

AVIAGEN ANADOLU AŞ

KANATLI TEŞHİS ve ANALİZ LABORATUVARI

SEROLOJİ ÖRNEKLEME EL KİTABI

AKTL-LEK-02/03/01
1/10

İÇİNDEKİLER:

SEROLOJİK İZLEMELERİN İYİ YAPILAN ÖRNEKLEMEYLE OLAN BAĞLANTISI.....	4
ÖRNEKLEME METODLARI.....	4
SERUMLARIN TOPLANMASI, TAŞINMASI VE İŞLEM GÖRMESİ.....	5
ÖRNEK SAYISI.....	6
ÖRNEK SAYISINA İLİŞKİN VARILACAK SONUÇ.....	8
HERHANGİ BİR HASTALIĞIN ÇEŞİTLİ ŞİDDETTEKİ VARLIĞININ VEYA BİR BULAŞMANIN % 95 GÜVENLE TESPİT EDİLEBİLMESİ İÇİN GEREKLİ ÖRNEK SAYISI.....	9

BİLGİ İÇİNDİR

SEROLOJİK İZLEMELERİN İYİ YAPILAN ÖRNEKLEMEYLE OLAN BAĞLANTISI

Serolojik izlemelerde geçerli bir sonucun verilebilmesi ancak doğru bir örnekleme yapılmasıyla mümkündür. Daha kesin bir dille söylemek gerekirse güvenilir ve daha doğru bir tahmin ancak kontrolü yapılacak sürünün düzgün örneklenmesiyle mümkün olabilir. Bunu başarabilmenin anahtarı ise:

- 1) Örneğin temsil edebilme niteliği kazanabilmesi için istatistiksel açıdan geçerli bir örnekleme metodu kullanılması
- 2) Serumların bir örnek ve istenilen kalitede olmasının sağlanabilmesi için örneklerin doğru bir şekilde toplanması, taşınması ve işlem görmesi
- 3) Sonuçlarda güvenilirlik, tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik için doğru test tekniğinin seçilmesidir.

ÖRNEKLEME METODLARI

İstatistiksel olarak geçerli örnekleme yöntemlerinin kullanımı; serolojik analiz sonucunun ve/veya sürünün ortalama titresinin yeniden üretilebilir ve güvenilir olabilmesi bakımından yaşamsal önem sahiptir. Bir örneklemenin istatistiksel olarak geçerliliği ise iki ana koşulun karşılanmasına bağlıdır:

- 1) Örnekleme için rastgele hayvanların seçilmesi
- 2) Sürüyü doğru temsil edebilecek sayıda örnek alımı

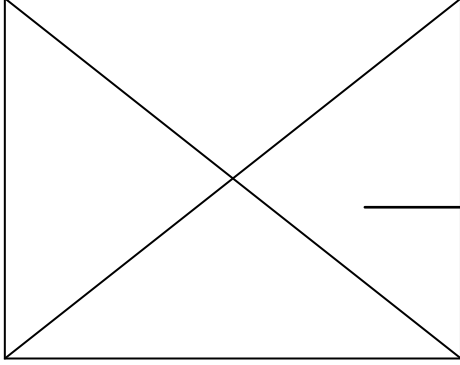
Örnekleme için rastgele hayvanların seçilmesi; sürüdeki her hayvanın örnek alımı amacıyla seçilmesinde eşit bir şansı olduğu anlamına gelir. Tabii bu durumu dile getirmek yapmaktan daha kolay bir şeydir, ancak uygulamada bir kümeşte bu duruma en yakın davranabilmenin çeşitli yolları bulunmaktadır (Bkz. Aşağıdaki şekil, Şekil 1)

Örneklemenin rastgele yapılması istatistikte “Kontrol Edilemeyen Varyasyon” olarak adlandırılan etkilerin bir ortalamasını oluşturduğundan dolayı son derece önemlidir (mesela içme suyuyla eşit olmayan bir şekilde aşı alımı, yemliklerden her hayvanın aynı oranda ve miktarda yem yiyememesi, kümes içi sıcaklık ve/veya nem dağılımının eşit olamaması gibi faktörler kontrol edilemeyen varyasyona örnektir.). Durumu canlandırmak için şöyle bir örnek verelim: Suluk sistemi bozuk olan bir kümesimiz olsun. Buna göre diyelim ki kümesin ilk yarısı olan ön bölümde sistem bozuk ikinci yarısı olan arka bölümde ise düzgün çalışsın. İçme suyu aşısı bu suluk sistemiyle yapılıyor olsun. Eğer kümesin sadece ilk bölümünden örnekleme yapacak olursak, sürümüzün hiç aşılanmamış olduğu sonucuna varabiliriz. Yine eğer sadece ikinci bölümden örnek alacak olursak, sürümüzün tamamının doğru olarak aşılandığını düşünebiliriz.

Eğer kümesin tamamında rastgele örnekleme yoluyla örnek toplayacak olursak da bu kez kümesin gerçek durumu olan ve bir kısmının aşılı bir kısmının yarım aşılı ya da hiç aşısız olduğu iki parçalı aşılama grafiğini görürüz.

Şekil 1. Hayvanların açık alanda yemlendiği serbest yetiştirme yapılan bir kümesin rastgele örneklenmesi

Kümes



Köşe Çizgisi

24 kanatlının doğru örneklenmesi için her köşe çizgisi boyunca 12 kanatlı örneklenir; köşe çizgileri sözgelimi 60 m uzunluğundaysa çizgi boyunca 5 m de 1 hayvan seçilerek örnekleme yapılır.

Kafeslerden ya da folluklardan örnek alınması durumunda bu kafes ya da folluklara numara verilir; sonra her numara rastgele seçilerek bu numaralı kafes ya da folluktan 1 kanatlı örneklenir.

SERUMLARIN TOPLANMASI, TAŞINMASI VE İŞLEM GÖRMESİ

Örnekleme sırasında ve sonrasında, birörneklik sağlayabilmek için dikkat edilmesi gereken başka bir konu da örneklerin doğru şekilde toplanması, taşınması ve işlem görmesidir. Aşağıdaki noktalara dikkat edilmesi bu konuda çok yardımcı olacaktır:

- Eliza testleri için serum toplamaya uygun bir tek kullanımlık plastik tüp içine en az 2-3 ml kan alınmalıdır. Bu miktarda kandan yaklaşık 0.5 - 0.75 ml serum çıkması mümkündür.
- Hemaglutinasyon İnhibisyon testi (HI) yapılması isteniyorsa yukarıda belirtilen serum miktarı yeterli olmayacaktır. Bu durumda büyük plastik kan alma tüpleri içerisine en az 10 ml kan alınmalıdır. Bu mümkün olmuyorsa aynı hayvandan birkaç Eppendorf tüpe kan alınarak toplamdaki serum miktarının bir hayvan için en az 5 ml olması sağlanmalıdır. Bazı testler için diğer testlerden daha fazla serum gerekebilmektedir. Bu tarz testlerde HI testi için istenen miktar temel alınır sorun çıkmadan test yapılması mümkün olacaktır.

- Her örnek için tek kullanımlık şırıngalar tercih edilmelidir.
- Üzeri köpük köpük olmuş kanlardan serum çıkmayacağı için bunlar laboratuvara yollanmamalıdır.
- Serumlar kandan olanak varsa santrifüjle eğer yoksa doğal pıhtılaşma yoluyla (oda sıcaklığında 1-2 saat bırakılıp) ayrılmalıdır.
- Eğer örnek alınan çiftlik laboratuvara alımdan sonra en geç 24 saat içinde ulaşılabilecek uzaklıktaysa serum çıkartılmadan sadece kan olarak örnekler yollanabilir ancak bu durum kesinlikle serum çıkacağını garantisini vermeyecektir.
- **ÖRNEKLER DOĞRU BİR ŞEKİLDE TANIMLANMALIDIR ve ETİKETLENMELİDİR** (Şirket Adı, Çiftlik Adı, Sürü Kodu, Yaş, Kanatlı Tipi vb.)
- Göndermeden önce kısa süreli muhafazalar (< 24 saat) için $5 \pm 3^{\circ} \text{C}$ de buzdolapları kullanılabilir.
- Uzun süreli muhafazalar içinse $-22 \pm 3^{\circ} \text{C}$ lik derin dondurucularda hava geçirmeyecek bir biçimde mikro santrifüj tüpleri (Eppendorf 1.5 ml) veya üzerleri hava geçirmeyen filmle kaplanmış mikro plaklar düzgün bir biçimde etiketlenerek kullanılabilir.
- Daha önce birkaç kez dondurulup çözülmüş örnekler test için uygun olmayabilirler.
- Hemolizli veya bulanık serumlar birçok tetkik için uygun değildir. Yeniden örnek alınmalıdır!
- Alındıktan kısa bir süre sonra renk değiştiren veya kokan (özellikle kesimhanelerden alınan kan örneklerinde bu durum görülür) örnekler kesinlikle yollanmamalıdır. Bu örneklerde yer alan proteolitik enzimler Eliza sonuçlarının değişmesine neden olmaktadır.

ÖRNEK SAYISI

Bir sürüyü temsil edecek gerçek ortalama titre değerlerinin saptanmasında rastgele örnekleme kadar alınan örneğin kaç adet olacağı da önem taşır. Örnek sayısı bir sürüde elde edilen değerlerin birörnek veya değil (üniformite değeri) olmasında büyük önem taşımaktadır. Buna göre çok genel olarak bir sürüde titre değişkenliği ne kadar fazlaysa (non-uniformity) doğru ortalama değeri verebilmesi için o kadar fazla örneğin alınması gerekir. Bu yüzden örnek sayısı bakımından kontrolün en doğru yapılması sürü geçmişindeki ortalama değerlerin kontrol edilmesiyle mümkün olur.

Pratik uygulamada bir sürüden alınacak örnek sayısı; istatistiksel olarak doğru kabul edilen sayıyla, örneğin analizinin işletmeye olan maliyetinin bir karışımından ibarettir. Ama bu karışım yapılırken parayı tasarruf edebilmek gayesiyle örnek sayısının azaltılması sonuçların güvenilirliği ve doğruyu yansıtması üzerinde ciddi olumsuz etkiler yaratabilir.

Tablo 1. de günlük bir broyler sürüsünden alınan ve 100 örnek içeren bir gurubun içinden rastgele seçimle daha küçük guruplara bölmeler yapılması sonucunda ortalama titre değerlerinin nasıl etkileneceği oldukça güzel açıklanmıştır.

Bu 100 serum örneği bir ticari firmanın Eliza kitiyle IBD-Gumboro testine tabi tutulmuştur. Buna göre ortalama titre 4057 ve %CV (değişim katsayısı) 48 olarak bulunmuştur. Tahmini aşılama günü (TAG) Log₂ metodu ve Deventer Log₂ metotlarıyla 19. gün ve 21. gün olarak bulunmuştur. Daha sonra örnekler tesadüfi seçme yoluyla değişik guruplara ayrılmış ve guruplarda ortalama titreler ile %CV ler tespit edilerek TAG leri yine Log₂ metodu ve Deventer Log₂ metotlarıyla hesaplanmıştır. Bu işlem toplam 16 kez yapılmıştır.

Tablo 1. Log₂ metodu kullanılarak Ortalama Sürü Titresi ve Aşı Günü Tayininde(AGT) Örnek Sayısının Rolü

Grup için Örnek sayıları	Ortalama Titre		% CV		AGT	
	En Düşük	En Yüksek	En Düşük	En Yüksek	En Düşük	En Yüksek
46	3712	4449	42	58	20	22
30	3333	4779	37	57	20	22
23	3388	4753	40	64	20	22
15	3390	4973	33	62	19	22
10	2374	5260	25	71	17	23
5	2221	5371	23	71	16	23

Buradan açıkça görülebileceği üzere örnek sayısı azaldıkça, ortalama titredeki sapma, % CV ve tahmini aşı günlerinde artış meydana gelmektedir. Bu durumu 23 örnek için düşünecek olursak, ortalama titre değeri 3388 ile 4753 arasında çıkacak, CV değeri % 40 ile %64 arasında olacak ve AGT 20. gün ile 22. gün arasında belirtilecektir. 10 örnek düşünülecek olursa, tahmini ortalama titre 2374 ile 5260 arasında dalgalanacak, CV değeri ise % 25 ile %71 arasında olacaktır!

Yine buradaki verilerden anlaşılacağı üzere 23 ve 46 örnek arasında, ortalama titredeki sapmalar anlamında çok büyük bir fark görülmemektedir. Ancak örnek sayısı 23 ün altına düştüğünde ortalama titrenin tahminindeki sapmalar büyük oranda artmaktadır. Örnek sayısı azaldıkça artan değişkenlik, ortalama titre hesaplamasına ve aşı günü tayinine olan güvenin yitirilmesine de yol açmaktadır.

AKTL-LEK-02/03/01
7/10

Tablo 2 her örnek gurubunun sayısına göre tahmin edilen ortalama titrenin % kaçının, 100 örnek için geçerli olan %20 lik gerçek ortalama titre aralığına düştüğünü göstermektedir. Ayrıca her örnek gurubunun sayısına göre tahmin edilen AGT nin, hangisinin gerçek ortalama aşı günüyle en çok 1 gün farkla uyuştüğunu da göstermektedir.

Tablo 2. Örnek büyüklüğüyle gerçek sürü ortalamasının % sonuç güvenilirliğiyle olan ilişkisi.

Grup için Örnek sayıları	Ortalama Titre	AGT	
	4057 nin +/- %20 değişim % de kaçına tekabül ettiği	Ortalama +/- 1 günle LOG ₂	% de kaçına tekabül ettiği Deventer LOG ₂
46	% 100	% 100	% 100
30	% 100	% 100	% 100
23	% 100	% 88	% 100
15	% 88	% 88	% 94
10	% 50	% 43	% 57

- Gerçek Topluluk Ortalama Titresi (GTOT) 4057 olmuştur, GTOT içinde tahmini ortalama titreler ise kabul edilebilir tahminler için +/- %20 değişim oranlarıyla tanımlanmışlardır.
- Gerçek ortalama AGT Log₂ metodu ile 19. gün ve Deventer Log₂ metoduyla da 21. gün olarak bulunmuştur, tahmini ortalama AGT ise kabul edilebilir tahminler için 1 günlük değişim oranıyla tanımlanmıştır.

ÖRNEK SAYISINA İLİŞKİN VARILACAK SONUC

Örnek sayısı için “eşik değeri”, güvenilirlik ve tekrar üretilebilirlik kıstaslarına göre, 23 civarında görülmektedir. 23 örnekten daha az örneklerle test yapılması durumunda AGT ve ortalama titre değerlerinin güvenilirliği ve tekrar üretilebilirliğinde ciddi derecede azalmalar gözlenmiştir.

Yukarıdaki verilerin ışığında, hem uygulama kolaylığı hem de istatistiksel açıdan doğruluğu düşünülerek 23 örnek bir sürünün AGT veya sürü için temel oluşturabilecek profilin oluşturulmasında yeterli görünmektedir. Daha önce sürüye ait temel oluşturabilecek uzun dönemli bir çalışma yapılmamışsa bu sayının altındaki örnekler genel sürü profilinin ortaya çıkarılmasında herhangi bir işe yaramayacak, var olan sürüler için de yanlış yönlendirmelere neden olabilecektir.

Ekonomik açıdan yarar sağlayabilmek için örnek sayısından ödün verilmesi, ortalama titrelerin hesaplanmasında ve güvenilir olmasında yanlışlıklara yol açacak ve geri dönülmesi olanaksız yanlış kararlar verilmesine neden olabilecektir.

Hastalıklar için izleme yapılırken, örnek sayısının belirlenmesi enfeksiyon % si ve örnekleme sıklığına göre yapılır. Düşük enfeksiyon düzeylerinde (< % 2-5) titrelerin belirlenmesi isteniyorsa (mesela Salmonella izlemesi)örnek sayısınının 23 ün oldukça üzerinde olması gerekebilir. Tablo 3 konu hakkında daha ayrıntılı bilgi vermektedir.

Tablo 3. İzleme Programı: Örnek sayısı, sürüdeki hayvan sayısı ve enfeksiyon oranı ilişkisi

HERHANGİ BİR HASTALIĞIN ÇEŞİTLİ ŞİDDETTEKİ VARLIĞININ VEYA BİR BULAŞMANIN % 95 GÜVENLE TESPİT EDİLEBİLMESİ İÇİN GEREKLİ ÖRNEK SAYISI

Sürü Hayvan Sayısı (N)	BULAŞMA ORANI (n=Örnek Sayısı)						
	%20 n	%10 n	%5 n	%2 n	%1 n	%0.5 n	%0.1 n
20	10	15	19	48	20	20	20
50	12	22	34	77	50	50	50
100	13	25	44	94	96	100	100
200	13	26	45	105	158	190	200
500	14	28	55	128	225	349	500
1000	14	28	56	138	258	450	950
5000	14	28	58	146	290	564	2253
10000	14	28	58	147	294	581	2588
100000	14	28	58	148	299	596	2995

5000 - 10000 hayvanlık bir sürüde % 10 luk bir enfeksiyon oranını yakalayabilmek için rastgele 28 örnek alınmalıdır. 5000 - 10000 hayvanlık bir sürüde % 2 lik bir enfeksiyon oranını yakalayabilmek için ise rastgele 147 örnek alınmalıdır.

Revizyon 3: Revizyon durumu en arka sayfaya taşındı.

Revizyon 2: Tablo 2 ve Tablo 3 güncellendi.

BİLGİ İÇİNDİR