

Aşılanmış Tavuklarda Newcastle Hastalığı Virüsü Antikorlarının HI ve ELISA Testleri ile Saptanması

Nejat AYDIN

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji ABD, Kayseri-TÜRKİYE

Hakan YARDIMCI

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji ABD, Ankara-TÜRKİYE

K. Semih GÜMÜŞSOY

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji ABD, Kayseri-TÜRKİYE

Belgin ERDEM

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji ABD, Ankara-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 25.01.1999

Özet : Bu çalışmada, tavuklarda Newcastle hastalığı virüsü antikorlarının deneme hayvanları ve aşıli sürülerde HI testi ve ELISA ile saptanması ve test sonuçlarının karşılaştırılması amaçlandı. ELISA'da Newcastle hastalığı virüsü LaSota suşundan metanol presipitasyon yöntemi ile hazırlanan antijen, peroksidaz enzimi ile işaretli anti tavuk IgG konjugatı ve substrat olarak orto-fenilendiamin kullanıldı. Negatiflik eşiği 490 nm dalga boyunda optik dansite (OD) 0.19 olarak belirlendi. Deneme grubundaki 50 hayvanın yanısıra 21 işletmeye ait broyler, yumurtacı ve damızlık sürülerden temin edilen toplam 504 tavuk serumunun tümü HI testi ve ELISA ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak ($p < 0.001$), deneme ve test gruplarının HI testi ve ELISA sonuçları arasında pozitif korelasyon saptandı (sırasıyla, $r=0.97$ ve 0.87) ve t-testinde önemli fark bulundu. Pozitifleri saptamada 504 serumdan 1'i (%0.2) hariç uygunluk görüldü.

Anahtar Sözcükler: Newcastle, ELISA, HI, tavuk

The Diagnosis of Antibodies Against Newcastle Disease Virus by HI and ELISA Tests in Vaccinated Chickens

Abstract : The aim of this study was to determine serum antibody levels against the Newcastle disease virus in vaccinated chicken flocks in addition to experimental animals by hemagglutination inhibition (HI) test and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and compare the results. Methanol-precipitated antigen prepared from the LaSota strain of Newcastle disease virus was used with peroxidase-labelled rabbit anti-chicken IgG as a conjugate and ortho-phenylenediamine as a substrate in ELISA. The negative threshold was found to be an optical density of 0.19 (OD) at a 490-nm wavelength. In addition to the 50 experimental animals, a total of 504 chicken sera (broiler, layer and breeder flocks) collected from 21 farms were tested (both HI and ELISA). The results of HI and ELISA were found to be positively correlated, and the t-test was significant in both experimental and test groups ($r=0.97$ and 0.87 respectively) upon statistical evaluation ($p < 0.001$). All the 504 sera except 1 (0.2 %) demonstrated suitable positivity.

Key Words: Newcastle, ELISA, HI, chicken

Giriş

Newcastle hastalığı kanatlıların solunum, sindirim ve sinir sistemlerinde bozukluklarla seyreden, çok bulaşıcı ve öldürücü viral bir hastalıktır (1,2). Günümüzde de kanatlı hayvan yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede ciddi kayıplara neden olmaktadır (3,4). İnfeksiyonun tanısında serolojik testler (HI, ELISA, virus nötralizasyon, agar jel presipitasyon-AGP, fluoresans antikor tekniği-FAT, immunperoksidaz), ve virus izolasyonu oldukça önem

taşımaktadır. Bu testlerden HI testi gerek infeksiyon ve gerekse hayvanlarda aşılama sonucu oluşan antikor titresini belirlemek amacıyla laboratuvarlarda uzun zamandır yaygın olarak kullanılmaktadır. (2,5, 6, 7). Ancak, son yıllarda ELISA, Newcastle hastalığının da dahil olduğu ekonomik açıdan önemli kanatlı hayvan hastalıklarının tanısında standart bir teknik olarak kullanılmaya başlamıştır (7,8,9). Aynı anda pek çok materyali semi otomatik bir sistemle değerlendirebilmesi,

özellikle saha tarama çalışmalarında ve sürülerin bağışıklık durumlarının belirlenmesinde tercih nedenlerinden biri olmuştur (10).Gerek ticari kit olarak gerekse standart yöntemlerle uygulanan bu tekniğin birçok araştırmacı tarafından duyarlı ve spesifik olduğu bildirilmiştir (8,11,12,13). Bu testlerde antijen genellikle virüsle infekte edilmiş embriyolu tavuk yumurtalarının korioallantoik sıvısından elde edilmiştir. Virus değişik kimyasal maddelerle yüksek devirde santrifüj işlemi (sukroz veya sodyum tartarat gradient) veya presipitasyon (metanol) yöntemleri ile konsantre edildikten sonra ELISA antijeni olarak kullanılmıştır (11,12,14,15).

Bu çalışmada, tavuklarda Newcastle hastalığı virusu antikorlarının deneme hayvanları ve aşıli sürülerde HI testi ve ELISA ile saptanması ve test sonuçlarının karşılaştırılması amaçlandı

Materyal ve Metod

Deneme hayvanları : Çalışmada kullanılan 100 adet kahverengi yumurtacı günlük civciv özel bir yetiştirmeden sağlandı. Klinik olarak sağlıklı ve uniform hayvanlar seçilerek 24 hafta süre ile denemeye alındı.

Kontrol serumları : Pozitif kontrol serumu elde etmek amacıyla Snyder ve ark'nın (16) bildirdiği yöntemle göre hiperimmunizasyon yapıldı. Bunun için aşısız, klinik olarak sağlıklı, 13 haftalık 4 adet beyaz leghorn tavuk kullanıldı. Negatif kontrol serumları Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü Specific Pathogen Free (SPF) tavuk ünitesinden sağlandı.

Test serumları : Çalışmada Ankara ve çevresindeki 21 tavukçuluk işletmesinden alınan değişik yaşta broiler damızlık, broiler ve yumurtacı (kahverengi ve beyaz) tavuklara ait 504 kan serum örneği kullanıldı. Veteriner Hekim denetimindeki, aşı ve infeksiyon bilgilerinin alınabileceği işletmelerden yararlanıldı.

Virusun üretilmesi : ELISA, HA ve HI testlerinde Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsünden sağlanan standart canlı Newcastle hastalığı virusu LaSota suşu kullanıldı. Virus, Miers ve ark.'nın (15) bildirdikleri yöntemle göre yumurtada üretildi. Virüsle korioallantoik sıvınının 1/3'lük bölümü HA ve HI testlerinde kullanılmak üzere 1 ml'lik kısımlara bölünerek -20°C de muhafaza edilirken geri kalan bölümü ELISA antijeninin hazırlanmasında kullanıldı.

ELISA antijeni: Miers ve ark'nın (15) bildirdikleri yöntemle göre hazırlandı. Korioallantoik sıvıda üretilen virus +4°C de saklandı. Soğuk absolut metanol 5 dakika aralarla her seferinde %1-2 (hacim/hacim) oranında, %25'lik bir hacime ulaşana kadar virüsle sıvıya ilave edildi. Bu sıvı 4°C'de 3 saat tutulduktan sonra 0°C'de 15.000 x g'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra presipitat 0.1 M Fosfat Buffer'da (pH. 7.2) 1/10 oranında sulandırıldı ve süspanسیون +4°C'de bir gece tutularak 750 x g'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant +4°C'de ELISA antijeni olarak saklandı. Antijenin protein içeriği biüret yöntemi ile belirlendi (17).

Aşılama : Deneme hayvanları 50'lik iki gruba ayrıldı; gruplardan biri aşı ve diğeri kontrol olarak değerlendirildi. Testler için aşılama yapılmadan önce ve ilk aşı yapıldıktan sonra gruplardaki 25 hayvandan tesadüfi örnekleme ile her hafta dönüşümlü olarak kan alındı. Kontrol grubuna aşı yapılmadı. Aşı grubuna Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsünden sağlanan aşılar 7. gün (Hitchner B1-Burun+Göz), 21. gün (LaSota-içme suyu), 52. gün (LaSota-içme suyu) ve 18. haftada (İnaktif LaSota-kas içi) uygulandı. Hayvanlardan alınan kanlardan serumları çıkarıldı +4°C'de saklandı, ertesi gün aynı anda ELISA ve HI testleri yapıldı.

HI testi : Bu testler Allan ve Gough (18) ve Arda'nın (19), bildirdiği yöntemlere göre U tabanlı polystrene pilaklarda yapıldı. HI titresi Log₂ tabanına göre değerlendirildi. Her pilak için pozitif ve negatif kontroller kullanıldı.

ELISA : Test Adair ve ark'nın (11) yöntemine göre yapıldı ve öncelikle konjugat, kontrol serumları ve antijenin optimal dilasyonları saptandı. Düz tabanlı polystyrene ELISA pilaklarına (Greiner) 0.5 M karbonat buffer'da (pH 9.6) sulandırılan antijenden (170µg/ml) her kuyuya 50 µl konularak kaplandı, +4°C'de bir gece bekletildikten sonra yıkama ve sulandırma solusyonu PBS+Tween (PBS, pH: 7.4, %0.05 Tween 20) ile yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için her göze 50 µl PBS'de (pH: 7.4) 1/10 sulandırılmış bovine serum albumini 30 dakika uygulandı. Yıkama işleminden sonra, serum sulandırmaları 1/2 den başlayarak iki katlı yapıldı, kuyulara 50 µl damlatıldı. ELISA pilakları 37°C'de 1 saat inkube edildi ve tekrar yıkandı. 50 µl konjugat (peroksizad işaretli tavşan anti-tavuk IgG) ilave edildi ve 37°C'de 1 saat bekletildi. Yıkama işlemi tekrarlandı ve ELISA pilakları kurutuldu. Her kuyuya 100 µl substrat

[(40 mg ortho-phenylenediamine+100 ml fosfat-sitrat buffer, pH:5.0)+(40 µl %30 H₂O₂)] konuldu. ELISA pilakları 37°C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyon her kuyuya 50 µl H₂SO₄ (2.5 M) damlatılarak durduruldu. Sonuçlar mikro ELISA okuyucusunda (Metertech Σ960) OD (optik dansite) 490 nm'de okunarak kaydedildi. ELISA'da pozitif ve negatif kontroller kullanıldı. Negatiflik eşiğinin belirlenmesi için SPF tavuklara ait 30 serumun iki katlı sulandırılmaları 3 kez ELISA ile saptandı. Alınan absorbans değer ortalamaları düzenlenerek (en düşük sulandırmadaki absorbans ortalaması) negatiflik eşiği belirlendi. Testlerde bu değer üzerindekiler pozitif kabul edildi.

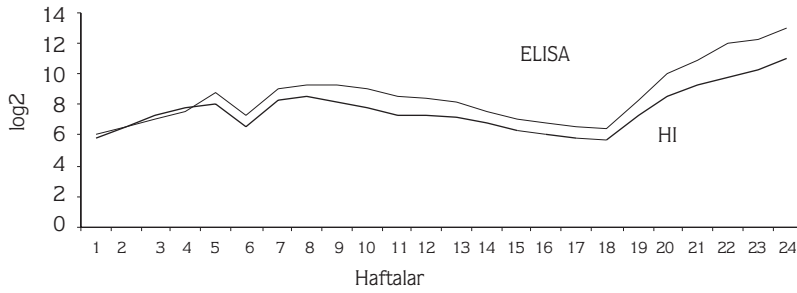
Bulgular, SPSS for MS WINDOWS Release 5.0 bilgisayar programı ile istatistiki olarak değerlendirildi. ELISA ve HI serum titre (log₂) ortalamaları arasındaki fark (T- Testi) ve korelasyon saptandı.

Bulgular

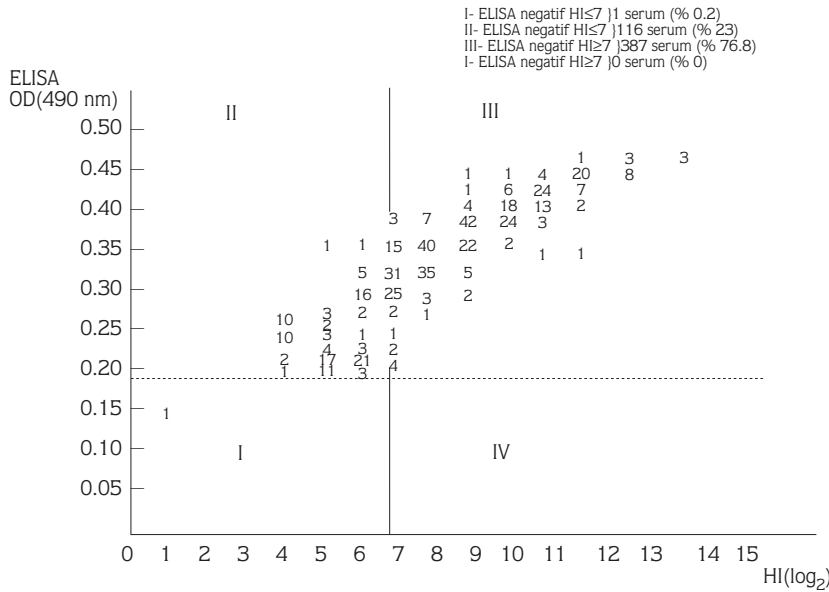
HI testi: Kontrol grubundaki hayvanlarda 3. haftadan başlayarak HI titrelerinde düşme saptandı. Deneme ve test grubuna ait tavuklarda ELISA ve HI testi sonuçları ile birlikte Şekil 1 ve 2 de verilmiştir.

ELISA: Testte antijenin 1/200 ve konjugatın 1/15.000 sulandırmalarda kullanılmasının uygun olduğu saptandı. Negatiflik eşiği (OD) 0.19 olarak belirlendi. Kontrol grubundaki hayvanlarda 4. haftadan sonra ELISA titrelerinin negatiflik eşiğinin altına düştüğü saptandı.

Deneme grubundaki hayvanların aşılardan önce ve aşılandıktan sonra belirli aralıklarla alınan kan serumlarının ELISA sonuçları Şekil 1'de görülmektedir. Kan serumlarının ELISA ve HI titre sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında (P<0.001) ortalamalar arası fark önemli ve korelasyon pozitif (0.97) bulundu. Test



Şekil 1. Aşı uygulanan deneme hayvanlarının HI ve ELISA titreleri



Şekil 2. Test grubunda ELISA ile incelenen 504 serumun OD (optik dansite) ve HI dağılımı.

grubunda, ELISA ve HI ile incelenen 504 serumun 21 işletmeye ait ELISA negatiflik eşiği (0.19) ve HI bağışıklık kriterine (\log_2 'e göre 7) göre yapılan değerlendirilmesinde, ELISA negatif HI \leq 7:1 serum (%0.2), ELISA pozitif HI \leq 7:116 serum (%23), ELISA pozitif HI \leq 7:387 serum (%76.8) ve ELISA negatif HI \leq 7:0 serum (% 0) saptandı (Şekil- 2). İstatistiksel değerlendirmede ELISA ve HI sonuçları arasındaki fark herbir işletme için istatistiki açıdan ($P<0.001$) önemli bulundu. Ayrıca, işletme bazında oranları değişmek üzere, $P<0.001$ düzeyinde, tüm sonuçlar arasında pozitif korelasyon (0.87) belirlendi.

Tartışma ve Sonuç

Tavuklarda Newcastle hastalığının serolojik tanısında, hemaglutinasyon inhibisyon testi uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Ancak, birçok hastalığının serolojik tanısında olduğu gibi Newcastle hastalığının tavuklarda serolojik tanısı için saha çalışmalarına uygun ve spesifik bir test olan ELISA'dan yararlanılmaktadır (9, 12, 17). Bu çalışmada antijen ve substrat kendi laboratuvar olanaklarımız ile hazırlandı ve konjugat olarak diğer araştırmacılar gibi ticari peroksidad ile işaretli anti tavuk IgG den yararlanıldı. ELISA antijeninin metanol presipitasyon yöntemi ile elde edilmesi ve standardizasyonu Miers ve ark'nın (15) bildirdiği gibi pratik ve ucuz olarak değerlendirildi.

Deneysel ve saha çalışmalarında, tavuk kan serumlarında ELISA ve HI test sonuçları arasındaki farklılık ve korelasyon birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Snyder ve ark (16) tek serum sulandırması ile yaptıkları çalışmada Newcastle antikorlarını saptamada iki test arasında ($p<0.001$) korelasyon ($r=0.965$) bulunduğunu ve ELISA'nın HI'ya göre çok daha düşük antikor düzeylerini saptayabildiğini belirtmişlerdir. Marquardt ve ark (12) Newcastle virusu ile intranazal (İN), intraokuler (İÖ) ve intratraheal (İT) yolla infekte edilen tavuklarda ELISA ve HI testleri ile primer immun yanıtı değerlendirmişlerdir. Testlerde ölçülen antikor titreleri paralellik göstermiş, virusun dozu ve verilmiş yolunun ELISA ve HI titreleri arasındaki relatif korelasyonu etkilediği saptanmıştır. İN ve İÖ inokule edilen grupta ELISA ve HI arasında yüksek bir korelasyon ($r=0.94$) saptanırken İT grubunda bu oran daha az bulunmuştur. Araştırmacılar bu sonucu primer ve sekonder yanıtta meydana gelen antikor sınıflarının farklılığına, dolayısıyla HI ve ELISA'nın antikor sınıflarını saptamadaki

duyarlılıklarına bağlamışlardır. Adair ve ark (11) tavuklarda HI testi pozitif olan tüm serumların ELISA ile pozitif bulunduğunu, ELISA ile canlı ve inaktif aşı gruplarının herbirinde hayvanların immun statüsünün daha iyi belirlediğini bildirmişlerdir. İki broiler ve 1 ticari yumurtacı tavuk çiftliğinden alınan serumların ELISA ve HI ile değerlendirilmesinde 47 serumun tümü ELISA'da, 45'i HI de pozitif bulunmuş ve testler arasında korelasyon ($r=0.57$) saptanmıştır. Brown ve ark (8) aşıları 1-18 haftalık 364 tavuk serumunu ticari ELISA kiti ve standart HI testi ile değerlendirdiklerinde testler arasında güçlü bir korelasyon ($r=0.97$) belirlemişlerdir. Miers ve ark (15) 6 farklı zamanda düzenli olarak yaşları 9.5-38 hafta arasında değişen 550 tavuktan topladıkları kan serumlarını HI ve antijenini metanol presipitasyon tekniği ile hazırladıkları ELISA ile değerlendirmişlerdir. Araştırmanın sonunda ELISA'nın HI 'ya göre çok duyarlı bir test olduğunu ve iki test arasında bir korelasyon bulunduğunu saptamışlardır. Rossignoux ve ark (13) batı Fransa'da 5 broiler, 3 ticari yumurtacı ve 5 hindi yetiştirmesinde Newcastle hastalığı antikorlarını ELISA kiti ve HI ile incelemişler ve iki ünitedeki çok düşük titreler dışında ELISA ve HI arasında güçlü bir korelasyon ($r=0.97$ ve $r=0.73$) belirlemişlerdir. ELISA'da negatif titre gösteren iki serum HI testinde 1/40 ve 1/80 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar ELISA'nın sensitivitesinin düşüklüğünden çok HI testinin spesifitesinin düşüklüğüne bağlanmıştır.

Bu çalışmada deneme grubunda, ELISA ve HI testi arasında bulunan sonuçlar diğer araştırmacıların bildirdiği sonuçlarla benzerdir. ELISA ve HI titre değerleri arasındaki fark istatistiksel değerlendirmede önemli bulunmuş olsa da, testlerin sensitivite farkı bunun nedeni olabilir. Nitekim, sonuçlar arasında güçlü korelasyon saptanmış olması bu değerlendirmeyi desteklemektedir. Test grubundaki işletmelere ait saha serumlarının HI testi ve ELISA ile değerlendirildiğinde pozitifleri belirlemede 1 serum (%0.2) dışında ELISA'nın HI testi ile paralellik göstermesi diğer araştırmacıların elde ettikleri bulgulara benzemektedir. HI testi ve ELISA sonuçları arasındaki fark T testinde herbir işletme için önemli bulunmuştur. Ayrıca, işletme bazında oranları değişmek üzere tüm sonuçlar arasında pozitif korelasyon (0.87) belirlenmiştir. Saha çalışmalarında, işletme bazındaki farklılıkların nedeni her iki testin çalışma prensibi (farklı immunglobulin türü spesifiteleri) ve hayvanların o andaki immun durumuna bağlı olabileceği gibi Marquardt ve ark'nın (12).bildirdiği

gibi antijenin dozu ve verilış yolunun ELISA ve HI titreleri arasındaki relatif korelasyonu etkilemesinden kaynaklanabilir.

Sonuç olarak, aşılı tavuklarda Newcastle hastalığı virüsü antikorlarının saptanmasında ELISA'nın HI testi

kadar etkili ve duyarlı olduğu görüldü. İki test arasındaki yüksek korelasyon ve pozitifleri saptamadaki uygunluk ELISA ve HI testlerinin saha serumlarının değerlendirilmesinde birlikte kullanılabileceğini ortaya çıkarmıştır.

Kaynaklar

1. Beard, C.W., Hanson, R.P., Newcastle Disease. ed: Hofstad, M.S., Barnes, H.J., Calnek, B.W., Reid, W.M., Yoder, H.W.Jr.: Diseases of Poultry. 8 th ed., Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa. 1984; pp: 452-470.
2. Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M., Kanatlı Hayvan Hastalıkları. 2. Baskı, Medisan Yayn., Ankara, 1994.
3. Allan, W.H., Lancaster, J.E., Toth, B., Newcastle Disease Vaccines Their Production and use. FAO Animal Production and Health Series No:10, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1978.
4. Bruning-Fann C., Kaneene J., Heamon J., Investigation of an Outbreak of Velogenic Viscerotropic Newcastle Disease in Pet Birds in Michigan, Indiana, Illinois and Texas. JAVMA 1992; 201: 1709-1714.
5. Srinivasan V.A., Reddy G.S., Kalanidhi A.P., Use of Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Estimation of Antibody to Newcastle Disease Virus. Microbiology 1992;15: 319-321.
6. Tekes L., Horvath E., Nagy E., Checking of Immunity Against Newcastle Disease by ELISA. Acta Vet. Hung. 1992; 40: 323-328.
7. Jordan, F.T., Pattison, M., Poultry Disease-4th ed. WB Saunders Company Ltd, London, 1996.
8. Brown J., Resurreccion R.S., Dickson T.G., The Relationship Between the Hemagglutination-Inhibition Test and the Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of Antibody to Newcastle Disease. Avian Dis. 1990; 34: 585-7.
9. Wilson R.A., Perotta, C., Frey, B. and Eckroade, R.J., An Enzyme Linked Immunosorbent Assay that Measures Protective Antibody Levels to Newcastle Disease Virus in Chickens. Avian Dis. 1984; 28:1079-1085
10. Redmann, U.H., Current Conventional Diagnostic Procedures. Workshop on Avian Paramyxovirus, Rauschholzhausen, Germany, 1992; pp.117-127.
11. Adair B.M., Mc Nulty M.S., Todd D., Connor T.J., Burns., Quantitative Estimation of Newcastle Disease Antibody Levels in Chickens and Turkeys by ELISA. Avian Pathol. 1989; 18, 175-192.
12. Marquardt W.W., Snyder D.B., Savage P.K., Kadavil S.K., Yancey F.S., Antibody response to Newcastle Disease Virus Given by Two Different Routes as Measured by ELISA and Hemagglutination-Inhibition Test and Associated Tracheal Immunity. Avian Dis. 1985; 29: 71-79.
13. Rossigneux, R., Robineau B., Dudouyt, C., Cheritel, P., The Monitoring of ND Vaccination in Commercial Layer and Broiler Chicken and Turkey Breeders Flocks. Workshop on Avian Paramyxovirus, Rauschholzhausen, Germany, 1992; pp.189-200.
14. Snyder D.B., Marquardt W.W., Mallinson E.T., Allen D.A., Savage P.K., An Enzyme Linked Immunosorbent Assay Method for the Simultaneous Measurement of Antibody Titer to Multiple Viral, Bacterial or Protein Antigens. Vet. Immunol. Immunopathol. 1985; 9:303- 317.
15. Miers L.A., Bankowski, R.A. and Zee, Y.C., Optimizing the Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Evaluating Immunity of Chickens to Newcastle Disease. Avian Dis. 1983; 27 : 1112-1125.
16. Snyder D.B., Marquardt W.W., Mallinson E.T., Russek, E., Rapid Serological Profiling by Enzyme Linked Immunosorbent Assay I. Measurement of Antibody Activity Titer Against Newcastle Disease Virus in a Single Serum Dilution. Avian Dis. 1983; 27: 161-9.
17. Savory, J., Hammond, J. E., Measurement of Proteins in Biologic Fluids. In Grandwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis, 8th Ed., The C.V. Mosby Company, London, pp: 257-258, 1980.
18. Allan W.H., Gough R.E., A Standard Haemagglutination Inhibition Test for Newcastle Disease (1). A Comparison of Macro and Micro Methods. Vet. Rec. 1974; 95:120-123.
19. Arda M., Hollanda'da Newcastle Hastalığı Üzerinde Çalışmalar ve HI Testinin Yeni Yönteme Göre Deđerlendirilmesi. Vet. Hek. Dem. Derg. 1976; 46:19-28