminin olmaması negatif sonuçtur.
- *Campylobacter* türlerinin biyokimyasal özellikleri belirlemek amacıyla PCR-temelli teknikler kullanılabilir.

Tablo 1. *Campylobacter*ler'in tür düzeyinde identifikasyonu

Özellik	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
Hippurat hidrolizi	+	-	-
İndoksil asetat hidrolizi	+	+	-

Moleküler teşhis: Hayvan dışkılarında ve gıdalardan *Campylobacter* türlerinin teşhisi için PCR-temelli teknikler tanımlanmıştır. Bu amaçla kullanılan testler tür spesifik olarak kullanılmaktadır.

Serolojik testler: Hayvanlarda *Campylobacter* kolonizasyonunu belirlemek amacıyla kullanılan herhangi bir serolojik test bulunmamaktadır.

7.6. Sonuçların Değerlendirilmesi: İzolasyon ve identifikasyon sonrasında, materyalde *Campylobacter* spp. varlığı belirlenir ve tür düzeyinde identifikasyonu gerçekleştirilir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008), *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, Bölüm 2.9.3.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR (1999). Clinical Veterinary Microbiology. Mosby, Edinburgh, Harcourt Publishers Ltd., 648 pp.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLILARDA MİKOPLAZMA İNFEKSİYONLARI (AVIAN MYCOPLASMOSIS)’NA NEDEN OLAN ETKENLERİN İZOLASYON ve İDENTİFİKASYONU

1. AMAÇ

Bu metotta, kanatlılarda avian mycoplasmosise neden olan *Mycoplasma gallisepticum* (MG) ve *M. synoviae* (MS)’nin klasik yöntemlerle izolasyonu ve üreme inhibisyon testiyle identifikasyonu ile teşhisini kapsar.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu *Mycoplasma* spp. izolasyon ve identifikasyon için uygun alt yapısı bulunan Teşhis Laboratuvarında uygulanmaktadır. Etken izolasyonu her zaman için altın standart test yöntemidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

Avian mycoplasmosis: Evcil kanatlıların *Mycoplasma gallisepticum* ve/veya *M. synoviae*’nın neden olduğu enfeksiyonudur.

Kronik Solunum Yolu Hastalığı (Chronic respiratory disease – CRD): Evcil kanatlılarda *Mycoplasma gallisepticum*’un neden olduğu enfeksiyonudur.

İnfeksiyöz synovitis: Evcil kanatlılarda *M. synoviae*’nın neden olduğu enfeksiyon hastalığıdır.

MG: *Mycoplasma gallisepticum*

MS: *Mycoplasma synoviae*

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot kronik solunum yolu hastalığından veya infeksiyöz synovitisten şüpheli evcil kanatlılara ait marazi maddelerden ve swap örneklerinden MG ve MS izolasyonu ile *Mycoplasma* izolatlarının üreme inhibisyon testi ile identifikasyonlarının yapılmasında kullanılır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Test örnekleri:Kronik solunum yolu hastalığından veya infeksiyöz synovitisten şüpheli örnekler veya Mycoplasma kültürleri. Örnekler taze karkastan veya taze iken dondurulmuş karkaslardan alınır.

Seçilmesi gerekli örnekler infeksiyonun yerleştiği organa göre değişir. Canlı kanatlılardan chonal cleft, orofarinks, özofagus, trachea, göz, kloaka ve fallus swabları alınabilir. Ölü hayvanlardan ise burun boşluğu, infraorbital sinus, trachea ve hava kesesi swabları alınabileceği gibi infraorbital sinus ve eklem sıvıları da enjektörle çekilerek alınabilir. Swap örnekleri alındıktan sonra 2-3 ml Frey's broth içine bırakılabilir. Ya da kuru swap sıvı besiyerine daldırıldıktan sonra örnek alınarak kendi tüpüne koyularak en kısa sürede laboratuvara ulaştırılır.

Ölü embriyolardan da örnek alınabilir. Bu durumda vitellin membranın iç yüzeyi, orofarinks ve hava kesesinden örnek alınır.

Örnekler laboratuvara buz aküsü ile paketlenmiş olarak hemen (24-48 saat) ulaştırılmalıdır. Hemen ulaştırılamayacaksa derin dondurucuda (-20°C'de) dondurulmalıdır. Transport medium olarak PPLO broth, Frey's broth kullanılabilir.

7.2. Kullanılan Ekipman

Karbondioksitli İnkübatör (37 °C±1°C, %5 CO₂)

Stereo mikroskop

Analitik terazi (50-0.1 mg hassasiyette)

Su banyosu, (37-100°C arasında ayarlanabilen)

pH metre

Buzdolabı

Otoklav

Biyogüvenlik Kabini

Vortex

7.3. Kullanılan Besiyerleri

PPLO broth

Kısım A:

PPLO broth without crystal violet (Difco)	14.7 g.
Distile veya deionize su	700 ml.

pH 7.8 $\pm$ 2'ye ayarlanır ve Otoklavda 121°C'de 1 atmosfer basınçta 15 dk. sterilize edilir. 56°C'ye kadar soğuduktan sonra üzerine,

Kısım B:

56°C de 1 saat inaktive edilmiş domuz veya at serumu 150 ml.

%25 (w/v) Yeast extract	100 ml.
%10 (w/v) Glucose	10 ml.
%5 (w/v) Thallium acetate	10 ml.
200.000 İ.Ü./ml penicilin G	5 ml.
%0.1 Fenol red	20 ml.
β NAD %1	10 ml
DL cystein hydrochlorid %1	10 ml

Steril şekilde ilave edilerek 9 ml. miktarında şişelere taksim edilir.

PPLO agar

Kısım A:

PPLO broth without crystal violet, (Difco)	14.7 g.
Distile veya deionize su	700 ml.
Pürifiye agar	10 g.

pH 7.8 e ayarlanır ve otoklavda 121°C de 1 atmosfer basınçta 15 dk. sterilize edilir, 56°C'ye kadar ben maride soğuduktan sonra üzerine,

Kısım B:

56°C de 1 saat inaktive edilmiş domuz veya at serumu 150 ml.

%25 (w/v) Yeast extract	100 ml.
%10 (w/v) Glucose	10 ml.
%5 (w/v) Thallium acetate	10 ml.
200.000 İ.Ü./ml penicilin G	5 ml.
%0.1 Fenol red	20 ml.
β NAD %1	10 ml
DL cystein hydrochlorid %1	10 ml

Steril şekilde ilave edilerek 9 ml. miktarında petri plaklarına taksim edilir. +2/+8°C'de 2 hafta saklanabilir.

Mycoplasma Broth Medium (Frey's)

Otoklavlanacak kısım:

Deiyonize su	850/815 ml
Mycoplasma Broth Base (Frey's)	22.5 g
Glucose	1.5 g
Phenol red (%1)	2.5 ml

Karıştırılıp pH 7.8'e ayarlanır ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanır. Soğuduktan sonra aşağıdaki steril bileşenler aseptik olarak ilave edilir.

Thallium acetate (%0,05)	5 ml
Penisilin G (200.000 IU/ml)	2,5 ml
Domuz serumu	120/150 ml
βNAD %1	10/12,5 ml
DL cystein hydrochlorid %1	10/12,5 ml

+2/+8°C'de en az 2 hafta saklanabilir. -40°C veya daha düşük sıcaklıklarda daha uzun süre saklanabilir.

Mycoplasma Agar Medium (Frey's)

Otoklavlanacak kısım:

Deiyonize su	850/845 ml
Mycoplasma Broth Base (Frey's)	22.5 g
Purified agar	12 g
Glucose	1.5 g

Karıştırılıp pH 7.8'e ayarlanır ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanır. 45-56°C'ye kadar soğuduktan sonra aşağıdaki steril bileşenler aseptik olarak ilave edilir.

Thallium acetate (%0,005)	2 ml
Domuz serumu	150 ml
Penisilin G (200.000 IU/ml)	2 ml
βNAD %1	10/12.5 ml
DL cystein hydrochlorid %1	10/12.5 ml

Yavaşça karıştırılıp petri kutularına dökülür. +2/+8°C'de 2 hafta saklanabilir.

7.4. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

Bakteriyolojik İzolasyon

Katı örnekler: Doku örnekleri dokuya yapılan kesit yüzeyi agara sürülerek ekim yapılabilir. Ayrıca doku parçaları bir homojenizatör yardımıyla ya da havanda steril kum ve sıvı besiyeri ile ezildikten sonra örneğin 10^{-3} 'e kadar dilüsyonları yapıp her dilüsyondan 1/10 oranında sıvı besi yerine ekilir.

Svap Örnekleri: Sıvı besiyeri içindeki swablar vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra sıvı kısımdan direkt olarak katı ve sıvı besi yerine ekilir. Örneklerin 10^{-3} 'e kadar dilüsyonları yapıp tüm dilüsyonlardan ekim yapılmalıdır. Katı besi yerine ise 1 damla (yaklaşık 25 µl) damlatma suretiyle ekim yapılır.

Eklem sıvısı mycoplasmaların üremesini engelleyecek inhibitörler içerebileceğinden 10^{-3} 'e kadar dilüsyonları yapıp her dilüsyondan 1/10 oranında sıvı besi yerine ekilir. Katı besi yerine ise 1 damla (yaklaşık 25-33 µl) damlatma suretiyle ekim yapılır.

Ekim yapılan sıvı ve katı besi yerleri yüksek nemli ve %5-10 karbondioksitli ortamda 37°C'de inkubasyona bırakılır.

Katı kültürler üçüncü günden itibaren günlük olarak üreyen koloniler yönünden incelenir. Kültürlerde üreme olmadığını söyleyebilmek için 21 gün inkubasyona devam edilmelidir. Sıvı kültürler her gün renk değişimi yönünden kontrol edilir. Üreme belirtisi görüldüğünde katı besiyerine pasajlanır. Üreme belirtisi görülmediği durumlarda ise 7 gün sonra 3 kez kör pasaj yapılır.

Sıvı kültürler, üremenin kanıtı olan renk değişikliği (kırmızıdan turuncu sarıya doğru) yönünden her gün kontrol edilir. Bu tip sıvı kültürlerden hemen katı besi yerine ekimler yapılır. Aşırı bulanıklık bakteriyel kontaminasyonu gösterir. Böyle kültürlerin subkültürü 0.45 µm por çaplı membran filtreden geçirilerek yapılır. Sıvı kültürlerin pasajları 1/10 inokulasyon oranı ile taze broth'lara ve agara yapılır. Sıvı besi yerinde arginin hidrolize eden mikoplazma türleri bulunduğu oluşun alkali besiyerindeki asit renk değişikliğini maskeleyebileceğinden, sıvı kültürde herhangi bir renk değişikliği olmasa bile 7-10 gün sonra katı besi yerine subkültürleri yapılmalıdır. İzolasyonun olmadığını söylemek için broth kültürler ve bir adet ekim yapılmamış broth 3 hafta inkübe edilir.

Katı kültürler üremeler yönünden her 1-3 günde bir stereo mikroskop (x5-50 büyütme) ile incelenir. Katı besi yerinde kısmen agara gömülü tipik sahanda yumurta görünümünde koloniler oluştururlar. Negatif durumlarda pleytler 14-20 gün sonra atılır. Kolonilerin gözlenmesi durumunda koloni içeren agar kısmı blok şeklinde kesilip çıkarılarak hem sıvı hem de katı besiyerine subkültürü yapılır. Katı besiyerine pasajda, agar bloğun koloni içeren yüzü aşağıda olacak şekilde yeni pleyt üzerine konulur ve öze ile yüzeyde hareket ettirilir.

İzolatların klonlanması ve saflaştırılması, görülen her bir morfolojik tipteki kolonilerin tekrarlayan pasajları ile yapılır. Pasajlamalarda tek bir koloni kullanılır.

İdentifikasyon için katı kültürde tek koloni seçilip pasajlanır, bu işlem üç kez tekrarlanır.

Bakteriyolojik İdentifikasyon

Biyokimyasal testler (Glukoz fermentasyonu, Arginin hidrolizi vb.) identifikasyona yardımcı olabilir ancak MG ve MS için spesifik değildir. Ayrıca klonlama yöntemi ile kültürün saflaştırılması gerekir.

Üreme İnhibisyon Testi (Growth Inhibition Test)

Üç kez klonlanmış saf mycoplasma kültüründen sıvı besi yerine pasaj yapılır. Yeterli üreme elde edilince kültürün dilüsyonları yapılır. Test için 10^4 CFU/ml optimal bakteri miktarıdır. Test için 10^{-2} , 10^{-3} dilüsyonlar kullanılır. Uygun besi yeri bulunan petri plaklarının arkasına kalemle boydan boya düz ve birbirine paralel çizgiler çizilir. 9 cm çaplı petrilere iki-üç çizgi çizilebilir. Her bir kültür dilüsyonundan 50 µL çizginin bir kenarına bırakılarak petri eğilir ve damlanın çizgi boyunca ilerlemesi sağlanır. Kuruması beklenip ekim çizgisi uzunluğunun ortasından 6 mm çaplı daire şeklinde agar parçası kesilip çıkarılır. Bu işlem için steril pastör pipeti kullanılabilir. Oluşan çukura 30-40 µL spesifik antiserum taşırmadan konulur. Kuruması beklenip, petri ters çevrilerek 37°C'de üreyinceye kadar (48-72 saat) inkübe edilir. Süre sonunda çukur etrafında üreme inhibisyon zonunun oluşması testin pozitif olduğunu gösterir.

7.5.Sonuçların Değerlendirilmesi

Koloni morfolojisi, biyokimyasal testler (Glukoz fermentasyonu, Arginin hidrolizi vb.) ve Üreme İnhibisyon Testi ile değerlendirilir. Sonucun doğruluğu PCR yöntemi ile teyit edilebilir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR

- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008), Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*), Bölüm 2.3.5.
- ☐ e- Code of Federation 147.15 Laboratory procedure recommended for the bacteriological examination of mycoplasma reactors.
- ☐ Isolation and identification of avian pathogens, American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA, 2nd edition, 1980, Hitchner SB, Domermuth CH, Purchase HG, Williams JE.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

MYCOPLASMA GALLISEPTICUM VE MYCOPLASMA SYNOVIAE’NİN PCR İLE TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Bu metot, kanatlılarda Avian Mycoplasmosis’e neden olan *Mycoplasma gallisepticum* (MG) ve *M. synoviae* (MS)’nin PCR ve Multiplex PCR ile teşhisini kapsar.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu PCR için uygun alt yapısı bulunan Teşhis Laboratuvarında uygulanmaktadır. PCR yöntemi, kanatlı hayvanlarda mikoplazma infeksiyonlarının hızlı tanısında alternatif bir testtir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların infeksiyonuna yol açma riski nedeni ile infeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR/KISALTMALAR

Avian mycoplasmosis: Evcil kanatlıların *Mycoplasma gallisepticum* ve/veya *M. synoviae*’nın neden olduğu infeksiyonudur.

Kronik Solunum Yolu Hastalığı (Chronic respiratory disease – CRD): Evcil kanatlılarda *Mycoplasma gallisepticum*’un neden olduğu infeksiyonudur.

İnfeksiyöz synovitis: Evcil kanatlılarda *M. synoviae*’nin neden olduğu infeksiyon hastalığıdır.

MG: *Mycoplasma gallisepticum*

MS: *Mycoplasma synoviae*

PCR: Polymerase Chain Reaction

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Klasik izolasyon ve identifikasyon metoduna alternatif olarak MG veya MS'ye ait spesifik DNA'nın belirlenmesi esasına dayanan bir metottur. Bu metot kronik solunum yolu hastalığından veya infeksiyöz synovitisten şüpheli kanatlılara ait marazi madde, swap örnekleri veya MG veya MS yönünden ekim yapılmış bakteriyel kültürden MG ve MS'ye ait DNA varlığının ortaya koyulduğu bir yöntemdir. Multipleks PCR Metodunda ise aynı anda hem MG hem de MS'ye ait DNA olup olmadığını ortaya koymak mümkündür.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Kronik solunum yolu hastalığından veya infeksiyöz synovitis'ten şüpheli örnekler veya *Mycoplasma* kültürleri. Örnekler taze karkastan veya taze iken dondurulmuş karkaslardan alınır.

Seçilmesi gerekli örnekler infeksiyonun yerleştiği organa göre değişir. Canlı kanatlılardan chonal cleft, orofarinks, özofagus, trachea, göz, kloaka ve fallus sıvıpları alınabilir. Ölü hayvanlardan ise burun boşluğu, infraorbital sinus, trachea ve hava kesesi swabları alınabileceği gibi infraorbital sinus ve eklem sıvıları da enjektörle çekilerek alınabilir.

Swap örnekleri alındıktan sonra 2-3 ml Frey's broth içine bırakılabilir. Ya da kuru swap sıvı besi yerine daldırıldıktan sonra örnek alınarak kendi tüpüne koyularak en kısa sürede laboratuvara ulaştırılır.

Ölü embriyolardan da örnek alınabilir. Bu durumda vitellin membranın iç yüzeyi, orofarinks ve hava kesesinden örnek alınır.

Örnekler laboratuvara buz aküsü ile paketlenmiş olarak hemen (24-48 saat) ulaştırılmalıdır. Hemen ulaştırılamayacaksa derin dondurucuda (-20°C'de) dondurulmalıdır. Transport medium olarak PPLO broth, Frey's broth kullanılabilir.

7.2. Kullanılan Ekipman

Analitik terazi (50-0.1 mg hassasiyette)

Otomatik pipetler (çeşitli hacimlerde)

Buzdolabı

Derin dondurucu (-20°C, -70°C)

Mikrodalga fırın

Biyogüvenlik Kabini

Steril pens, spatül, bistüri v.b. malzemeler

Vorteks

Mikrosantrifüj

Benmari veya kuru blok ısıtıcı
Pastör pipeti
Mikosantrifüj tüpü,
PCR tüpü
Thermocycler
Elektroforez sistem
Güç kaynağı
UV transillüminatör veya Jel Görüntüleme sistemi

7.3. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

DNA izolasyonu

1 ml PBS veya fenol içermeyen Frey's broth içinde bulunan trakeal sıvaplardan (3-5 tanesi bir araya getirilebilir) veya fenol içermeyen sıvı kültürden DNA ekstrakte edilir. Test edilecek örnekler vorteks yardımı ile iyice karıştırıldıktan sonra swap çubukları çıkarılır. Kalan

süspansiyon 4°C'de 14.000 g'de 30 dakika süreyle santrifüj edilir. Süpernatant bir pastör pipeti ile dikkatlice alınıp atılır. Sediment 25 µl PCR-grade su ile süspanse edilir. Tüp ve içeriği 10dakika kaynatılır, 10 dakika buzda bekletilir ve 14.000 g'de 5 dakika santrifüjlenir. DNA supernatantın içindedir.

Ticari DNA izolasyon kitinin Gram negatif bakteri hücre lizatı protokolü kullanılarak da DNA izolasyonu yapılabilir.

İzolasyon sırasında oluşabilecek hataların tespit edilebilmesi için her DNA izolasyonu sırasında standart pozitif örnekten (+ kontrol) ve PCR grade sudan (- kontrol) izolasyon yapılmalıdır.

Dokulardan DNA izolasyonu için ticari DNA izolasyon kiti kullanılarak kitin talimatlarına göre yapılır.

PCR Testinin Yapılışı

PCR'da Kullanılan Primerler

MG primerleri aşağıdaki sekanslardan oluşur:

MG-F: 5'-GAG-CTA-ATC-TGT-AAA-GTT-GGT-C-3'

MG-R: 5'-GCT-TCC-TTG-CGG-TTA-GCA-AC-3'

MS primerleri aşağıdaki sekanslardan oluşur:

MS-F: 5'-GAG-AAG-CAA-AAT-AGT-GAT-ATC-A-3'

MS-R: 5'-CAG-TCG-TCT-CCG-AAG-TTA-ACA-A-3'

Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Reaksiyon karışımı ayrı temiz bir bölgede ve yalnız bu iş için kullanılan pipetlerle hazırlanır. 50 µl'lık PCR reaksiyonu için karışım aşağıdakilerden oluşur:

Ultra saf su (PCR grade)	35.75 µl
10x PCR Buffer	5.00 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2.00 µl
dNTP karışımı (10 mM)	1.00 µl
F Primer (20 pikomol/µl)	0.50 µl
R Primer (20 pikomol/µl)	0.50 µl
Taq polimeraz (5 U/µl)	0.25 µl

Her bir PCR tüpüne 45 µl reaksiyon karışımı konur. Tüpler diğer bir temiz bölgeye alınır ve her bir tüpe 5'er µl DNA örneğinin ilave edilir. Her çalışmada 1 adet pozitif ekstraksiyon kontrolü, 1 adet pozitif RNA reaksiyon kontrolü ve 1 adet negatif (su) ekstraksiyon kontrolü, 1 adet negatif reaksiyon kontrolü ile birlikte çalışılmalıdır.

PCR Reaksiyonu

Tüpler thermocycler'a yerleştirilir ve şu PCR programına tabi tutulur:

Sıcaklık	Süre	Siklus Sayısı
94°C	30 saniye	40 siklus
58°C	30 saniye	
72°C	60 saniye	
72°C	5 dakika	1 siklus

Multipleks PCR Testinin Yapılışı

Multiplex PCR'da Kullanılan Primerler

MG primerleri aşağıdaki sekanslardan oluşur (OIE, 2008):

MG-F: 5'-GAG-CTA-ATC-TGT-AAA-GTT-GGT-C-3'

MG-R: 5'-GCT-TCC-TTG-CGG-TTA-GCA-AC-3'

MS primerleri aşağıdaki sekanslardan oluşur (Marois ve ark., 2002):

MSp15: 5'-TCA-TTC-AGC-AGC-GCC-AGC-TTG-TTC 3'

MSp14: 5'-GCT-TGA-GTC-TCC-ATT-AAC-TTG-TTG-3'

Multiplex PCR Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Reaksiyon karışımı ayrı temiz bir bölgede ve yalnız bu iş için kullanılan pipetlerle hazırlanır. 25 µl'lik PCR reaksiyonu için karışım aşağıdakilerden oluşur:

Reagent'ler	Miktarları
Ultra saf su (PCR grade)	12.50 µl
10 X PCR buffer (without MgCl ₂)	2.50 µl
dNTP karışımı (10 mM)	0.50 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3.00 µl
Tag DNA polymerase(5 U/µl)	0.50 µl
MG F Primer (20 pikomol/µl)	1.00 µl
MG R Primer (20 pikomol/µl)	1.00 µl
MS F Primer (20 pikomol/µl)	1.00 µl
MS R Primer (20 pikomol/µl)	1.00 µl
Reagent'ler Toplamı	23.00 µl
Template (DNA)	2.00 µl
Toplam	25.00 µl

Her bir PCR tüpüne 23 µl reaksiyon karışımı konur. Tüpler diğer bir temiz bölgeye alınır ve her bir tüpe 2'şer µl DNA örneğinin ilave edilir. Her çalışmada 1 adet pozitif ekstraksiyon kontrolü, 1 adet pozitif RNA reaksiyon kontrolü ve 1 adet negatif (su) ekstraksiyon kontrolü, 1 adet negatif reaksiyon kontrolü ile birlikte çalışılmalıdır

Multiplex-PCR Reaksiyonu

Tüpler thermocycler'a yerleştirilir ve şu PCR programına tabi tutulur:

Sıcaklık	Süre	Siklus Sayısı
95 °C	2 dakika	1 siklus
95 °C	30 saniye	40 siklus
57 °C	40 saniye	
72 °C	30 saniye	
72 °C	10 dakika	1 siklus

PCR ve Multipleks PCR için Elektroforez- Görüntüleme

Bu aşama diğer tüm aşamalardan ayrı bir oda veya bölmede yapılır.

Agaroz jel, 0,5x TBE buffer içinde %2 agaroz eritilerek hazırlanır. Erimiş jele final konsantrasyonu

0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür ilave edilir ve kalıba dökülür. Jel, donmasını takiben running buffer olarak 0,5x TBE buffer içeren elektroforez tankına yerleştirilir. PCR ürünleri (5-10 µl), 6x loading buffer (2 µl) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenir. Ayrıca uygun moleküler marker (50 bp) da yüklenir. Elektrotlar arası mesafeye göre her bir cm'ye 5 V hesabıyla doğru akım uygulanır.

Elektroforezi takiben jel UV transillüminatör altında veya bir jel görüntüleme sisteminde gözlenir.

7.4. Sonuçların Değerlendirilmesi

PCR'de beklenen bant büyüklüğü *Mycoplasma gallisepticum* için 185 bp, *Mycoplasma synoviae* için 214 bp'dir.

Multiplex PCR'de beklenen bant büyüklüğü *Mycoplasma gallisepticum* için 185 bp, *Mycoplasma synoviae* için 422 bp'dir.

Sonuçların geçerli olabilmesi için pozitif kontrolle pozitif, negatif kontrolle negatif sonuç alınmalıdır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR

- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008), Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*), Bölüm 2.3.5.
- e-Code of Federation 147.15 Laboratory procedure recommended for the bacteriological examination of mycoplasma reactors.
- Marois C, Dufour-Gesbert F, Kempf I. (2002) Polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* in environmental samples. Avian Pathol. 31: 163-168.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLILARDA MİKOPLAZMA İNFEKSİYONLARININ (AVIAN MYCOPLASMOSIS) SERUM PLEYT AGLUTİNASYON TESTİ İLE TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Bu prosedürde Teşhis Laboratuvarı'na gelen *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* şüpheli tavuk kan serumlarından ve *Mycoplasma meleagridis* şüpheli hindi kan serumlarından ya da damızlık veya ticari işletmelerden kontrol amaçlı gelen kan serumlarından MG, MS ve MM antikorlarının varlığının serum pleyt aglutinasyon (çabuk lam aglutinasyon) testi ile saptanabilmesi amaçlanmıştır.

2. UYGULAMA ALANI

MG, MS ve MM şüpheli tavuk ve hindi kan serumlarından SPAT testlerinin yapılabilmesi için uygun alt yapısı bulunan Teşhis Laboratuvarlarında uygulanır. SPA testi *M. gallisepticum*, *M. synoviae* şüpheli tavuk kan serumlarından ve *M. meleagridis* şüpheli hindi kan serumlarında MG, MS veya MM antikorlarının varlığının saptanması amacıyla kullanılan temel tarama testidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların infeksiyonuna yol açma riski nedeni ile infeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

SPAT ile ilgili uyarı/önlemler/dikkat edilecek hususlar:

- ☐ Antijen +2 °C / + 8 °C'de karanlıkta ve dondurulmadan saklanmalıdır.
- ☐ Son kullanma tarihi geçmiş antijenler kullanılmamalıdır.
- ☐ Test öncesi antijen iyice çalkalanmalıdır.
- ☐ Donmuş , kokuşmuş, hemoliz olmuş ve fibrinli serumlar testte kullanılmaz.

- ☐ Testin yapılacağı yer; temiz, tozsuz, aydınlık ve ısı derecesi 20-25°C olmalıdır.
- ☐ Ortam ısısı 20°C'nin altındaysa reaksiyon gecikebilir. 25°C'nin üzerinde otoaglutinasyon oluşur.
- ☐ Testte kullanılacak antijen ve serumun ısıları yaklaşık 15-18°C civarında bulunmalı, farklı olmamalıdır.
- ☐ Antijen kullanılmadan önce (+) müsbet, (-) negatif serumlarla kontrol edilmelidir.

Test pleytleri temiz ve distile su ile yıkanıp iyice kurutulmalıdır. Pleytin temizliğinde alkol ve dezenfektan kullanılmamalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

MG: *Mycoplasma gallisepticum*

MS : *Mycoplasma synoviae*

MM: *Mycoplasma meleagridis*

SPA: Serum pleyt aglutinasyon

SPF: Spesifik Patojen Free

Antikor (Ab): Çok hücreli hayvansal organizmaların bağışıklık sistemi tarafından; kendi organizmalarına ait olmayan organik yapılara karşı geliştirilen glikoprotein yapısındaki moleküllerdir.

Antijen (Ag): Vücuda yabancı maddeler girdiği anda bağışıklık sistemince antikor oluşturulmasına neden olan moleküllerdir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Laboratuvara gelen tavuk kan serumlarından MG ve MS ve hindi kan serumlarından MM'ye karşı oluşmuş antikorların varlığını ortaya koymak için uygulanan serum pleyt aglutinasyon testi içerir.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Tavuk/Hindi kan serumu: Serolojik muayeneler için, test materyali sürüyü örnekleyecek miktarda alınan kanların pıhtılaştırıldıktan sonra çizilerek elde edilen kan serumlarıdır. Test için kullanılacak serumlar taze olmalı ve dondurulmuş serumlar yanlış pozitiflik verebileceğinden dondurulmamalıdır. Hemolizli kontamine vb serumlar test için kullanılmaz. Pozitiflik nonspesifik reaksiyonlardan kaynaklanabileceğinden serum örneklerini 56°C'de 30 dk inaktive etmek gerekir. Teste başlamadan öce serumlar oda sıcaklığına getirilmeli ve otoaglutinasyon verip vermedikleri kontrol edilmelidir. Serumlar hemen test edilmeyecekse +4 °C'de 3 gün süreyle saklanabilir.

Biyolojik maddeler

- ☐ **Test Antijeni:** Ticari olarak temin edilen SPA antijenlerinden herhangi biri kullanılabilir. Kullanılacak antijen testten önce oda sıcaklığına getirilmelidir.
- ☐ **Pozitif Kontrol serumu:** Yapılacak teste göre MG, MS ve MM pozitif olduğu bilinen standart serumlar
- ☐ **Negatif kontrol serumu:** MG, MS ve MM negatif olduğu bilinen standart serumlar

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Fayans (Cam ya da mika yüzeyler de kullanılabilir.)
- ☐ Mikropipet
- ☐ Karıştırıcı

7.3. SPA Testin yapılışı:

1. Test pleytine Her bir örnek için yaklaşık 3 cm karelik alanın orta kısmına 1 damla (yaklaşık 20-30 µl) test edilecek serumdan bırakılır. Bir seferde kaç örnek bir arada çalışılacağı teknik personelin hızına bağlıdır. Ancak bu sayı 25'i geçmemeli ve test tamamlanıncaya kadar serumların kurumayacağı kadar olmalıdır.
2. Serum örneklerinin yanına eşit miktarda test antijeni damlatılır.
3. İnce bir cam çubuk vb. yardımıyla antijen ve serum örneği karıştırılır. Bu cam çubuk örnekler arasında temizlenmeli ya da her örnek için farklı bir karıştırıcı çubuk kullanılmalıdır.
4. Fayans (pleyt) 5 sn. süreyle yavaş dairesel hareketlerle döndürülerek damlaların karışması sağlanır. 1dk sonunda pleyt tekrar dairesel hareketlerle 5 sn kadar döndürülür ve kalan 55 sn. sonunda test sonuçları değerlendirilir.
5. Pozitif bir reaksiyon, 2 dakika içerisinde antijenin kolaylıkla görülebilen kümeleşmeler oluşturmasıyla dikkati çeker.
6. Negatif bir reaksiyon, 2 dakika içerisinde antijenin hiçbir kümeleşme oluşturmamasıyla ayrılır.
7. 3-5 dk içinde kısmen aglutinasyon veren şüpheli serum örnekleri bir seri dilüsyonu yapılarak tekrar test edilir. 1/8'e kadar sulandırılan serum örneklerinde 1/4 sulandırmada aglutinasyon görülürse örnek pozitif kabul edilir.
8. Her testte pozitif ve negatif kontrol serumları, örneklerle birlikte test edilmelidir.
9. Test tamamlandıktan sonra fayanslar yıkanıp kurutulmalı ve daha sonraki kullanım için hazır hale getirilmelidir.

7.4. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

2 dakika içerisinde antijenin kolaylıkla görülebilen kümeleşmeler oluşturması test için pozitif, kümeleşme görülmemesi negatif kabul edilir. Her ne kadar belli bir uluslar arası standart olmasa da sürünün %10'unun pozitif reaksiyon verdiği durumlarda, özellikle de bu sonuç HI ve ELISA ilde doğrulanmışsa sürü pozitif kabul edilir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008), Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*), Bölüm 2.3.5.
- ☐ Electronic code of Federal Regulations (e-CFR Data is current as of November 29 2012) Title 9 Animals and Animal products. Part 147- Auxiliary Provisions on National Poultry Improvement Plan.
- ☐ Kullanılan ticari antijene ait kullanım klavuzu.
- ☐ Laboratory Biosafety Manual - Third Edition (<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>)

9.REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLI MİKOPLAZMA İNFEKSİYONLARININ (AVIAN MYCOPLASMOSIS) ELISA TESTİ İLE TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Bu prosedürde Teşhis Laboratuvarı'na gelen *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* şüpheli tavuk kan serumlarından ve *Mycoplasma meleagridis* şüpheli hindi kan serumlarından ya da damızlık veya ticari işletmelerden kontrol amaçlı gelen kan serumlarından MG, MS ve MM antikorlarının ELISA ile saptanabilmesi amaçlanmıştır.

2. UYGULAMA ALANI

MG, MS ve MM şüpheli tavuk ve hindi kan serumlarından ELISA yapılabilmesi için uygun alt yapısı bulunan Teşhis Laboratuvarlarında uygulanır.

ELISA testi tavuk ve hindi kan serumlarında MG, MS ve MM antikorlarının varlığını ortaya koymak için tarama testi olarak kullanılabilirdiği gibi SPA testinin sonuçlarını doğrulamak üzere alternatif bir test olarak kullanılabilir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

ELISA ile ilgili uyarı/önlemler/dikkat edilecek hususlar:

- ☐ Kit ve bütün reagentler 2-8°C'de muhafaza edilmelidir.
- ☐ Son kullanma tarihi geçmiş kitler ve ilgili reagentler kullanılmamalıdır.
- ☐ Farklı serilerdeki kitlerin malzemeleri ve reagentleri karıştırılarak kullanılmamalıdır.
- ☐ Her örnek için ayrı pipet ucu kullanılmalıdır.
- ☐ Substrat solusyonu oksidan ajanlarla ve kuvvetli ışığa maruz bırakılmamalıdır.

- ☐ Ağızla pipetleme yapılmamalıdır.
- ☐ Test sırasında çıkan atıklar toksik madde içerebildiğinden bunlar ayrı bir yerde toplanarak Atık İmha Prosedürüne göre imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

MG: *Mycoplasma gallisepticum*

MS : *Mycoplasma synoviae*

MM: *Mycoplasma meleagridis*

SPA: Serum pleyt aglütinasyon

HA: Hemaglutinasyon

HI: Hemglutınasyon İnhibisyon

HAU: Hemaglutinasyon Ünitesi

PBS: Phosphate Buffered Saline

ELISA: Enzim Linked Immunosorbent Assay

OD: Optical density

SPF: Spesifik Patojen Free

Antikor (Ab): Çok hücreli hayvansal organizmaların bağışıklık sistemi tarafından; kendi organizmalarına ait olmayan organik yapılara karşı geliştirilen glikoprotein yapısındaki moleküllerdir.

Antijen (Ag): Vücuda yabancı maddeler girdiği anda bağışıklık sistemince antikor oluşturulmasına neden olan moleküllerdir.

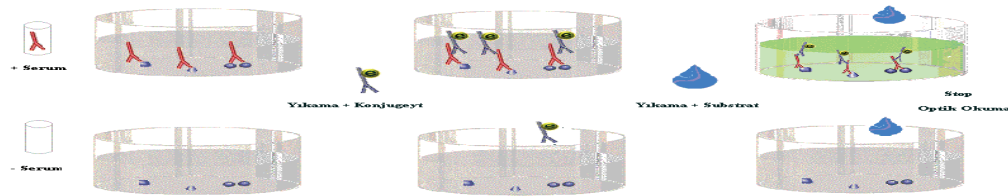
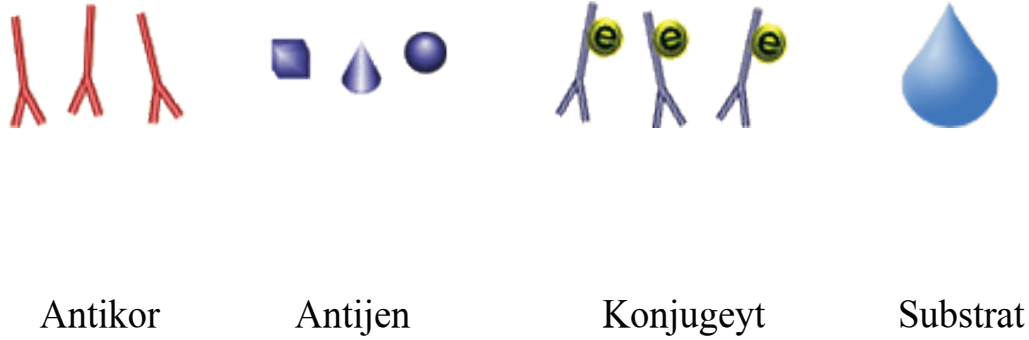
Konjugat: Bir enzim ile işaretlenmiş ikinci ajan, enzim ile işaretlenmiş antiglobülin.

Substrat: Biyokimyada enzimlerin tepkimelerinde işlenen maddelere verilen addır. ELISA'da konjugeypte bağlı olan enzime özgü alt tabakaya substrat denir. Sisteme (Ag-Ab kompleksi) bağlanmış konjugeypte bağlı enzim uygun kromojen substratı parçaladığında ortaya çıkan renk, yapılacak kolorimetrik yöntemlerle ölçülerek bağlanmış olan enzim; dolayısıyla bağlanmış olan antikor hakkında fikir verecektir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

MG, MS ve MM şüpheli tavuk ve hindi kan serumlarında bu etkene karşı oluşan antikorları tespit etmeye yönelik bir indirekt ELISA test yöntemidir. Bu yöntemle hastalığın serolojik tanısı yapılabildiği gibi antikor düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesi ve büyük sürülerin bağışıklık durumunun izlenmesi de mümkündür. ELISA, katı bir faza bağlı olarak Antijen-Antikor (Ag-Ab) kompleksinin oluşabilmesi ve enzim ile işaretlenmiş konjugat olarak isimlendirilen ikinci ajan ve

uygun bir substrat ile reaksiyon sonucunda renkli son ürün şeklinde Ag-Ab kompleksinin varlığın saptanması için uygulanan test metottur (**Tablo 1**).



Tablo 1. ELISA Test Metodu'nun Şematik Anlatımı.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Tavuk/Hindi kan serumu: Serolojik muayeneler için, test materyali sürüyü örnekleyecek miktarda alınan kanların pıhtılaştırıldıktan sonra çizilerek elde edilen kan serumlarıdır. Hemolizli kontamine vb serumlar test için kullanılmaz. Serumlar hemen test edilmeyecekse +4°C'de 3 gün süreyle -20°C'de yıllarca saklanabilir.

ELISA İçin Test serumlarının Sulandırılması: Teste alınacak numuneler test sulandırıcı tampon ile 1:500 oranında sulandırılır. İlk önce 5 µl serum 245 µl kitin sulandırma sıvısında sulandırılır ve 1/50 oranında sulandırma yapılmış olur. Sonra 1/50'li sulandırılan serumun 20 µl'si 180 µl kitin sulandırma sıvısında sulandırılır ve 1/10 oranında sulandırma yapılmış olur. Böylece 1/50*1/10 =1/500'lük sulandırma elde edilmiş olur.

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ Tek kanallı pipet (0.5-10µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)
- ☐ Çok kanallı pipet (05-100 µl)
- ☐ Tek kullanımlık pipet uçları
- ☐ Vortex
- ☐ Yıkama şişesi veya otomatik pleyt yıkayıcı
- ☐ Yapışkan pleyt bandı
- ☐ Numune sulandırma tüpleri
- ☐ Mikropleyt okuyucu (ELISA Reader)

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ MG, MS veya MM ile kaplanmış mikropleyt
- ☐ Kite ait MG, MS veya MM anikoru içeren pozitif kontrol serumu
- ☐ Kite ait Negatif kontrol serumu (MG, MM karşı antikor içermeyen tavuk kan serumu, veya MM'ye karşı antikor içermeyen hindi kan serumu)
- ☐ Konjugat
- ☐ Substrat
- ☐ Stop solüsyonu
- ☐ Numune sulandırıcı tampon
- ☐ Distile su
- ☐ Bazı kitlerde kitle beraber verilen Referans Serum
- ☐ Laboratuara ait Standart Pozitif Serum
- ☐ Laboratuara ait Standart Negatif Serum (SPF)

ELISA testi yapılırken kullanılacak kit bileşenleri kimyasal ve biyolojik maddelerden oluşur. Bunların bir kısmı kit içerisinde kullanıma hazır halde bulunmaktadır, diğer bir kısmı ise kullanımdan önce hazırlanması gerekir. Kullanımdan önce hazırlanması gereken reagentlerin dilusyonları kit protokolüne uygun olarak hazırlanır. Hazırlanan reagentlar kitte belirtilen süre ve sıcaklıkta saklanır.

Reagentlar kullanılmadan önce ısıları oda sıcaklığına (18-25°C) ulaşmaya kadar beklenmelidir. Test için uygun oda sıcaklığı ELISA Kitleri arasında farklılık gösterebilir.

7.4. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

1. Antijenle kaplanmış mikropleytlar alınır ve numune pozisyonuna göre test sonuç değerlendirme protokolüne numuneler (Ek 2) kaydedilir.
2. Kite ait negatif ve pozitif kontrol serumu uygun pleyt gözlerine kitin protokolüne uygun hacimde konur. (Örn: Negatif kontrol A1 ve A2 gözlerine, pozitif kontrol A3 ve A4 gözleri).

3. Bazı kitlerde bulunan referans kontrol serumu gözlerine kitin protokolüne uygun hacimde konur
4. Sulandırılmış test edilecek serum örneklerinden gözlerine kitin protokolüne uygun hacimde konur.
5. Üzeri kapatılmış olan pleyt kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürede inkübe edilir.
6. Süre sonunda içerik dökülür ve ELISA pleytinin her bir gözü test protokolünde önerilen konsantrasyonda hazırlanmış olan yıkama solusyonu ile 3-5 kez yıkanır.
7. Son yıkamadan sonra pleyt ters çevirilip kurutma kâğıdına vurularak kalan solüsyonun iyice emdirilmesi sağlanır.
8. Belirtilen hacimde Konjugat Solüsyonu tüm gözlere ilave edilir.
9. Üzeri kapatılmış olan pleyt kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürede inkübe edilir.
10. Yıkama prosedürü 5. ve 6. basamakta anlatıldığı gibi tekrarlanır.
11. Her göze protokole uygun miktarda Substrat Solüsyonu konur ve kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürede inkübe edilir
12. Reaksiyonu durdurmak için her göze belirtilen hacimde Stop Solüsyonu ilave edilir.
13. Test sonuçları bir ELISA okuyucuda kit protokülünde önerilen dalga boyunda okunur.

ELISA'da test edilen örnekler, pozitif, negatif ve referans kontrol gözleri için okunan OD değerleri ile kit protokolünde ve kitin kalite kontrol sertifikasında verilen OD değerleri karşılaştırılır, geçerli sınırlar içerisinde ise test edilen örnekler pozitif ve negatif şeklinde ifade edilerek kalitatif ve/veya kantitatif olarak değerlendirilir. Değerlendirmede kite ait hazır bilgisayar programları da kullanılabilir.

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

ELISA'da testte kullanılan pozitif, negatif ve varsa referans kontrollerin beklenen standart seviyelerde çıkması halinde test geçerli olarak kabul edilir. Referans serum yok ise laboratuvarın kendisine ait standart pozitif kontrol ve negatif kontrollerin beklenen değerler içinde olup olmadığı kontrol edilir. Kit protokolünde ve kitin kalite kontrol sertifikasında verilen OD değerleri ile ölçülen OD değerleri karşılaştırılarak testin geçerliliği kontrol edilir.

Değerlendirme sonuçları kaydedilir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ İdexx, Biocheck veya Synbiotics MG ELISA Kit kullanım kılavuzu
- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008), Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*), Bölüm 2.3.5.
- ☐ Laboratuvar Güvenliği ve ilk Yardım (www.kimyaevi.org Güvenlik Talimatı)
- ☐ Laboratory Biosafety Manual - Third Edition (<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>)

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLI MİKOPLAZMA İNFEKSİYONLARININ (AVIAN MYCOPLASMOSIS) HEMAGLUTİNASYON İNHİBİSYON TESTİ İLE TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Bu prosedürde Teşhis Laboratuvarı'na gelen *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* şüpheli tavuk kan serumlarından ve *Mycoplasma meleagridis* şüpheli hindi kan serumlarından ya da damızlık veya ticari işletmelerden kontrol amaçlı gelen kan serumlarından MG, MS ve MM antikorlarının varlığının Hemaglutinasyon İnhibisyon testi ile saptanabilmesi amaçlanmıştır.

2. UYGULAMA ALANI

Tavuk ve hindi kan serumlarında MG, MS ve MM'e karşı oluşan antikorlarının tespitinde kullanılır. Teşhis Laboratuvarlarında uygulanır.

HI testi, SPA testi ile pozitif bulunan kan serumlarında pozitifliğin teyidi amacı ile kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların infeksiyonuna yol açma riski nedeni ile infeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual", esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

MG: *Mycoplasma gallisepticum*

MS : *Mycoplasma synoviae*

MM: *Mycoplasma meleagridis*

SPA: Serum pleyt aglütinasyon

HA: Hemaglutinasyon

HI: Hemglutinasyon İnhibisyon

HAU: Hemaglutinasyon Ünitesi

PBS: Phosphate Buffered Saline

SPF: Spesifik Patojen Free

Antikor (Ab): Çok hücreli hayvansal organizmaların bağışıklık sistemi tarafından; kendi organizmalarına ait olmayan organik yapılara karşı geliştirilen glikoprotein yapısındaki moleküllerdir.

Antijen (Ag): Vücuda yabancı maddeler girdiği anda bağışıklık sistemince antikor oluşturulmasına neden olan moleküllerdir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Laboratuvara gelen tavuk kan serumlarından MG ve MS ve hindi kan serumlarından MM'ye karşı oluşmuş antikorların varlığını ortaya koymak için uygulanan hemaglutinasyon İnhibisyon testini içerir.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Tavuk/Hindi kan serumu: Serolojik muayeneler için, test materyali sürüyü örnekleyecek miktarda alınan kanların pıhtılaştırıldıktan sonra çizilerek elde edilen kan serumlarıdır. Hemolizli kontamine vb. serumlar test için kullanılmaz. Serumlar hemen test edilmeyecekse +4°C'de 3 gün süreyle -20°C'de yıllarca saklanabilir.

Biyolojik maddeler

Pozitif ve Negatif Kontrol Serumları: Ticari olarak temin edilen MG, MS ve MM karşı antikor titresi bilinen antiserumlar pozitif kontrol olarak kullanılmalıdır (Hangi hayvana ait kan serumları test edilecek ise o hayvana ait kontrol serumları kullanılmalıdır). SPF ya da MG, MS ve MM antikorlu içermeyen negatif kontrol serumu negatif kontrol olarak (Hangi hayvana ait kan serumları test edilecek ise o hayvana ait kontrol serumları) kullanılmalıdır.

Standart Antijen: Antijen olarak taze sıvı kültür ya da yıkanmış ve konsantre edilmiş PBS içindeki bakteri süspansiyonu kullanılabilir. Ancak antijen hazırlamada ve standardizasyonundaki güçlükler nedeniyle işletme içi metotlarla hazırlanan antijen yerine iyi standardize edilmiş ve ticari olarak temin edilebilecek antijenler tercih edilmelidir. (Örn: NVSL). Liyofilize antijen üreticinin bildirdiği şekilde distile su ile sulandırılır. Stok antijen olarak uygun koşullarda saklanır.

Yıkanmış Eritrosit: % 0.5'lik yıkanmış eritrosit solüsyonu (test serumları hangi kanatlıya ait ise eritrositler de aynı kanatlı türüne ait *Mycoplasma* antikorlu taşımadığı bilinen hayvanlardan alınmalıdır.)

PBS: İzotonik Phosphate Buffered Saline (PBS) : pH 7.00

Alsever Solüsyonu : 100 ml solüsyon hazırlanırken aşağıdaki belirtilen basmaklar izlenir:

Sitrik asit: 0.055 gr

Sodyum sitrat 0.8 gr

D-Glucose: 10.25 gr

NaCl: 2.10 gr

Distile su: 100 ml

Bu formüle göre 100 ml distile su içerisinde tüm reagentler çözündürülüp, hazırlanır ve şişelere taksim edilir. Ardından 116°C'de 10 dakika otoklavda sterilize edilir. Sterilite kontrolü açısından 37°C'de bir gece inkübe edildikten sonra +4°C'de saklanır.

% 0.5'lik Yıkanmış Tavuk Eritrositi:

2-5 ml'lik enjektöre alınacak kan miktarı kadar alsever solüsyonu (Antikoagulan madde) çekilir. En az 3 tavuğun (Düzenli takip edilen MG/MS/MM antikor negatif sürüye ait) kanat altı venası ya da kalbinden kan alındıktan sonra enjektör yavaşça döndürülerek kanın alsever solüsyonu ile iyice karışması sağlanır

Kan, enjektörden konik dipli santrifüj tüpüne yavaşça aktarılır. Bu kan 1000-1500 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edilir ve ayrılan süpernatant dikkatlice pipetle çekilir. Tüp, alınan hacim kadar PBS ile doldurulur. Daha sonra yavaşça alt üst edilerek kanın PBS ile iyice karışması sağlanır, 1000-1500 devirde 5 dakika santrifüj edilir ve üstteki berrak sıvı atılır. Bu yıkama işlemi en az 3 kez tekrarlanır. Son yıkamadan sonra üstte kalan berrak sıvı dikkatlice alındıktan sonra dipte kalan eritrosit çöktetisinden %0.5'lik eritrositi suspansiyonu hazırlanır. Eritrositi suspansiyonu kullanılmak üzere +4°C'de 8-10 gün saklanabilir.

7.2. Kullanılan Ekipman

- ☐ 96 gözlü V tabanlı mikropleyt,
- ☐ 25-100 µl otomatik mikropipetler ve uçları,
- ☐ Pipet ve şarjlı pipetor
- ☐ Değişik ölçülerde vidalı kapaklı şişeler
- ☐ Santrifüj
- ☐ Enjektör
- ☐ Santrifüj tüpü
- ☐ Buzdolabı
- ☐ Laboratuvar saati

7.3. Numunenin hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

Çalışma Antijeninin HA titresinin belirlenmesi:

HI testinde kullanılacak antijen solüsyonunun hazırlanabilmesi için öncelikle antijenin

hemaglutinasyon (HA) titresinin belirlenmesi gerekmektedir. Test antijeninin hazırlanmasında aşağıdaki basamaklar takip edilir:

1. Kullanılacak antijen liyofilize ise hazırlık aşamasında belirtildiği şekilde sulandırılır. Daha önceden sulandırılmış antijen kullanılacaksa ve antijen bölünmüş küçük miktarlarda ise bunlar havuz yapıldıktan sonra kullanılmalıdır. Test için antijenin 1/10 dilusyonu kullanılır.
2. V tabanlı mikropleytin 3 sırasına 1'den 12. göze kadar her göze 50 µl PBS konur.
3. İlk 2 sıranın ilk gözlerine 50 µl antijen konduktan sonra son göze kadar 2 katlı sulandırması yapılır son gözdeki 50 µl atılır.
4. Pleytin 3 sırasının bütün gözlerine 50 µl % 0.5'lik yıkanmış tavuk eritrositi ilave edilir.
5. 3. Sıra eritrosit kontrol sırası olarak kullanılır.
6. Hafifçe pleytin kenarına vurularak her gözün içeriğinin karışması sağlanır.
7. Pleyt oda sıcaklığında 30 dk. inkube edilir. Eritrosit kontrol gözünde düğme şeklinde eritrositlerin çöktüğünden emin olmak gerekir.
8. Eritrositlerin tamamının aglutine olduğu gözlerden en yüksek dilusyon Hemaglutinasyon titresini verir.
9. HI için istenen 8HAU ve 4 HAU hesaplamak için HA titresi sırasıyla 8 ve 4'e bölünür. Çıkan sonuç bize antijeni ne kadar sulandıracağımızı gösterir.
10. HI testinde kullanmak üzere antijen 8HAU veya 4 HAU oranında PBS ile sulandırılır.
11. Sulandırılan antijen için yukarıdaki basamaklar tekrar uygulanır. Bu sefer 6. göze kadar çalışılır. Sonuçta 4. göze kadar HA görülmesi beklenir. Sonuç istenildiği gibi olmazsa antijen yeniden sulandırılarak 4HAU elde edinceye kadar yukarıdaki basamaklar tekrarlanır. Sonuç alındığı takdirde istenilen oranda 4HAU oranında sulandırılan antijen HI testinde kullanılır.

HI testinin yapılışı:

1. Test edilecek serum örnekleri ve pozitif ve negatif kontrol serumları antijen geri titrasyonu için pleytin A gözünden başlayarak sırasıyla H gözüne kadar 8 sıra kullanılır.
2. Her sıranın ilk gözüne 50 µl PBS konur.
3. Her sıranın 2. gözlerine 50 µl 8HAU antijen ve 3.gözden 8. göze kadar ise 50'şer µl 4HAU antijen konur.
4. İlk göze önceden 1/5 sulandırılmış serumdan 50 µl konur iyice karıştırıldıktan sonra 2. göze aktarılır sıranın sonuna kadar dilusyon yapılır ve 50 µl atılır.
5. Antijen kontrolü için 6 göz kullanılır. 2.-6 arasındaki gözlere 50 µl PBS konur. 1.ve 2. gözlere 50 µl 8HAU antijenden 50 µl ilave edilir. 2. Gözün içeriği iyice karıştırıldıktan sonra 50 µl si 3.göze ve sırasıyla 6. göze kadar dilusyon yapılır kalan 50 µl atılır. Kalan 2 göz (7. Ve 8. göz)eritrosit kontrol olarak kullanılmak üzere 50 µl PBS konur. Pleyt kenarına hafifçe vurularak her gözün içeriğinin karışması sağlanır. Bütün gözlere 50 µl % 0.5'lik yıkanmış tavuk eritrositi ilave edilir.

6. Pleyt oda sıcaklığında yaklaşık 50 dk. veya 4HAU antijen titrasyonu okunabildiği zamana kadar beklenir.
7. HA'un tam olarak inhibe edildiği dilusyon HI titresi olarak belirlenir.

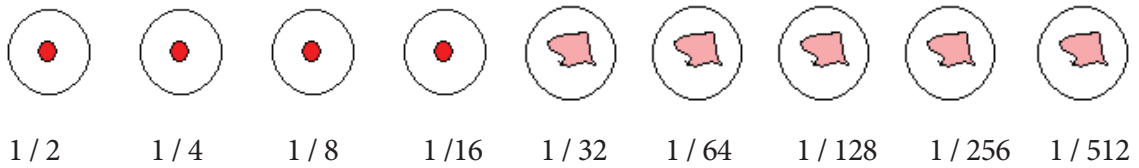
7.4. Sonuçların Değerlendirilmesi:

HI Testinin geçerli olabilmesi için:

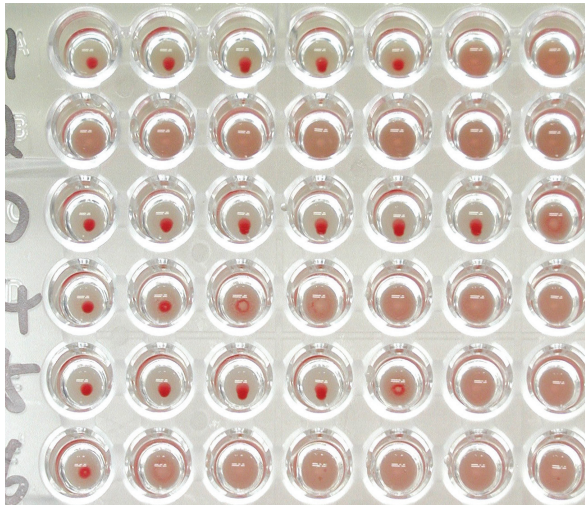
- ☐ Serum kontrolde (Test edilen serumların ilk gözü) eritrositlerde nonspesifik aglütinasyon ya da hemoliz olmamalıdır. Nonspesifik HA durumunda test serumundaki non spesifik hemaglutininlerin giderilmesi ve testin tekrar yapılması gerekir. Bu amaçla 1 ml test edilecek serumun üzerine 6-8 damla eritrosit peleti damlatılır. 37°C'de 10 dk inkube edildikten sonra santrifüj edilerek eritrosit peleti uzaklaştırılır. Süpernatant testde kullanılır.
- ☐ Pozitif kontrol serumun daha önce belirlenen titrelerinin birinde sonuç vermesi gerekir.
- ☐ Negatif kontrol serum negatif olmalıdır.
- ☐ Antijenin geri sulandırmasında titre 1:4 ya da 1:8 olmalıdır.
- ☐ Test sonunda 1/80 pozitif 1/40 titre ise şüpheli kabul edilir.

İnhibisyon (düğme formasyonu) olan gözler = Pozitif

İnhibisyon (düğme formasyonu) olmayan, dantela tarzında kalan gözler = Negatif olarak ifade edilir.



Şema 1 : HI (+) Test Sonucu Şematik Görüntü



HI (+)

HI (-)

HI (+)

HI (-)

HI (+)

HI (-)

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008), Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*), Bölüm 2.3.5.
- ☐ Electronic code of Federal Regulations (e-CFR Data is current as of November 29 2012)
- ☐ Title 9 Animals and Animal products. Part 147- Auxiliary Provisions on National Poultry Improvement Plan.
- ☐ Laboratory Biosafety Manual - Third Edition (<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>)

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLI TÜBERKÜLOZ (AVIAN TUBERCULOSIS) ETKENLERİNİN İZOLASYONU

1. AMAÇ

Kanatlılara ait Tüberküloz şüpheli doku ve diğer materyallerden boyama yaparak bakteriyoskopi ve *Mycobacterium* spp. izolasyonu amaçlanmıştır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu Avian Tuberculosis'in teşhisinde kullanılır. Tüm Teşhis Laboratuvarlarında geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

LJ: Lowenstein-Jensen

TSS: Trisodyum Sitrat

UV: Ultraviyole

AF: Aside dirençli (asit fast).

HCl: Hidroklorik Asit

NaOH: Sodyum hidroksit

ZN : Ziehl-Neelsen

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Avian Tuberculosis etiyolojisinde pek çok *Mycobacterium* türünü içermekle birlikte hastalığa neden olan en yaygın tür *M. avium* complex (serotip 1, 2 ve 3) ile *M. genavense*'dir.

Bir kanatlı sürüsünde (kümeste) tüberküloz için karakterisitk klinik bulgunun gözlendiği, post mortem muayenede tipik lezyonların görülmesi durumunda alınan smear örneğinden veya etkilenmiş doku örneklerinden yapılacak Ziehl-Neelsen boyamada asit fast bakterilerin görülmesi teşhis için yeterlidir.

Teşhis, doku materyalleri ve klinik örneklerinden yayma preparat hazırlanarak tüberküloz basillerinin (asit-alkaliye dirençli) direkt olarak saptanması ve etken izolasyonu esasına dayanır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1 Materyal

Karaciğer ve dalak en uygun organlardır. Ancak karkasta otoliz şekillendiği durumlarda kemik iliği de kullanılabilir.

7.2. Kullanılan ekipman

- ☐ Lam
- ☐ Steril bıçak, pens, spatül, öze v.b. malzemeler
- ☐ Sterilizatör ($160\pm 5^{\circ}\text{C}$)
- ☐ Bunzen beki
- ☐ UV
- ☐ Otomatik pipet ve steril pipet ucu
- ☐ Boyama sehpa
- ☐ Şale
- ☐ Pamuk
- ☐ Kurutma sehpa
- ☐ Su banyosu ($80-100^{\circ}\text{C}$)
- ☐ Standart laboratuvar cam malzemesi
- ☐ Havan
- ☐ Filtre kağıdı
- ☐ Mikroskop
- ☐ pH metre- Fayans (Cam ya da mika yüzeyler de kullanılabilir).
- ☐ Mikropipet karıştırıcı
- ☐ Homojenizatör
- ☐ Biyogüvenlik Kabini

- ☐ Falcon tüp (50 ml lik)
- ☐ Vorteks
- ☐ Santrifüj
- ☐ Pipetör
- ☐ 5-10'luk steril pipetler
- ☐ Eldiven- Maske
- ☐ İnkubatör (37°C'lik)

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ Bazik Fuksin
- ☐ Fenol Kristalize
- ☐ % 95'lik Etil alkol
- ☐ HCl
- ☐ Metilen Mavisi
- ☐ Kristalize Asit Fenik
- ☐ Distile su
- ☐ NaOH
- ☐ TSS
- ☐ Sodyum monohidrojen fosfat (Na_2HPO_4)
- ☐ Potasyum dihidrojenfosfat (KH_2PO_4)
- ☐ Distile su
- ☐ N-asetil-L-sistein

7.4. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

Bakteriyoskopi :

- ☐ Doku materyali veya diğer klinik örneklerden lamlara ince bir tabaka şeklinde yayma yapılır.
- ☐ Preparat uygun bir yerde kurumaya bırakılır. Olanak varsa kurutma işlemi UV ışığı olan kapalı bir kabinde yapılmalıdır.
- ☐ Kurumuş preparatlar kuvvetlice bir alevden çok hızlı ve çok yavaş olmayacak bir şekilde 2-3 kez geçirilerek tespit edilir.
- ☐ Tespit edilen preparat soğuduktan sonra boyanır.

Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemi

- ☐ Fikse edilen lamlar boya sehpası üzerine dizilir.
- ☐ Lamların üzeri süzgeç kağıdı huniden süzülerek füksinle kaplanır.

- ☐ Bir tel ucuna sarılmış, alkole batırılıp yakılmış pamukla lamalar alttan ısıtılır. Bu ısıtma sırasında boya kristallerinin çökmesine neden olan kaynatmamaya dikkat edilmelidir.
- ☐ Boya soğumaya, çıkan buhar kaybolmaya başlayınca işlem tekrarlanır. Isıtma bu şekilde 3 kez yapılır.
- ☐ Tekrar boyama sehпасına konulan lamaların üzeri metilen mavisi ile kaplanır. 20-30 sn. beklenir. Bu süre sonunda boya dökülür.
- ☐ Tekrar distile su ile yıkanır. Kurutma sehпасına dizilip kurumaya terk edilir.
- ☐ İmmersion mikroskopta asit-fast basil aranır.

Etken İzolasyonu:

NaOH- N-Asetil-L-Sistein Yöntemi

- ☐ Gelen marazi maddeler steril bisturi veya makas ve pens yardımı ile parçalanır.
- ☐ Steril distile su steril kumla havanda ezilir. Homojenizatör varsa steril su ile homojenizatörde parçalanır. Üstteki sıvı 50 ml'lik falcon tüplere alınır.
- ☐ Üzeri tülbentli behere süzöldükten sonra 50 ml'lik falcon tüplere alınır.
- ☐ Üzerine aynı miktarda sodyum hidroksit-trisodyum sitrat (NaOH-TSS) N-asetil-L-Sistein çözeltisi eklenir.
- ☐ Tüpün kapağı kapatıldıktan sonra iyice çalkalanarak oda ısısında 15 dakika tutulur.
- ☐ Bu süre 15 dakikayı aşmamalıdır. Bekleme süresi dolan numuneye; tüpün ağzına 1-2 cm kalacak şekilde fosfat tampon eklenir.
- ☐ Tüpün ağzı sıkıca kapatılır. Birkaç kez tüp baş aşağı çevrilerek karışması sağlanır.
- ☐ Yoğunlaştırma amacıyla numune 3600xg'de 15 dakika santrifüj edilir.
- ☐ Üstteki sıvı kısım dikkatlice kirli kabına dökülür ve geri kalan çökelti 1-2 ml hacme ulaşacak şekilde fosfat tamponu ile süspansiyon haline getirilir. (Kirli kabında toplanan sıvıya 1/10 oranında çamaşır suyu ilave edilerek etken öldürülür.)

Hazırlanan numunenin bir damlası preparat hazırlamada kullanılır. Geri kalan kısımdan 2'şer adet gliserinli ve gliserinsiz LJ besiyerine inokulasyon yapılır. Kültürler en az 8 hafta 37°C de ve 42°C'de tutulur. İnkubasyon sırasında kurumaya engel olmak için tüp kapakları sıkıca kapatılmalıdır. Kültürlerin 4. ve 7. gününde ilk kontrolleri yapılır. Daha sonra haftalık kontroller yapılır. *M. avium* hem gliserinli hem de gliserinsiz besiyerinde üreyebilir ancak gliserinli ortamda daha iyi üreme gösterir. Tipik *M. avium* bakterisi 2-4 hafta içinde S tipli koloniler meydana getirir. Rough varyant suşları da mevcuttur. *M. avium* diğer *Mycobacterium* türlerinden farklı olarak 42°C'de üreme gösterir. Üreme görüldüğünde buradan yayma preparat hazırlanarak ZN'le boyama yapılır.

M. avium LJ besiyeri dışında Herrold's Medium,, Middlebrok 7H10 ve 7H11 veya %1 sodium pyruvate eklenmiş Coletsos besiyerlerinde de iyi üreme gösterir.

Biyokimyasal testler**Tablo-1.** *Mycobacterium* türlerinin ayrımı.

	<i>M. avium</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>
Gliserinli besiyerinde üreme tipi ve koloni formu	Eugonic, beyazımsı gri, yapışkan ve kolaylıkla ayrılabilen koloniler	Eugonic,, rough , sert ten rengi, kolonilerin ayrılması güç	Disgonik, küçük, nemli-parlak, kolaylıkla ayrılabilen koloniler
Üreme zamanı	2-6 hafta	3-8 hafta	3-8 hafta
Gliserin ihtiyacı	+	+	- üremeyi inhibe eder
%0.4 sodium pyruvate bulunan ortamda üremenin indüklenmesi	-	-	+
Niacin üretimi	-	+	-
Pyrazinaminidase	-	+	-
Ürease	-	+	+
Nitrat	-	+	-
TCH (10mg/ml) Duyarlılığı	-	-	+

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

Nekropside tipik tüberküloz lezyonlarının görülmesi, lezyonlu dokulardan yapılan Ziehl-Neelsen boyamada aside dirençli basillerin görülmesi göre karar verilir. Histopatoloji ile doğrulanır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008), Avian Tuberculosis, Bölüm 2.3.5.
- ☐ Quinn P. J., Carter M. E., Markey B., and Carter G. R.(1994) Clinical Veterinary Microbiology chapter 12 Wolf Publishing in Spain
- ☐ T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı “ Tüberküloz Laboratuvar Rehberi”.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLILARDA AVIAN CHLAMYDIOSIS'İN TESPİTİ

1. AMAÇ

Kanatlı Hastalıkları Teşhis laboratuvarına gelen kanatlı ölen hayvanların aseptik koşullar altında alınan oküler ve nazal eksudat, lezyonlu organların içindeki veya çevresindeki yangısal veya fibrinöz eksudat, tam kan, akciğer, pericard, karaciğer, dalak, böbrek ve diare seyreden vakalarda kolon içeriği ve dışkıdan, canlı hayvanlardan faringial ve nazal sıvaplardan etkenin izolasyonu ve hazırlanan preparatlarda stamp boyama (Modifiye Ziehl–Neelsen yöntemi) ile etkenlerin tespitinde kullanılır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu Tavuk Hastalıkları Teşhis laboratuvarında uygulanmaktadır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile infekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solusyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

5. TANIMLAR

***Chlamydomphila* spp.:** İnsan, memeli hayvanlar ve kanatlılarda Chlamydiosis'e neden olan etkenlerdir.

AC: Avian chlamydiosis, evcil kanatlıların, özellikle, hindi, güvercin, ördek, daha az olarak da tavukların, psittacinae familyasına ait kanatlıların (muhabbet kuşları, papağan, kanarya, vs.) ve yabani kuşların, *Chlamydomphila psittaci*'den ileri gelen solunum, sindirim ve sinir sistemlerine, göze ve eklemlere yerleşerek gizli, akut, subakut, kronik ve asemptomatik enfeksiyonlara, bazende ölümlere yol açan bulaşıcı bakteriyel bir hastalıdır.

SPF : Spesifik patojen free

ETY: Embryolu tavuk yumurtası

SPG: Sucrose/phosphate/glutamate

PBS: Fosfat Bufferli Tuzlu Su

6. METODUN KISA TANIMI

Chlamydophila'ların izolasyonu inokulumun 6-7 günlük SPF yumurtanın yumurta sarısına inokulasyonu ve ETY'nın yumurta sarı kesesi membranından direk froti çekilerek hazırlanan preparatlarda stamp boyama (Modifiye Ziehl–Neelsen yöntemi) ile etkenlerin tespiti.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Kanatlı Hastalıkları Teşhis laboratuvarına gelen kanatlı ölen hayvanların aseptik koşullar altında alınan oküler ve nazal eksudat, lezyonlu organların içindeki veya çevresindeki yangısal veya fibrinöz eksudat, tam kan, akciğer, perikard, karaciğer, dalak, böbrek ve diyare seyreden vakalarda kolon içeriği ve dışkıdan, canlı hayvanlardan farengeal ve nazal sıvılar örneklenerek soğuk zincirde laboratuvara gönderilmelidir.

7.2. Kullanılan ekipman

- ☐ Mikroskop
- ☐ Diseksiyon seti
- ☐ Inkubatör 37-39°C
- ☐ Buzdolabı
- ☐ Küçük eğri makas
- ☐ Küçük pens
- ☐ Ovoskop
- ☐ Violler , Yumurta süporları
- ☐ Santrifüj
- ☐ Steril santrifüj tüpleri
- ☐ Yumurta kabuğunu delme vasıtaları
- ☐ Steril enjektör 5 ml.lik
- ☐ İğne No:23,32 mm.
- ☐ Havan
- ☐ Steril kum
- ☐ Ph kağıdı
- ☐ Pamuk

7.3. Kullanılan Materyal

- ☐ Entellan
- ☐ Tentürdiyot
- ☐ Fosfat bufferli tuzlu su
- ☐ Karbol fuksin (1/10)
- ☐ Malaşit yeşili (%1)
- ☐ Asetik asit (%0.5)
- ☐ SPG Buffer
- ☐ 1/10 alkolde dilüe edilmiş tentürdiyot
- ☐ Vancomycin
- ☐ Streptomycin
- ☐ SPF yumurta

7.4. Kullanılan besi yerleri

FOSFAT BUFFERLİ TUZLU SU (PBS.VP.01)

NaCl	8 g.
K ₂ HPO ₄	1.21 g.
KH ₂ PO ₄	0.34 g.
Distile su	1000 cc.
pH	7.2

Maddeler distile su içinde sıra ile ve çalkalanarak eritilir ve pH ayarlandıktan sonra otoklavda sterilize edilir.

FUKSİN BOYASI (Fuk.VP.02)

1. Stok solüsyon

Bazik fuksin	3 g.
Alkol (%95)	100 cc.

Bazik fuksin havanda alkolle ezilip eritildikten sonra bir şişe içerisinde 4-5 saat çalkalanır ve 24 saat bekletildikten sonra filtre kağıdından süzülür ve cam kapaklı şişelerde saklanır.

2. Kullanma solüsyonu (karbol fuksin) (KarFuk.VP.03)

Bazik fuchsins (stok sol.)	10cc.
Distile su (%5 fenollü)	100 cc.

Önce distile su içine %5 oranında fenol konur ve karıştırılır, sonra stok bazik fuchsins solüsyonu katılır ve iyice karıştırılır. Bir gün bekletildikten sonra filtre kağıdından süzülerek cam kapaklı şişelerde muhafaza edilir.

MALAŞİT YEŞİLİ (Mlş.VP.04)

Malaşit yeşili	1 g.
Distile su	100 cc.

Malaşit yeşili havana konur, distile su azar azar ilave edilerek ezilir ve şişeye alınır. Sonra suyun bir kısmı tekrar havana ilave edilerek havan yıkanır ve tekrar şişeye alınır. Bir gün bekledildikten sonra süzülür ve şişelerde saklanır.

SPG BUFFER (SPG.Buf.VP.05)

Sucrose	74.6 g.
KH ₂ PO ₄	0.512 g.
K ₂ HPO ₄	1.237 g.
L-glutamic acid	0.721g.
Distile su	1 lt.

Otoklav ile yada filtre ile sterilize edilebilir. % 10 oranında fetal calf serum, 200-500 µg/ml vancomycin, ve streptomycin, 50 µg/ml nystatin ve gentamicin eklenir

TENTÜRDİYOT (Tnt.VP.06)

7.5. Metot

Enfekte dokuların tuşe preparatları tespit edildikten sonra Stamp boyama tekniği ile boyanıp mikroskopta incelendiğinde kırmızı renkte ve noktacıklar halinde görülür.

Dokulardan gerekli miktar alınıp küçük parçalar şeklinde kesilerek steril havan içerisine aktarılır. Üzerine steril kum ve kumu ıslatacak kadar buyyon ilave edilerek koyu kıvamda bir emülsiyon oluncaya kadar ezilir. Doku parçaları fosfat bufferli tuzlu su ile 1/20 oranında aseptik şartlarda suspanse edilir. Kontaminasyon ihtimalini ortadan kaldırmak için süspansiyonun her ml. sine 1 gr. Streptomisin, vancomycin ve kanamycin katılıp 1000 dev/dk'da 10 dakika santrifüj edilir. Üst sıvı alınır ve tekrar santrifüj edilerek şimoyoterapotiklere etkiye fırsatı tanımak üzere +5°C'de 24 saat bekletilir. Bu inokulum ETY'na inokülasyonudur.

Dışkı örnekleri antibiyotikle homojenize edildikten sonra 500g'de 20 dk. santrifüj edilir. yüzeydeki ve dipteki tabaka atılır. Supernatant sıvı toplanır ve tekrar santrifüje edilir. İnokulasyon için final supernatant sıvı kullanılır.

AC'nın izolasyonu için en uygun ve kolay bulunabilecek materyal ETY'dır. İnokulasyondan önce uygun nitelikte yumurtalar 37°C'de ve %75-80 civarındaki nemli kuluçka etüvlerindeki süporlara hava keseleri üstte kalacak şekilde yerleştirilir. Üzerlerine inkübasyon başlangıç tarihleri not edilir.

Ovoskopta yumurtaların hava boşluğu sınırı ve yumurta sarısı kesesinin bulunduğu yada embryonun bulunduğu kısmın aksi tarafı belirlenir. Hava boşluğundan, yumurta sarısı üzerine gelen bölge dezenfekte edilir. ve bir delik açılır. Yumurta sarı kesesi membranı, chlamydial gelişmenin primer bölgesi olduğundan inokulasyon için yumurta sarı kesesi seçilir. 6-7 günlük

ETY'nın sarı kesesi içine 0.5 ml kadar yukarıda hazırlanan inokulum sıvısı enjekte edilir. Usulüne uygun kapatılan delikler üstte kalmak üzere 39°C'de nemli atmosferde inkübe edilir ve çevrilmez. Yumurtalar günde iki kez kontrol edilirler İlk 24 saat içersinde ölenler atılır. Organizmanın çoğalması genellikle 3-10 günde embriyonun ölümüne sebep olur. Eğer ölüm yoksa örneği negatif olarak kabul etmeden önce iki kör pasaj yapılır. Yumurta sarı kesesi membranında tipik damarlanmayı ve kanlanmayı artırır. Bunlar toplanır ve %20 SPG buffer ile homojenize edilerek dondurulur veya tekrar yumurtaya inoküle edilir.

Organizma infekte yumurta kesesi membranından hazırlanan antijenin direk froti çekilerek stamp boyama tekniği ile boyanır.

Stamp Boyama Tekniği

- ☐ Preparat hazırlanır, kurutulur ve tespit edilir.
- ☐ Karbol füksin (1/10) ile 10 dakika boyanır.
- ☐ Asetik asit (% 0.5) ile yıkanarak boya giderilir.
- ☐ Su ile yıkanır.
- ☐ Malaşit yeşili (% 1) ile 15-20 saniye boyanır.
- ☐ Su ile yıkanır, kurutulur ve immersiyonla bakılır.

7.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

Chlamydomphila'lar stoplazma içinde ve dışında kırmızı renkte noktacıklar halinde tek tek veya kümeler halinde görülür.

8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012), Avian Chlamydiosis, Bölüm 2.3.1.
- ARDA, M., MİMBAY, A., AYDIN, N., AKAY, Ö., İZGÜR, M., YARDIMCI, H., ESENDAL, Ö.M., ERDEĞER, J., AKAN, M. (2002) Avian chlamydiosis. Kanatlı Hayvan Hastalıkları, Medisan yayın Serisi:50 Ankara, 95-99.
- GÜVEN, S., SARISAYIN, F., NADAS, Ü.G., DEMİRÖZÜ, K. (1983) Klamidial infeksiyonlar. Yumurta İnokulasyonları. Kanatlı Hayvanların İnfeksiyon Hastalıkları ve Laboratuvar Teşhis Yöntemleri, PendikVet. Kont. Arşt. Enst. Yayınları No: 7 İstanbul, 58-64, 229-242.
- ARDA, M. (2000) Boyama Yöntemleri. Boya Solüsyonları. Temel Mikrobiyoloji, Medisan yayın Serisi:46 Ankara, 289-290.
- ÖZTÜRK F. (2002) Virusların Üretilmeleri, Embriyolu Tavuk Yumurtaları, Genel Viroloji Konya, 51-60.

9. GÜNCELLEME

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

