

EMBRİYOLU TAVUK YUMURTASINA VİRUS İNOKULASYONU



Dersi Veren Öğretim Üyeleri

Prof.Dr. Yılmaz AKÇA

Prof.Dr. Feray ALKAN

Prof.Dr. Aykut ÖZKUL

Prof.Dr. Seval BİLGE DAĞALP

Prof.Dr. M.Taner KARAOĞLU

Prof.Dr. T.Çiğdem OĞUZOĞLU

Öğretim Elemanları

Arş.Gör.Dr.Zeynep AKKUTAY YOLDAR

Arş.Gör.Dr. İlke KARAYEL HACIOĞLU

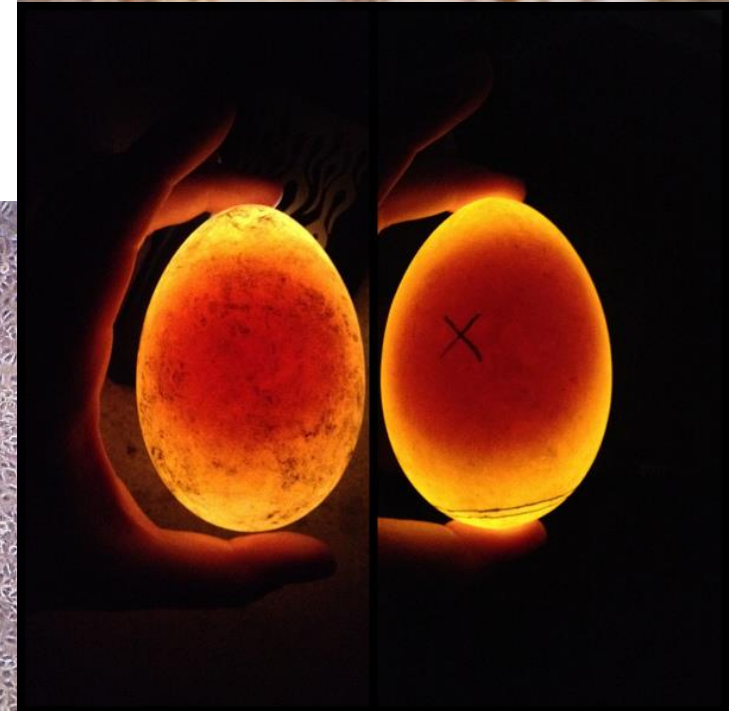
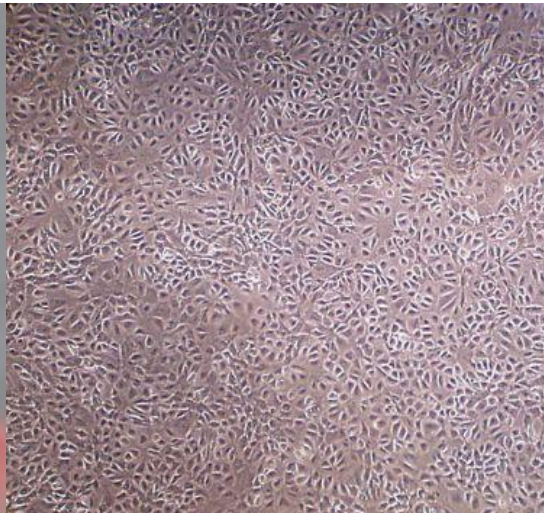
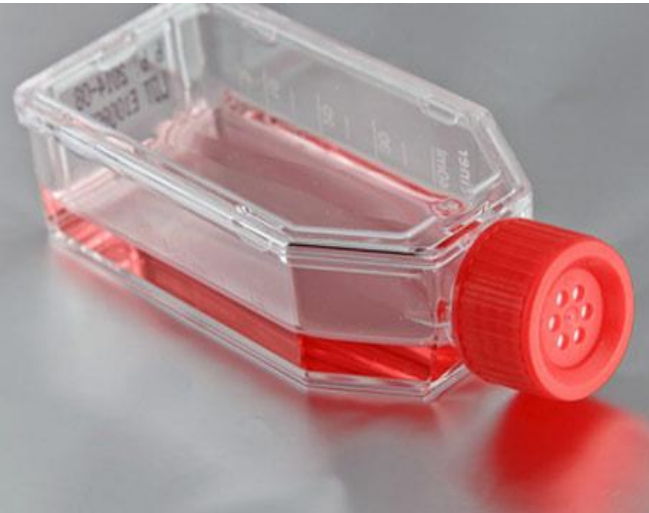
Arş.Gör. Nüvit COŞKUN

Arş.Gör. Fırat DOĞAN

Arş.Gör. B.Taylan KOÇ

Virusların Üretildikleri Sistemler

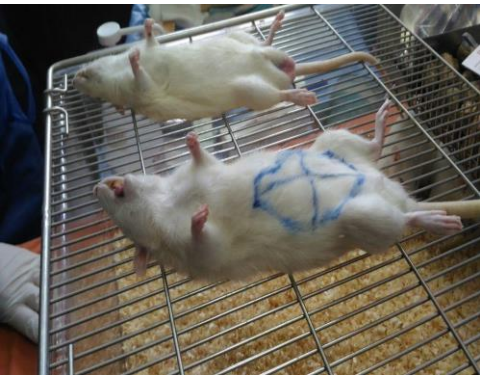
- In-vivo
 - Deneme Hayvanları
 - Embriyolu yumurtalar
- In-vitro
 - Hücre kültürleri



Deneme Hayvanları

1. Konvansiyonel

Standart yetiştirme koşullarına tabi tutulan ve herhangi bir mikrobiyolojik kontrol uygulanmayan hayvanlardır. Doğal olarak bünyelerinde saprofit veya patojen birçok mikroorganizmayı barındırabilirler. Bazı rutin denemelerde ve belirli biyolojik ürünlerin (komplement, negatif veya pozitif serum) elde edilmesinde kullanılabilirler.



<http://denhay.aku.edu.tr/genel-bilgiler/>



2. Spesifik Patojen Free

- ❖ Vücutlarında farklı mikroorganizmalar bulundursalar da **patojen mikroorganizmaları** bulundurmazlar.
- ❖ Sürekli kontrol altında tutulurlar ve özel bakıma tabidirler.
- ❖ Suları ve yemleri mikrobiyolojik kontrolden geçirilir, yaşadıkları ortama filtre edilmiş hava verilir.
- ❖ Bu hayvanlarla yapılan deney sonuçları; konvansiyonel hayvanlarla yapılan deneylere göre daha spesifik ve güvenlidir.



3. Germ Free

- ❖ **Hiç bir mikroorganizma** barındırmayan ve vücutlarında bunlara karşı oluşan hiç bir antikorun bulunmadığı özel hayvanlardır.
- ❖ Sağlıklı annelerden steril şartlarda sezeryanla alınır ve tüm çevre şartlarının kontrol edildiği bir ortamda yetiştirilir.
- ❖ Yemleri ve suları sterilize edilir, yaşadıkları ortama filtre edilmiş hava verilir. Gaita ve kan örnekleri düzenli olarak mikrobiyolojik kontrole tabi tutulur.
- ❖ Pahalı ve masraflı ancak son derece güvenilirdir.



<http://microbe.med.umich.edu/services/germ-free-gnotobiotic-mouse-facilities>

Deneme Hayvanlarına İnokulasyon Yolları

- Intranasal
- Intratracheal
- Oral
- Korneal
- Subkutan
- Intradermal
- Intravenöz
- Intraperitoneal
- Intraserebral
- intramuskuler



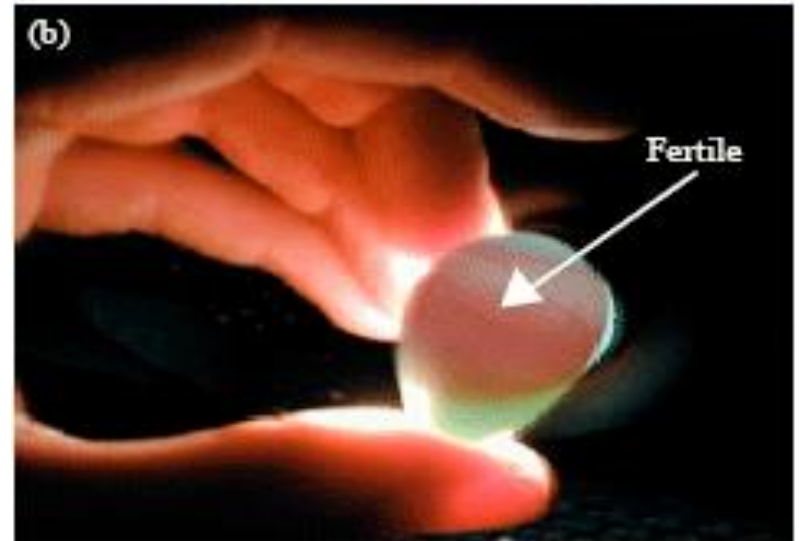
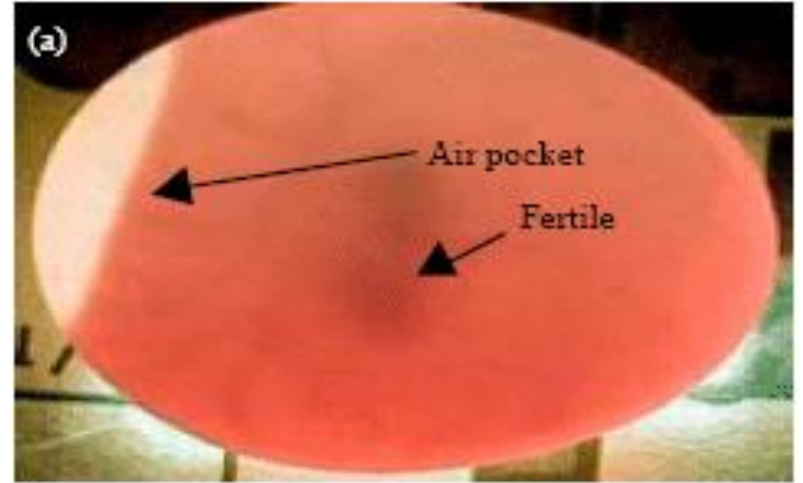
Embriyolu Yumurtalar

- En yaygın olarak embriyolu tavuk yumurtaları kullanılmaktadır. Zaman zaman ördek yumurtası da tercih edilmektedir.
- ETY'ler günümüzde hücre kültürlerinin yaygın kullanılması nedeniyle ikinci planda kalmış ise de, halen bazı viruslar için ideal üreme ortamıdır. Örneğin, bir çok kanatlı virusu, Mavidil virusu ve InfluenzaA

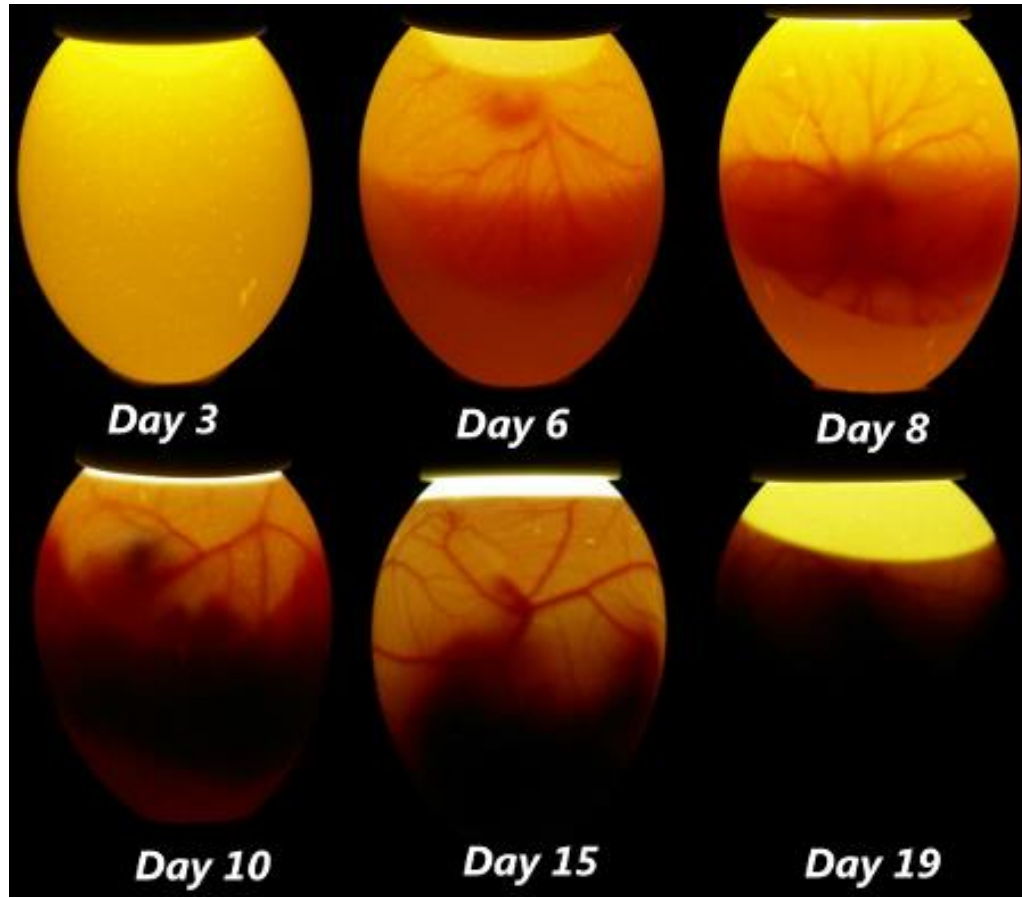


- ETY uygulamalarında başarılı olmak için yumurtanın elde edildiği kuluçkahanelerin;
 - Sürekli takip ediliyor olması
 - Önemli hastalıklar yönünden ari olması
 - Fertilite oranının yüksek olmasıistenir.

- Kümeslerden alınan döllu yumurtalar 35-37 C'lik %40-70 oranında nemli etüvlerde ön gelişmeye alınırlar.
- Yumurtalar her gün elle veya mekanik olarak döndürülür. Yaklaşık bir hafta sonra karanlık odaya alınarak canlılık kontrolleri yapılır.
- Bu muayenede güçlü bir ışık kaynağı altında embriyonun hareketi ve damarları gözlenir.



A. Farhangi, A. Akbarzadeh, M.R. Mehrabi, M. Chiani, Z. Saffari, S. Ghassemi, M. Kheiri and R. Bashar, 2010. Safety of Human Therapeutic Morphine Vaccine Employing Lohmann Specific Pathogen Free Eggs. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13: 1047-1051.

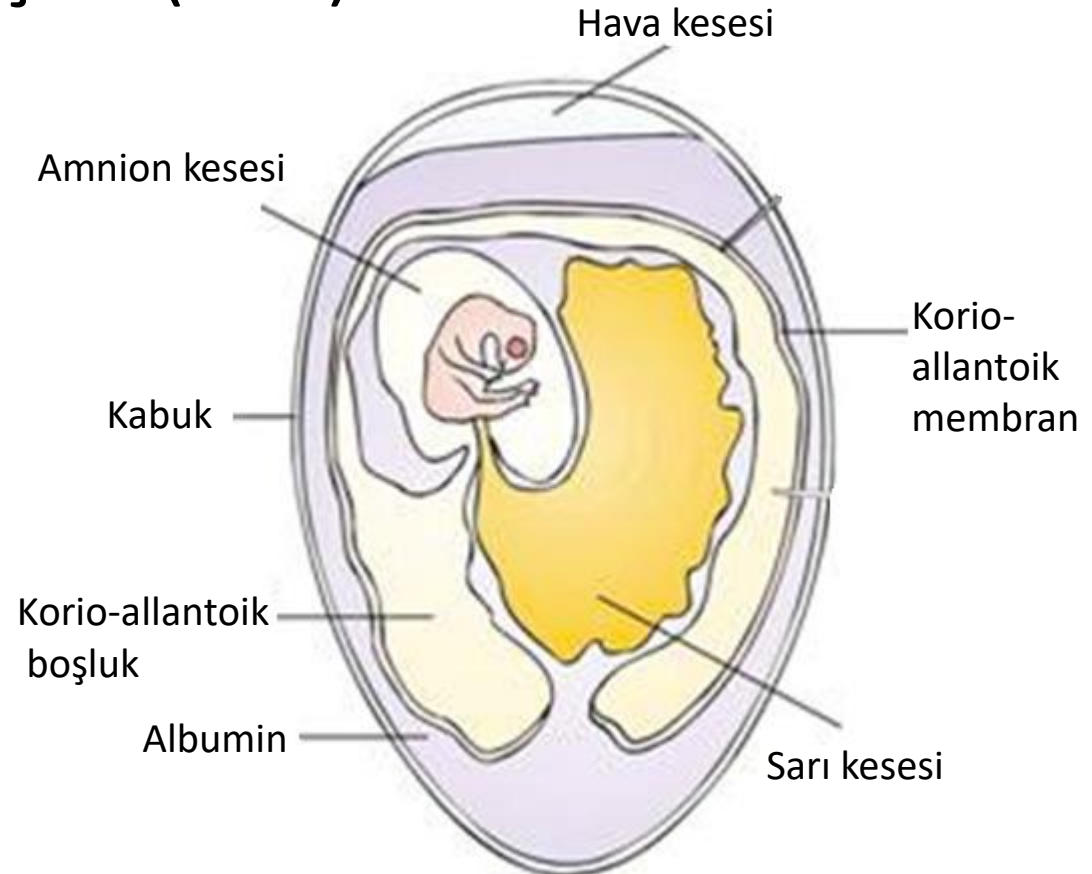


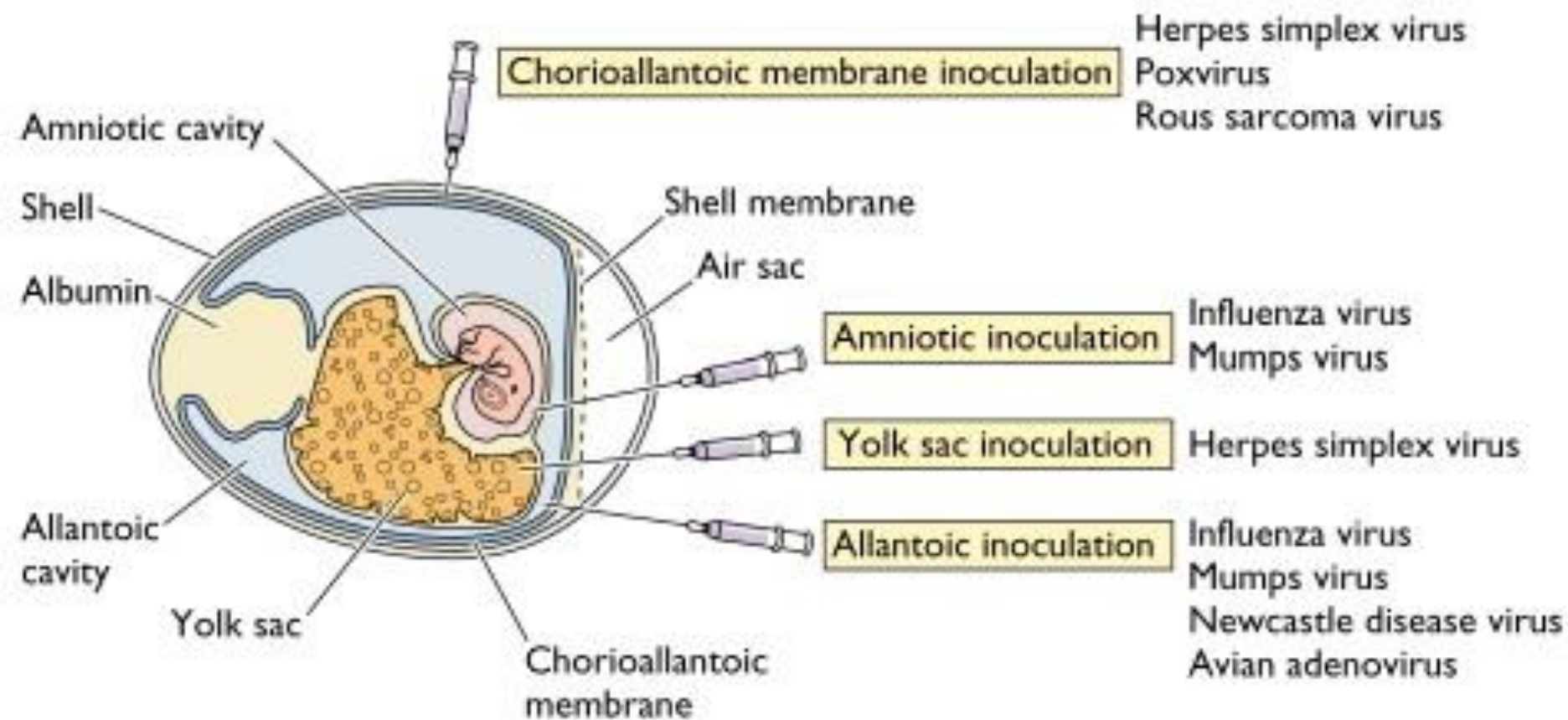
<http://incubatorwarehouse.com/egg-candling>

- ❖ Embriyonun hareketsiz ve ışık altında kitle şeklinde koyu renkli oluşu öldüğüne işarettir.
- ❖ Canlı embriyolar amaca uygun kullanılmak üzere etüve geri konur.
- ❖ Ekim işlemi işaretlemeler yapıldıktan hemen sonra, embriyonun yeri değişmeden yapılmalıdır.

ETY'ye Virus Ekimi İçin Sıklıkla Kullanılan Bölgeler

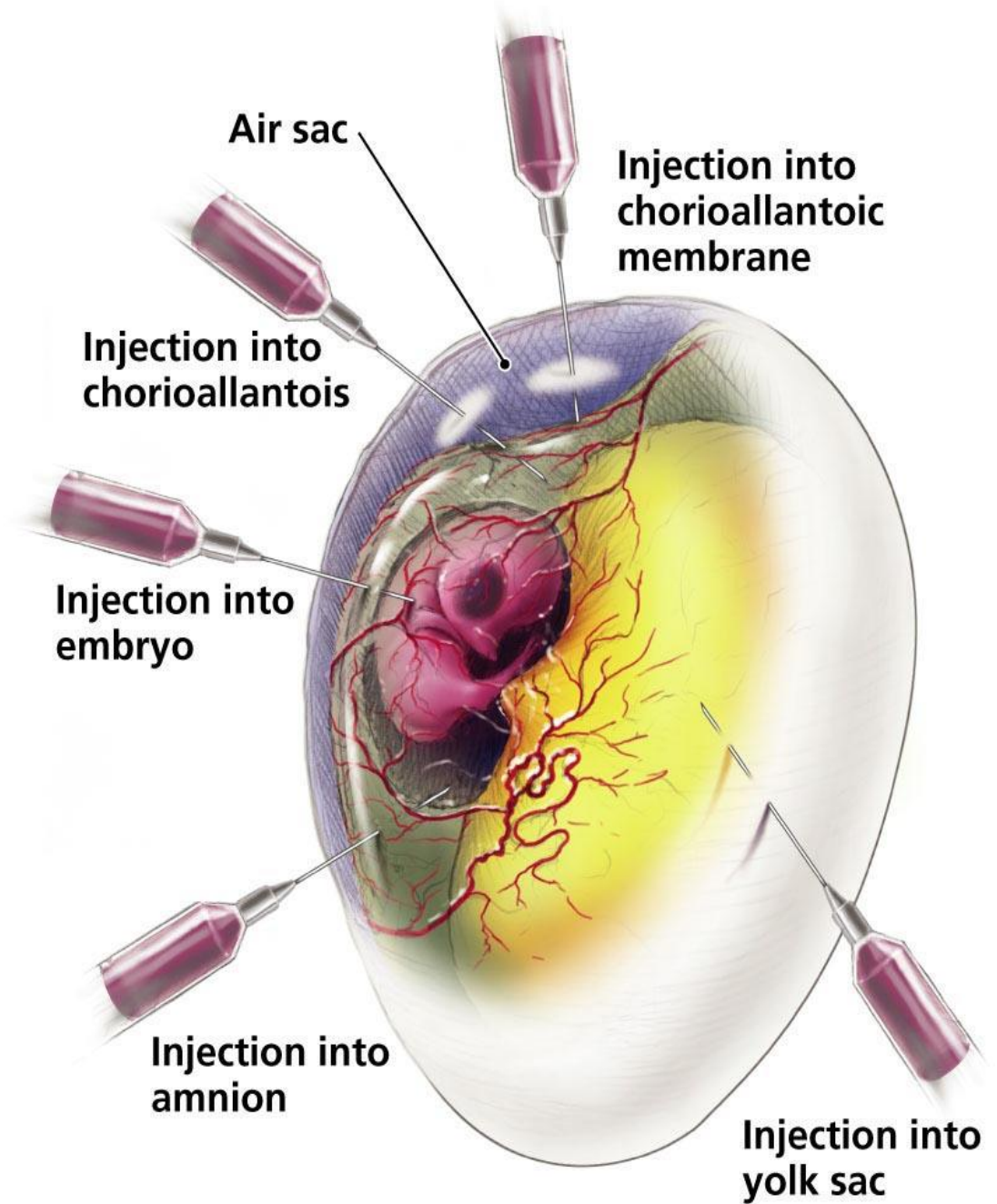
1. Chorio-allantoik membran (CAM)
2. Chorio-allantoik boşluk (CAB)
3. Amnion kesesi (AK)
4. Sarı kesesi (SK)



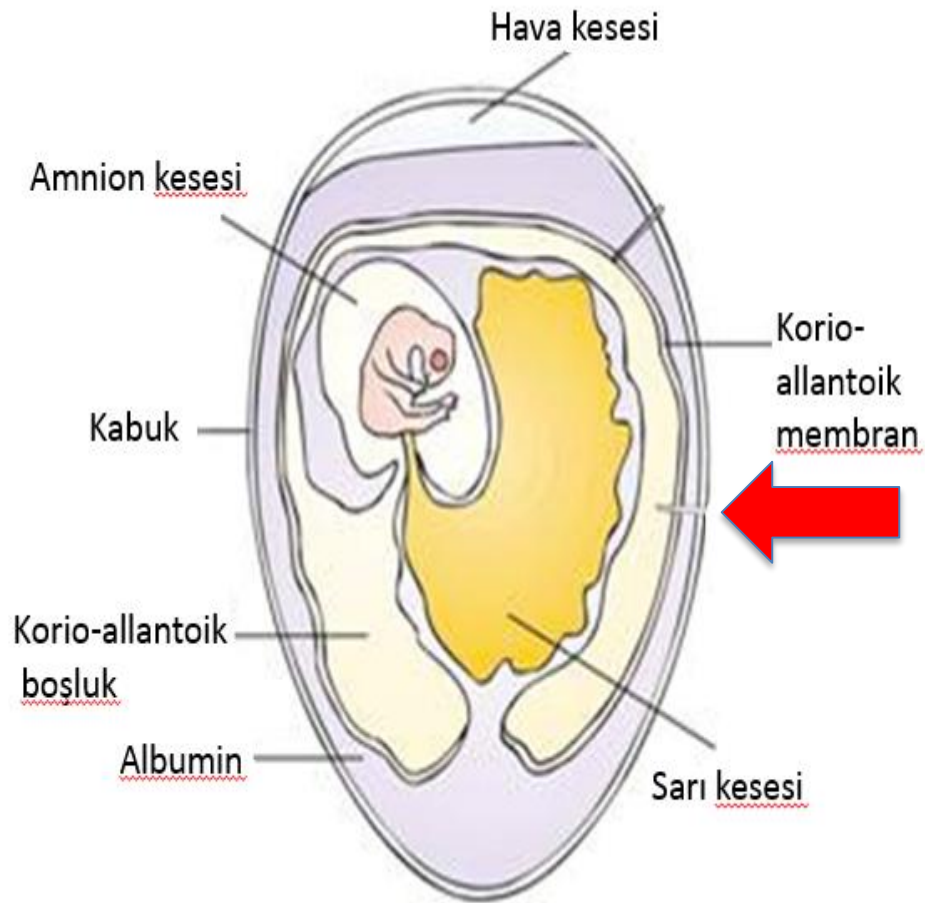
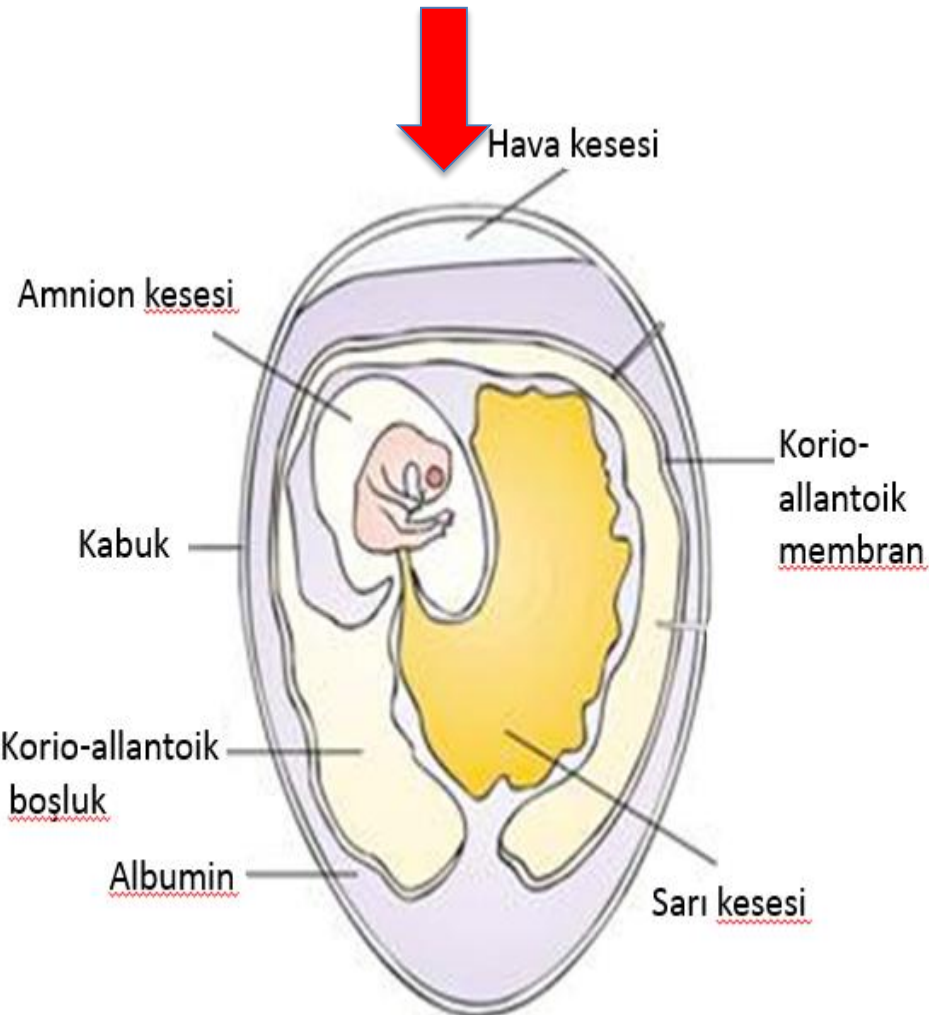


Bu bölgeler dışında,
korio-allantoik
membran üzerindeki
embriyonel damarlara
ve **direkt olarak**
embriyoya da ekim
yapılabilir.

Virus bu keseleri
oluşturan membran
hücrelerinde ürer ve
olgun virionlar
keselerde birikir.



1. HAVA KESESİ TARAFINDAN



2. YAN TARAFTAN

**INFERTILE**

- No development.

**DAY 1**

- Appearance of tissue development.

**DAY 2**

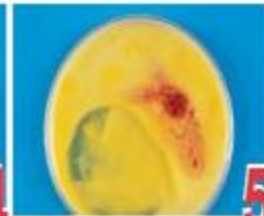
- Tissue development very visible.
- Appearance of blood vessels.

**DAY 3**

- Heart beats.
- Blood vessels very visible.

**DAY 4**

- Eye pigmented.

**DAY 5**

- Appearance of elbows and knees.

**DAY 6**

- Appearance of beak.
- Voluntary movements begin.

**DAY 7**

- Comb growth begins.
- Egg tooth begins to appear.

**DAY 8**

- Feather tracts seen.
- Upper and lower beak equal in length.

**DAY 9**

- Embryo starts to look bird-like.
- Mouth opening appears.

**DAY 10**

- Egg tooth prominent.
- Toe nails.

**DAY 11**

- Comb serrated.
- Tail feathers apparent.

**DAY 12**

- Toes fully formed.
- First few visible feathers.

**DAY 13**

- Appearance of scales.
- Body covered lightly with feathers.

**DAY 14**

- Embryo turns head towards large end of egg.

**DAY 15**

- Gut is drawn into abdominal cavity.

**DAY 16**

- Feathers cover complete body.
- Albumen nearly gone.

**DAY 17**

- Amniotic fluid decreases.
- Head is between legs.

**DAY 18**

- Growth of embryo nearly complete.
- Yolk sac is still on outside of embryo.
- Head is under the right wing.

**DAY 19**

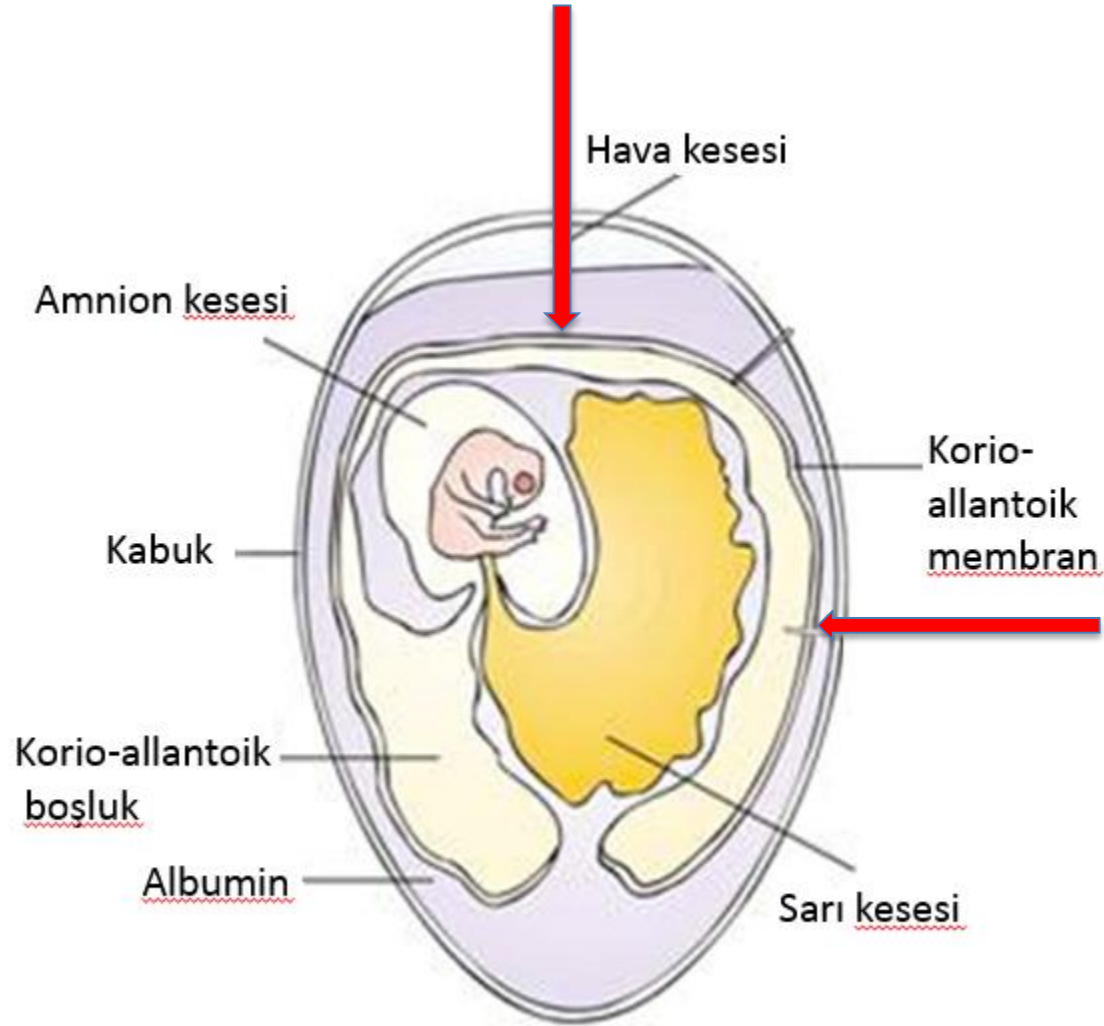
- Yolk sac draws into body cavity.
- Amniotic fluid gone.
- Embryo occupies most of space within egg (not in the air cell).

**DAY 20**

- Yolk sac drawn completely into body.
- Embryo becomes a chick (breathing in air cell).
- Internal and external pils.

1. Korio-allantoik Membran'a ekim

- Poxvirus ve bazı epiteliotrop karakterdeki virus ekimi
- 10-12 günlük embriyo





Amie J Einfeld, Gabriele Neumann , Yoshihiro Kawaoka, (2014) Nature Protocols 9, 2663–2681

Değerlendirme

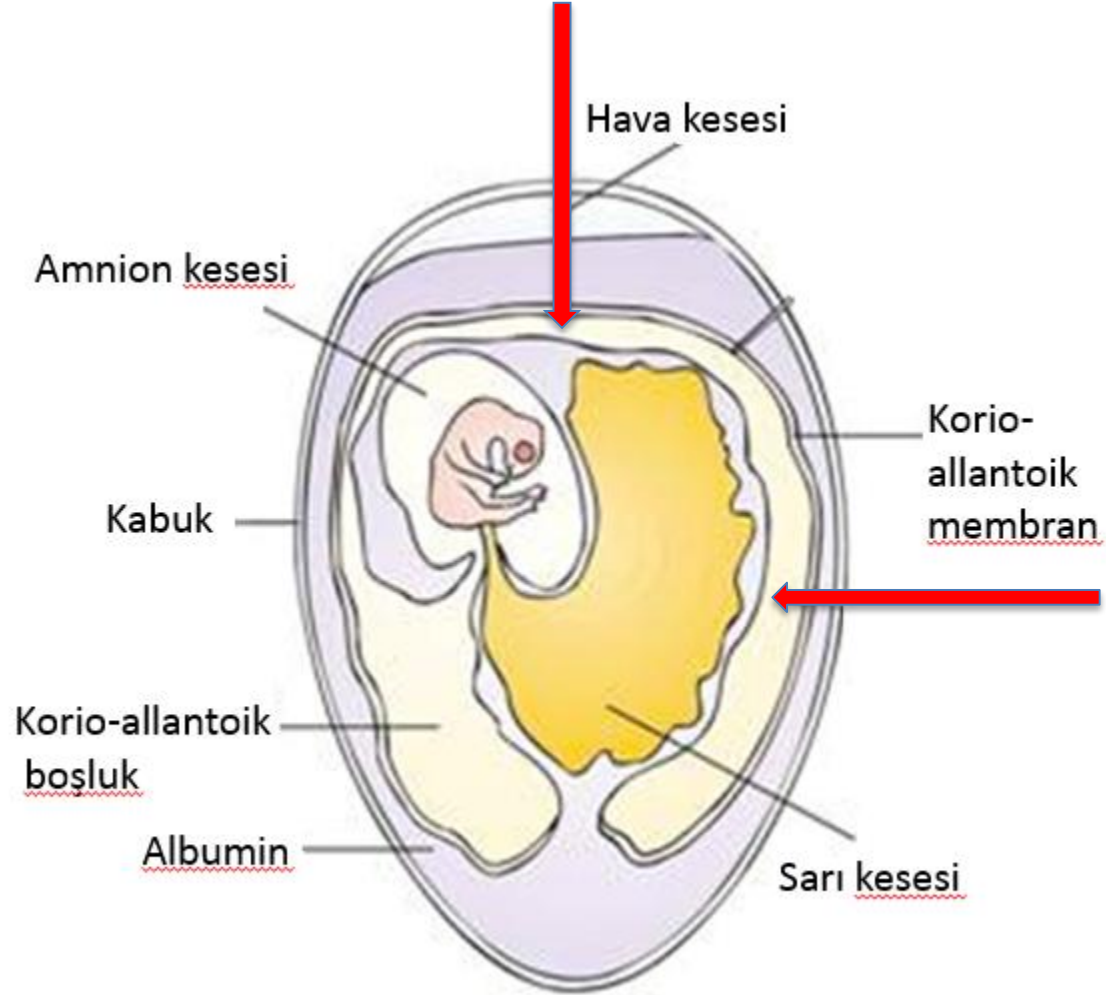
- İlk 48 saat içindeki ölümler teknik hata kabul edilir.
- Daha sonraki dönemde meydana gelen ölüm ve patolojik değişiklikler virusa bağlıdır.
- Hava kesesi üzerindeki kabuk uzaklaştırılarak membran petri kutusuna alınır.
- **PBS ile yıkandıktan sonra membran üzerinde kalınlaşma ve çiçek nodülleri aranır.**
- Kontrole bakılıp karşılaştırma yapılarak değerlendirilir.



Nagasse-Sugahara TK, Kisielius JJ, Ueda-Ito M, Curti SP, Figueiredo CA, Cruz AS, Silva MM, Ramos CH, Silva MC, Sakurai T, Salles-Gomes LF (2004). Human vaccinia-like virus outbreaks in São Paulo and Goiás States, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 46(6):315-22.

2. Korio-allantoik boşluğa ekim

- Rutin olarak **Newcastle virusunun** üretilmesinde kullanılır.
- 9-11 günlük yumurtalar tercih edilir.



Değerlendirme

- İlk 48 saat içindeki ölümler teknik hata kabul edilir.
- Bu süreden sonra ölen embriyolar değerlendirilir.
- Eğer bu sürede embriyo ölmemişse 2-4 saat 4 C ölmesi için bekletilir.
- **Korio-allatoik sıvıdan steril bir tüpe alınarak Hemaglütinasyon testi yapılır.**
- Pozitif sonuç alınması virusun ürediğini gösterir.

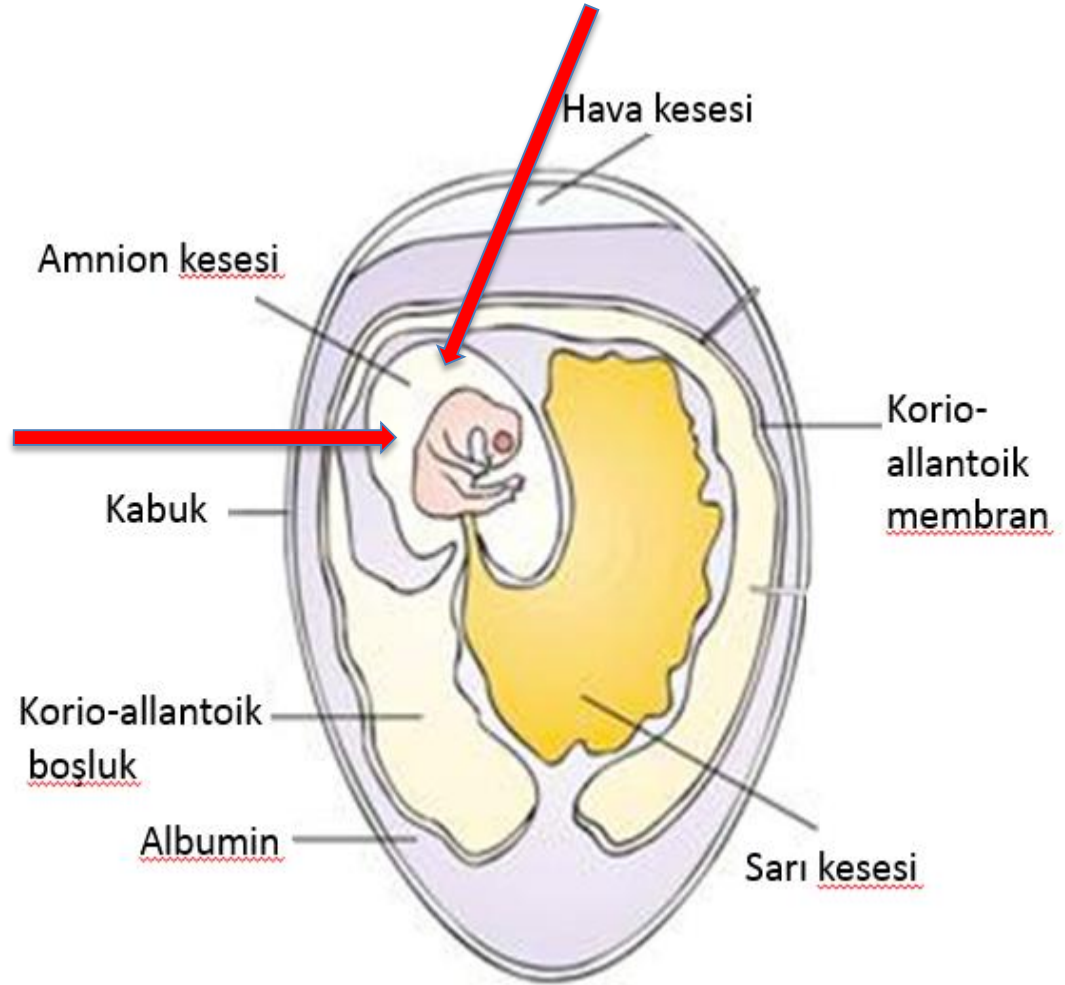
NDV INFECTED EMBRYO
48 hours postinoculation
Strain - Cal. 11914



<http://www.poultrydisease.ir/Atlases/avian-atlas/search/lesion/661.html>

3. Amnion kesesine ekim

- Kızamık, Kabakulak ve **influenza virusları**
- Embriyonun büyük olduğu; 12-14 günlük yumurta

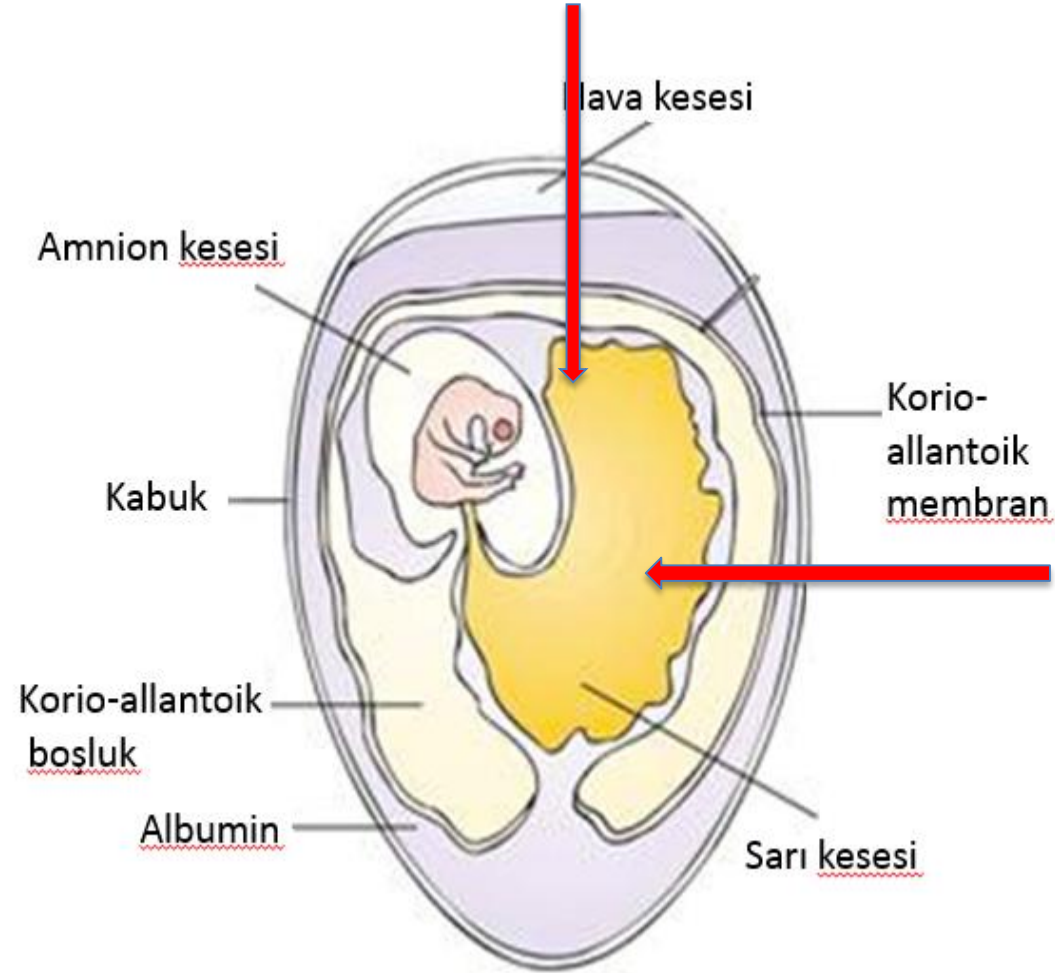


Değerlendirme

- İlk 48 saat içindeki ölümler teknik hata kabul edilir.
- Bu süreden sonra ölen embriyolar değerlendirilir.
- Eğer bu sürede embriyo ölmemişse 2-4 saat 4 C ölmesi için bekletilir.
- Bu yöntemde virus embriyonun sindirim ve solunum sistemine geçerek embriyoyu öldürür.
- **Amniyotik sıvı steril bir tüpe alınarak Hemaglütinasyon testi yapılır.**
- Pozitif sonuç alınması virusun ürediğini gösterir.

4. Sarı Kesesine ekim

- En sıklıkla **Mavdil virusu** ayrıca, Equine Herpesvirus ve kuduz virusu
- Sarı kesesinin en büyük olduğu zaman, 6-8 günlük yumurta



Değerlendirme

- İlk 48 saat içindeki ölümler teknik hata kabul edilir.
- Bu süreden sonra ölen embriyolar değerlendirilir.
- Yumurta açılarak sarı kesesi çıkarılır.
- Membran PBS ile yıkandıktan sonra lam üzerine koyularak preparatlar hazırlanır ve boyama yapılır.
- Mikroskopta inklüzyon cisimcikleri ve elementer cisimcikler aranır.

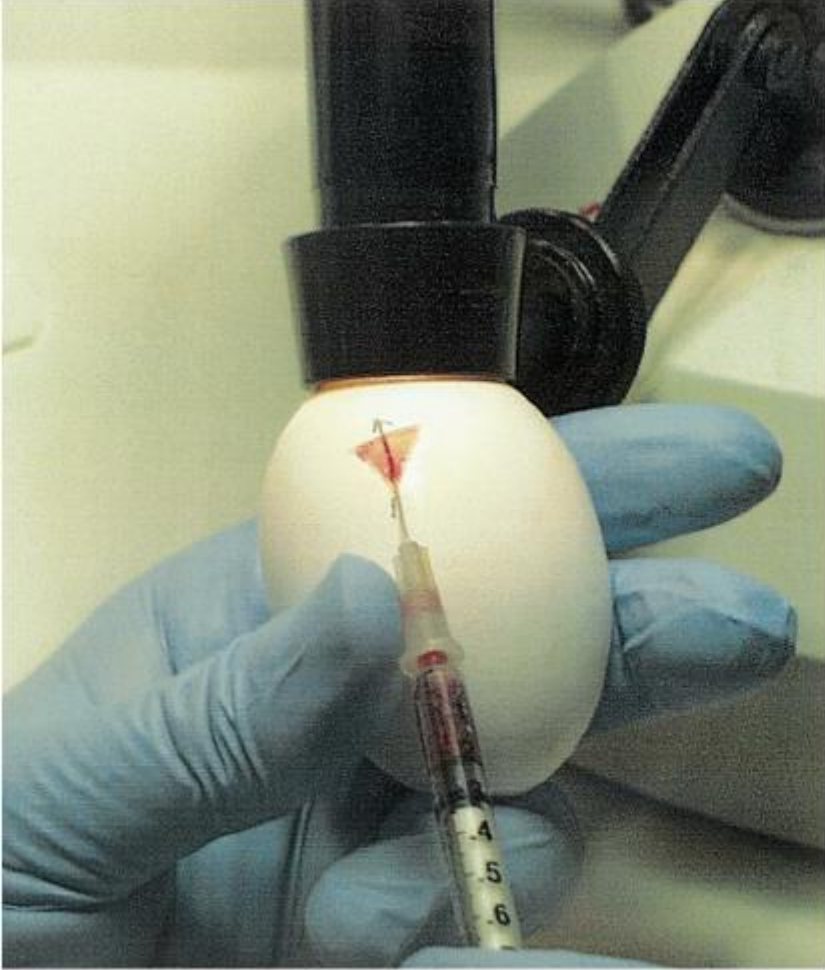


Fig. 1



Fig. 2

Clavijo, A., Heckert, R. A., Dulac, G. C., & Afshar, A. (2000). Isolation and identification of bluetongue virus. *Journal of virological methods*, 87(1), 13-23.

- Fig 2. Mavidil ile enfekte embriyo (sol). Embriyo inokulasyonu takiben genelde 3-6 gün içerisinde ölür ve multiple hemoraji ve ödem gözlenir.

Ders Kaynakları

- 1. Genel Viroloji (Burgu I., Akça Y., 1999, Ankara)
- 2. Genel Viroloji (Yesilbag K., 2010, Bursa)
- 3. Veterinary Virology (Murphy ve ark., 1999),
Academic Press
- 4. Laboratory Guide in Virology (Cunningham C.H.,
1956, Burgess Publishing Company)