



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-D-2010-001**

**BROİLER PİLİÇLERDE İMMUN KOMPLEKS İNFEKSİYÖZ
BURSA HASTALIK (GUMBORO) AŞISININ ETKİNLİĞİNİN
ELISA İLE ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Vet. Hek. M. Meltem YILMAZLAR

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman KAYA**

AYDIN-2010

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-D-2010-001**

**BROİLER PİLİÇLERDE İMMUN KOMPLEKS İNFEKSİYÖZ
BURSA HASTALIK (GUMBORO) AŞISININ ETKİNLİĞİNİN
ELISA İLE ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Vet. Hek. M. Meltem YILMAZLAR

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman KAYA**

AYDIN-2010

ÖNSÖZ

Ülkemiz hayvancılık sektörünün dinamik ve teknolojik üretim dallarından biri olan etlik piliç üretim endüstrisi her yeni teknolojiyi uygulayarak sağlık ve kârlılık konusunda ciddi süreçler kaydetmektedir. Üretim ile ilgili her yeni bilgi ve deneyim sektörcce değerlendirilmekte ve yapılan araştırmalar dünya üretim persentillerini aştığını göstermektedir. Bu gelişim hem ülkemiz adına hem de hayvancılık sektörünün gelişimi adına önemli bir sonuçtur.

Ancak sektörün halen birçok sağlık ve sürü yönetim problemi ile karşı karşıya olmaları, çözülmesi gereken birçok sorunun varlığını göstermektedir. Sektörün, piliç üretim işini, hayvancılıkla uğraşan kümes sahipleri ile yapması büyük üretim potansiyeline sahip şirketlerin kârlılığını direkt olarak etkilemektedir. Kümes sahiplerine yönelik yapılan tüm eğitim programlarına rağmen ciddi yetiştirme sorunları ortaya çıkmaktadır.

Kümes içi sağlıklı üretim sürecinde sorunların büyük kısmı yeterli havalandırma, ısı stresi, yem kombinasyonları, dezenfeksiyon ve sürü aşılama programının düzgün bir şekilde yürütülmesi ile ilgili oluşmaktadır. Eğitim düzeyi düşük yetiştiricilerin konuyu yeterince ciddi bir şekilde ele almamaları, kümes ekipman ve donanımının yetersiz olması büyük entegre tesislerin işini zorlaştırmaktadır.

Aynı zamanda infeksiyon etkenlerinin insidensinin, virulansının değişmesi ve farklı şekillerde ortaya çıkması sürü yönetimi ile ilgili yeni bilgilerin ve uygulamaların gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

Gumboro infeksiyonu kanatlı yetiştiriciliğinin tüm tarihi ile beraber problem olmaya devam eden önemli bir infeksiyondur. Etkenin virulans değiştirmesi, farklı günlerde, farklı şekillerde ortaya çıkması ve immunsupresif etkiye sahip olması, böylelikle diğer infeksiyonlarla ilgili aşılama programlarının başarısını etkilemesi bu konu ile ilgili çalışmaları yoğunlaştırmıştır.

Tüm aşı geliştirmelerine rağmen sürüye içme suyu ile aşı uygulaması sırasında ortaya çıkan kümes içi aksaklıklar aşılanmanın etkinliğini değiştirmektedir. Ayrıca damızlık sürülerinin aşılama programlarına bağlı olarak gelişen maternal koruma da her zaman beklendiği seviyede gelişmemektedir.

Bu çalışma ile broiler piliçlerde, damızlık sürülerden kaynaklanan yetersiz bağışıklık ve daha sonra kümeste oluşabilecek sorunları aşmak üzere geliştirilen CEVAC TRANSMUNE IBD® isimli immunkompleks aşının etkinliğinin ELISA ile araştırılması hedeflenmiştir.

Bu araştırma ADÜ BAP tarafından SAE 09016 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	iv
RESİMLER DİZİNİ	v
1. GİRİŞ	1
2. GEREÇ VE YÖNTEM	13
2.1. Cıvıv Materyali	13
2.2. Örneklemeler	13
2.3. Aşılar ve Aşılama Programı	13
2.3.1. İmmun Kompleks Aşı Programı	13
2.3.2. Standart Entegrasyon Aşı Programı	14
2.4. Serolojik Kontrol	14
2.5. Sonuçların yorumlanması	16
2.6. Antikor titresinin hesaplanması	17
2.7. İstatistiksel değerlendirme	17
3. BULGULAR	18
3.1. Klinik Gözlem	18
3.2. Serolojik Bulgular	18
4. TARTIŞMA	21
5.SONUÇ	27
6. ÖZET	28
7. SUMMARY	29
8. KAYNAKLAR	30
9. ÖZGEÇMİŞ	37
TEŞEKKÜR	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.:	Birnaviridae ailesi	2
Çizelge 2.5.1.:	ELISA testi kriterleri	16
Çizelge 2.6.1.:	ELISA testi antikor titresi değerlendirme kriterleri	17
Çizelge 3.2.1.:	IBDV antikorlarının firmalara göre ortalama değerleri ve istatistiksel sonuçları	19

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.2.1.: Ortalama titre değerleri

20

1. GİRİŞ

İnfeksiyöz bursal hastalık (*Infectious bursal disease*, IBD) veya Gumboro Hastalığı infeksiyöz bursal hastalık virusu (IBDV) tarafından meydana getirilen, 3 haftalıktan büyük piliçlerde akut seyreden, çok bulaşıcı viral bir hastalıktır. Yüksek düzeyde mortalite ile seyreden IBD, hastalığı geçiren piliçlerde immunsupresyona, sekonder infeksiyonlara ve aşılama ile oluşturulan bağışıklık düzeyinin düşük olmasına sebep olmaktadır.

IBD ilk kez Cosgrove (1962) tarafından, böbreklerde yaptığı hasar sebebiyle “*Avian Nephrosis*” olarak tanımlanmıştır. 1970 yılında avian nephrosisli bir tavuğun böbreğinden Gray suşu izole edilmiştir (Akan 2002). Başlangıçta bu suşun IBDV infeksiyonunun etkeni olduğu zannedilirken, daha sonraki çalışmalarda Gray suşu ile immunize edilen deneme hayvanlarının enfeksiyöz bursal ajan ile enfekte oldukları ve bursa Fabricius’larında değişiklikler olduğu gözlenmiştir. Böylece Gray virusunun böbreklerde nefrotoksik etki yapan *İnfeksiyöz Bronşit Virus* olduğu, Gumboro hastalığını meydana getiren virusun ise bundan farklı olduğu kabul edilmiştir. Hastalık ilk defa A.B.D.’de Delaware’de Gumboro bölgesinde görüldüğü için *Gumboro Hastalığı* denmiştir (Pitcovski ve ark 1998).

Piliçler, IBD hastalığının klinik formunun ve karakteristik lezyonlarının görüldüğü türlerin başında gelir. Hindiler, ördekler ve deve kuşları IBD’ye duyarlı olmalarına rağmen klinik olarak direnç gösterirler (Lukert ve Saif 1997, McNulty ve ark 1979).

Çizelge 1.1. Birnaviridae ailesi

Aile	Cins	Tür	Sinonim
Birnaviridae	Aquabirnavirus	İnfectious pancreatic necrosis virus	IPNV
	Avibirnavirus	İnfectious bursal disease virus	IBDV
	Entomobirnavirus	Drosophila X virus	DXV

IBDV *Birnaviridae* familyasının *Avibirnavirus* cinsinin bir üyesi olup çift iplikçikli iki RNA segmentine (A ve B) sahiptir (Murphy ve ark 1995). IBDV izolatları incelendiğinde antijenik özellikleri birbirinden farklı iki serotipin varlığı belirlenmiştir. Serotip 1 ve serotip 2 olarak tanımlanan bu suşlar, virus nötralizasyon (VN) testi ve elektroforetik olarak birbirlerinden ayrılırken, floresan antikör testi (FAT), agar jel presipitasyon (AGP) ve ELISA ile ayrılamazlar (Sapats ve ark 2000). Virus genomu 5 viral polipeptid içerir. A segmenti VP2-5, B segmenti VP1 ile kodlanır. VP2 ve VP3 viriondaki en büyük yapısal proteinlerdir. Bu nedenle VP2, kanatlıların koruyucu bağışıklığında en çok tercih edilen proteindir. VP1 proteini yaklaşık olarak 90 kD, VP2-5 proteinleri yaklaşık olarak sırasıyla 41 kD, 32 kD , 28 kD ve 21 kD moleküler ağırlığına sahiptirler (Akan 2002, Lukert ve Saif 1997).

Birnavirus'ların replikasyonu ile ilgili biyokimyasal olaylar hakkında çok az şey bilinmektedir. Virusun tavuk embriyo böbrek hücrelerine inokulasyonundan 75 dakika sonra tutunduğu gösterilmiştir. Tavuk embriyo hücrelerinde virusun çoğalma siklusu 10-36 saattir ve latent periyod 4-6 saattir. Vero ve BGM-70 hücrelerinde daha uzun (48 saat) bir çoğalma siklusu bildirilmiştir. Viral polipeptidler, in vitro olarak üretilen tavuk bursal lenfoid hücrelerinde ve kültür ortamlarında, infeksiyondan sonra sırasıyla 90 dakika ve 6 saatte saptanmıştır (Akan 2002, Lukert ve Saif 1997).

IBDV birçok ülkede kanatlı sektöründe endemiler oluşturan zarfsız bir virustur. Virus dezenfektanlara karşı uzun süre dirençlilik gösterebilme özelliğine sahiptir. Etken, eter ve kloroform ile muameleye dirençli bulunmuş, pH 12'de inaktive edilmiş, pH 2'de etkilenmemiştir. 6 °C'de 5 saat, 60 °C'de 30 dakika canlılığını korur. Virus, 30 °C'de 1 saat süreyle % 0.5'lik fenol ve % 0.125'lik thimerosaldan etkilenmemiştir. Virus infektivitesinde 6 saat boyunca % 0.5'lik formalin uygulandığında önemli bir azalma gözlenmiştir. Buna karşın

formalin, kloramin ve iyot bileşikleri IBDV'ye etkin bulunmuştur (Akan 2002, Lukert ve Saif 1997).

Virus, kanatlı ve memeli eritrositlerini hemaglutine etme özelliğine sahip değildir. IBDV virusunu embriyolu tavuk yumurtasında (ETY) ve doku kültüründe üretmek mümkündür. İzolasyonda kullanılacak ETY'lerinin IBD yönünden aşısız ve hastalıksız tavuklardan elde edilmesi oldukça önemlidir. Virusu üretmede inokulasyon için ETY'lerin koriyo allantoik membranı en duyarlı, yumurta sarısı orta ve koriyo allantoik boşluk ise az duyarlıdır. Virus izolasyonu amacıyla kullanılan embriyolu yumurtaların embriyolarında, inokulasyondan sonra 3. günden 5. güne kadar ölümler görülür. Embriyoda gözlemlenen makroskopik lezyonlar, abdominal bölgenin ödematöz şişkinliği, kutanöz konjesyon ve özellikle de tüy kanalları boyunca şekillenen peteşiyal kanamalar, ayak eklemlerinde ve serebral bölgede nadir olarak görülen kanamalar, karaciğerde benekli görünümlü nekroz ve ekimotik kanamalar, kalbin yarı pişmiş görünüm alması, böbreklerde benekli nekroz ve konjesyon, akciğerlerin aşırı konjesyonu ve nadiren küçük nekrotik odaklı, solgun dalak olarak gözlenmektedir. CAM'da plaklar bulunmaz ancak bazen hemorajik alanlar gözlenebilir. IBDV varyantları tarafından embriyolarda oluşturulan lezyonlar standart izolatlar tarafından oluşturululardan farklılık gösterir. Varyant suşlar, dalakta büyümeye ve karaciğerde nekroza neden olur, ancak embriyolardaki mortalite düşüktür (Akan 2002, Lukert ve Saif 1997).

Subunit aşılar VP2'yi içerirken, canlı rekombinant vektörel viral aşılar sadece VP2'yi veya diğer viral proteinlerle yapılan kombinasyonları içermektedirler (Bayliss ve ark 1991, Darteil ve ark1995, Fahey ve ark, 1989, Hein ve Boyle 1993).

IBDV özellikle civcilerde ve genç piliçlerde çok yaygın olarak infeksiyon oluşturmaktadır. Özellikle aşılanmamış çiftliklerde virus ölümlere ve immunsupresyona sebebiyet vermektedir. IBD virusunun kanatlı sektöründeki kayıpları daha çok immunsupresif etkisinden kaynaklanmaktadır. İmmunsupresif çiftliklerdeki performans gelişmeleri zayıf olmakta ve ekonomik kayıpları artırmaktadır (Lasher ve Shane 1994, Lukert ve Saif 1997).

Normal koşullar altında, infeksiyon en çok oral yol ile şekillenir. Viruslar bağırsaklardan fagositik hücreler ile diğerk doku ve hücrelere taşınırlar. İnfeksiyonun ilk birkaç saati içinde viral antijen karaciğerk ve böbreklerde tespit edilmiştir. Viral replikasyon öncelikle bursa Fabricius'ta şekillenir (Akan 2002). IBDV'nin replikasyon için temel hedef organı bursa Fabricius ve özellikle B lenfositlerdir (Chettle ve ark 1989, Kibenge ve ark 1988). İnfekte bursa Fabricius'ta genellikle yangı, hemoraji, lenfositolizis ve organın atrofisi görölmektedir (Van den Berg 2000). IBDV ile enfekte piliçlerde her iki humoral ve sellöler immunitede baskılanma görölmektedir (Confer ve ark 1981, Dohms ve Jaeger 1998, Panigrahy ve ark 1982). In-vivo ve in-vitro çalışmalarda (Ivanyi ve Morris 1976; Kaufer ve Weiss 1980) virusun IgM karakterli B lenfositlere duyarlılık gösterdiğik ortaya çıkarılmıştır. Virus bursa Fabricius'daki hücrelere ve bursal foliköllerine hızla yayılır. Virusun replikasyon için, lenfoid hücreler ve foliköllerin kortikal bölgelerine ihtiyacı bulunmaktadır (Tanimura ve Sharma 1997). Virusun akut litik fazı IgM hücrelerin dolaşımında azalması ile ortaya çıkmaktadır (Rodenberger ve ark 1994). T lenfositler IB hastalığına ve virusa dirençlidirler. İnfeksiyonunun akut döneminde, timusta atrofi ve timus hücrelerinde büyük çaplı bir apoptozis görölmemesine rağmen, virusun timus hücrelerinde replikasyonu ile ilgili hiçbir kanıt bulunmamaktadır. Timusun fiziksel olarak büyümesi ve mikroskobik lezyonların görölmesi kısa sürede gerçekleşir. Ancak virus infeksiyonu seyreden birkaç gün içerisinde normal pozisyonuna geri dönmektedir (Sharma ve ark 1989).

IB hastalığı piliçlerde immunsupresyon ile sonlanmaktadır. Virus çiftliğe girdikten 2-3 hafta sonra immunsupresif etkiler görölmeye başlamaktadır (Allen ve ark 1972). Hastalığın bu etkisi çiftliklerde farklı şekillerde kendini göstermektedir. Özellikle üretim performansının düşmesi başta gelmektedir. Ayrıca sekonder infeksiyonların artması, yemden az yaralanma, aşılamalardan sonra zayıf bağışıklık elde edilmesi gibi etkilerde görölmektedir (Giambrone ve ark 1977, Kim ve ark 1999).

Türkiye'de infeksiyonun varlığına ait ilk rapor Kandil (1978) tarafından bildirilmiştir. Araştırıcı Çukurova bölgesinde broyler ırkı piliçlerde IBDV infeksiyonun seyrettiğini ve otopside but ve göğüs kaslarında ağır kanamalar ile bursa Fabricius'ta büyüme şekillendiğini

ve bu vakalardan virusu izole ettiğini bildirmiştir (Kandil 1978). Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda Türkiye'nin muhtelif bölgelerinde IBDV'u izole edilmiştir (Ergün 1989). Sero-sörvey çalışmaları ile Konya çevresindeki aşısız kümeslerde IBDV virusuna karşı %31.3 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir (Baysal ve Bozkır 1989).

IBDV partikülleri zarfsız, ikosahedral kapside sahip ve yaklaşık 60 nmc çapındadır. Çift iplikçikli olup iki RNA segmentine sahiptir (Müler ve ark 1979). Yeni bir virus familyası olan Birnaviridae'nin (Dobos ve ark 1979) tek üyesi olan Birnavirus içinde yer almaktadır (Leong ve ark 2000). Temel olarak A ve B olmak üzere iki genom segmenti bulunmuştur (Mundt ve ark 1995). Bu segmentler üzerinde çeşitli işlevlere sahip viral proteinler yer almaktadır. Bunlar major proteinler: VP2, VP3 ve minör proteinler: VP1, VP4 olarak ayrılmaktadır

VP1; viral RNA polimeraz olarak virionda az miktarda bulunur. Serbest poliprotein ve genoma bağlı poliprotein olarak bulunur (Kibenge ve Dhama 1997, Müller ve Nitschke 1987). Viral partiküllerin enkapsidasyonunda anahtar rol oynamaktadır (Lombardo ve ark 1999).

VP2; antikorların nötralizasyonunu uyaran ve serotip spesifiteyi sağlayan antijenik bölgeler içerir (Fahey ve ark 1989). Yüksek düzeyde hidrofobik olup tüm nötralize edici monoklonal antikorların immunopresipitasyon reaksiyonlarında gözlenebilir. Fakat Western Blotta gözlenmez (Oppling ve ark 1991a, Schnitzler ve ark 1993, Van den Berg ve ark 1996).

VP3; nötralize etmeyen antikorlar tarafından grup spesifik antijen olarak tanınır ve her iki serotip 1 ve serotip 2 içinde kros reaksiyon verir (Becht ve ark 1988, Oppling ve ark 1991a).

VP4; küçük ve yapısal olmayan bir polipeptiddir. Viral proteaz olarak VP2a, VP3 ve VP4'ün üretilmesini sağlar (Azad ve ark 1987). Bilinen diğer protezlar ile küçük benzerlikler göstermesine rağmen, spesifik proteolitik aktivitesi tespit edilmiştir (Hudson ve ark 1986).

VP5; ilk kez IPNV (infectious pancreatic necrosis virus) partiküllerinde tanımlanmıştır (Haverstein ve ark 1990). Yapılan çalışmalarda IBDV ile enfekte hücrelerde identifiye edilmiştir (Mundt ve ark 1995). Viral yapıya katılımı ile ilgili bir bilgi yoktur. Bu viral protein daha çok düzenleyici fonksiyona sahip olup virusun içinde bulunduğu hücreyi patlatıp dışarı salınımı ve yayılmasında anahtar rol oynamaktadır (Mundt ve ark 1997).

IBDV'nin virus nötralizasyon testi tarafından iki serotipi belirlendi. Serotip 1 patojenik suşu içermektedir. Serotip 2 hindilerden izole edilmiş olup hastalığa neden olmadığı gibi tavuklarda serotip 1'e karşı korumayı da sağlamamaktadır. Antijenik varyant suşlar Amerika'da bildirilmiştir (Synder ve ark 1988). Orta Amerika (Jackwood ve Sommer 1999) ve Avustralya'da (Spats ve Ignjotovic 2000) tespit edilen vakalar bulunmaktadır. VP2'de bulunan antijenik bölge antikorların nötralizasyonunu uyarır (Becht ve ark 1988). Serotip 1 içinde nükleotid ile karşılaştırıldığında VP2'nin kodlandığı bölgede farklılıklar olduğu ve değişken VP2 (hyper) bölge olarak dizayn edildiği gözlenmektedir (Bayliss ve ark 1990). Bu durum kaçak mutantların gelişimini (Oppling ve ark 1991a) açıklamaktadır. Grup ve nötralize olmayan serotip spesifik epitoplar temel olarak VP3'te lokalize olmuştur (Oppling ve ark 1991b). VP2'nin değişimleri ile ortaya çıkan IBDV suşları Avrupa, Afrika ve Asya'da aynı zamanda ortaya çıkmış olup aynı grupta yer aldığı (Cao ve ark 1998, Chen ve ark 1998, Pitccovski ve ark 1998, Zierenberg ve ark 2001), antijenik ve genetik yapılarının benzerliler gösterdiği tespit edilmiştir (İslam ve ark 2001a).

Bursektomize edilmiş tavuklarda IBDV enfeksiyonu letal seyrederken, normal tavuklarda patojenik serotip 1 suşunun hedef organı bursa Fabricius'tur. Bursa Fabricius'ta yüksek miktarda antijen ve yüksek virus titresi tespit edilirken, düşük düzeyde antijen ve virus titresi de timus ve dalakta tespit edilmiştir. IBDV gelişen B lenfositlerde replike olurken çok gelişmemiş lenfoblastlarda bulunmamaktadır (Beug ve ark 1981, Müller 1986). Serotip 2 suşu lenfoid hücrelerde replike olmaz. Fakat tavuk embriyofibroblastlarda ve serotip 1 suşu için adapte edilmiş doku kültürlerinde gelişme göstermektedir (Niepper ve Müller 1996, 1998). Ogawa'nın yaptığı çalışma IBDV'nin bağlı olduğu molekülün N-glycosylated proteinden oluştuğunu göstermiştir (Ogawa ve ark 1998). Diğer bazı viruslarda bilindiği gibi IBDV enfeksiyonu tavuk embriyofibroblastlarının potasyum akımını da değiştirmektedir (Repp ve ark 1998). Bu durum membran permeabilitesinde değişiklik yapar ve intrasellüler iyon

homeostazisini etkileyerek sitolizisin oluşmasına ve infekte hücrelerin ölümüne yol açmaktadır. Double-labelling tekniği ile yapılan çalışmalar IBDV'nin replikasyonu ile artan apoptozisin infekte tavuk embriyo hücrelerinde, bursa hücrelerinde ve civardaki antijen–negatif hücrelerde olduğunu göstermektedir (Jungmann ve ark 2001, Nieper ve ark 1999). Apoptik hücre oranı IBDV'nin replikasyon etkinliğine bağlıdır. UV ile inaktive edilmiş IBDV partikülleri apoptosise neden olmamaktadır. Nekroz, IBDV ile infekte bursa hücrelerinin apoptozisin etkisiyle hızla tüketilmesinden oluşmaktadır.

Akut infeksiyondan sonra yaşamaya devam eden piliçlerde virus replikasyonu azalır, bozulan bursal folliküller tekrar B hücreleri ile yeni popülasyonlar oluşturur. IBDV'nin indüklediği immunopatogenez ve dokuların iyileşmesinde T hücrelerinin rolü üzerine yapılan çalışmalarda infeksiyondan 7 gün sonra bursa Fabricius'ta maximum düzeye ulaşan CD4 ve CD8 hücrelerinin her ikisinin de infiltrasyonu olduğu tespit edilmiştir (Kim ve ark 2000, Sharma ve ark 2000). Viral replikasyonun olduğu hastalığın erken fazında bulunan intrabursal T hücreleri sitokinler ve sitotoksik efektlerin salınması ile doku iyileşmesini geciktirerek bursal doku hasarını artırmaktadır (Rautenschlein ve ark 2002a). Son çalışmalarda hücreselel immunitenin rolü (Yeh ve ark 2002) ve virus-spesifik antikorların önemi (Rautenschlein ve ark 2002b) araştırılmaktadır. Yapılan bu araştırmaların sonucu IBDV'ye karşı oluşan humoral immunitenin korumada yeterli olmadığı görüşü gelişmiştir. T hücrelerinin bulunması koruma için kritik bir değer olduğunu göstermiştir (Van den Berg ve ark 2000).

Bir IBDV infeksiyonunun geniş olarak ortaya çıkması suşa, enfekte eden virusun miktarına, sürünün kendi ve damızlığının yaşına, inokulasyon yoluna, nötralize edici antikorların varlığına veya yokluğuna bağlıdır. Serotip 1/ serotip 2 IBDV'nin genom A segmenti bursa tropizmi taşır, segment B virus replikasyonunun etkinliğini içerir (Zierenberg ve ark 2003). Patojenik serotip 1 saha suşu içerisinde klasik virulent (cv) ve çok virulent (vv) patotipler ve antijenik varyant suşlar grup oluşturur. Determinantların virulensini tanımak için (özellikle de vv patotipin karakteristik özelliklerini) birçok çalışma yapılmıştır. In vivo çalışmalar, filogenetik analizler sonucu VP2 rezidülerinin moleküler determinantları virulans, hücre tropizmi ve vvIBDV'nin patojenik fenotipi oluşturulabilir (Brandt ve ark 2001, Yamaguchi ve ark 1996). Diğer taraftan Boot ve arkadaşları (2000), cv ve vv fenotipleri arasında VP2 üzerine yaptığı çalışmada virulans için tek determinantın VP2 olmadığını göstermiştir. ORF'nin VP1'i kodladığı bölgede yapılan çalışma (Islam ve ark 2001) bu

multifonksiyonel proteinin virus replikasyonunda ve virulans üzerinde kritik etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Doku kültüründe replikasyon için IBDV'nin adaptasyonu attenüasyon için geliştirilmiştir (Lange ve ark 1987). Doku kültüründe cvIBDV'nin tekrarlanan pasajları küçük plak fenotipinin oluşmasına yol açmış ve yüksek düzeyde attenüe edilerek (Müler ve ark 1986) uzun yıllar canlı aşı olarak kullanılmıştır. Wild-tip IBDV suşları, özellikle vvIBDV suşları normal olarak hücre kültürlerinde ürememektedir. VP2 içindeki spesifik aminoasitler tanımlanarak IBDV'nin doku kültürüne adaptasyonu sağlanmıştır (Lim ve ark 1999, Yamaguchi ve ark 1996).

Son yapılan *in vivo* çalışmalarla, *site-directed mutagenesis* ve *reverse genetic* yaklaşım ile tavuk embriyo hücre kültürlerine adapte edilen vvIBDV'u SPF tavuklar (Van Loon ve ark 2002) ve ticari tavuklar (Raue ve ark 2004) için parsiyel olarak attenüe edilmiştir.

Tavuk sürülerinde klinik tablo ve hastalığın seyri genellikle IBDV enfeksiyonunun göstergesidir. Bursa Fabricius'taki değişiklikler karakteristiktir. Histopatolojik çalışmalarla immunohistokimyasal olarak gösterilen viral antijenler kombine edildiğinde IBDV enfeksiyonu doğrulanmaktadır. IBDV antikorsuz yumurtalara inokule edildiğinde izole edilebilmektedir. Viral antijenler agar jel presipitasyon (AGP) veya antigen-capture ELISA (AC-ELISA) ile göstertilebilmektedir. Spesifik IBDV antikorların varlığı ticari ELISA sistemleri ile tespit edilebilmektedir. Virus nötralizasyon (VN) testi serolojik bir test olup IBDV izolatlarının antijenik serotiplerini ve subtiplerini güvenli olarak ayırmaktadır (Jackwood ve Saif 1987).

Son günlerde IBDV teşhisinde *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR) sıklıkla kullanılmaktadır. RT-PCR vvIBDV'nin hızla identifiye edilmesini sağlamaktadır (Jackwood ve Jackwood 1994, Zierenberg ve ark 2001). *Restriction fragment lenght polymorphism* (RFLP) halen IBDV'nin altı farklı moleküler grubunu düzenlemek için kullanılmaktadır (Lui ve ark 2002, Viswas ve ark 2002). IBDV ile enfekte bursa Fabricius'ta

hastalığın erken dönemini tespit etmek için in situ RT-PCR geliştirilmiştir (Zhang ve ark 2002). IBDV'ları yüksek derecede virulent olup saha şartlarına son derece dirençlidir.

Aşılama, tavuklarda IB hastalığının kontrolünde uygulanan en temel metottur. Aşılama programlarının oluşturulması için birçok faktör göz önünde tutulmalıdır. Bu faktörler arasında, çevrede ve kümeste görülen infeksiyonun yaygınlığı, saha virusunun virulensi, civcivlerde maternal antikorların varlığı, düzeyi ve heterojenitesi, aşılama kullanılacak aşının cinsi (mild, intermediate, hot), aşılama yöntemi, hayvanın yaşı, yetiştirme şekli ve idari işlemlerin durumu bulunmaktadır. Attenüe aşı suşlarının geliştirilmesinden önce IBD'nin kontrolünde civcivlerin bilinçli olarak erken yaşta infeksiyona maruz bırakılması bir yöntem olarak uygulanmaktaydı. Bu uygulama daha önce hastalığı geçiren, civcivlerin maternal antikorlara sahip olduğu işletmelerde önerilmekteydi. Aynı zamanda 2 haftalık yaştan küçük olan genç civcivler IBD'nin klinik bulgularını göstermemekteydi. Erken yaşta şekillenen IBD infeksiyonlarının şiddetli immunosupresif etkilerinin bulunmasından sonra, virulant suşlarla yapılan kontrollü maruz bırakma uygulaması daha az çekici oldu. Birçok işletmede dönemler arası temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerinin tam anlamıyla yapılmaması ve virusun stabil ve güçlü yapısı nedeniyle civcivler doğal olarak erken yaşta subklinik infeksiyonlara yakalanmaktadır. Günümüzde, canlı ve inaktif aşılarla aşılanan anaçlardan elde edilen civcivlerde sağlanan yüksek maternal antikor düzeyi ve seçilen uygun aşı ve aşılama programları ile yukarıdaki durum elimine edilebilmektedir (Akan 2002).

IBDV infeksiyonlarından korunmada kullanılan aşılar pek çok firma tarafından üretilmektedir. Canlı aşılar mild, intermediate ve hot olarak gruplanmakta; virulansları ve antijenik güçleri farklılık göstermektedir. İnaktif aşılar özellikle damızlıkların aşılanmasında kullanılmakta diğer aşılarla kombine edilebilmektedir. Korumada kullanılacak aşılarda seçiminde, yukarıda belirtilen durumların gözönüne tutulması ve ölçümlenebilen değerlerin (maternal antikor seviyesi ve üniformitesi) belirlenmesi önemlidir (Akan 2002).

a) Mild (zayıf) aşılar: İmmunosupresyona yol açmamaları nedeniyle güvenilirlerdir. İmmun sistemi uyarma gücü düşüktür ve orta düzeydeki maternal antikordardan etkilenirler. Uygulamalarından etkin sonuçlar alabilmek için, düşük düzeyde maternal antikor taşıyan

civcivlerde kullanılması, alınan serum örneklerinin AGID testinde negatif veya VN titresi 1:100 değerinin altında olması gerekmektedir. Bu durumu taşımayan sürülerde kullanımında etkin sonuçlar alınmaz. Bu tip aşılar, intramusküler enjeksiyon, sprey veya içme suyuyla uygulanabilmektedir (Akan 2002).

b) İntermediate (orta-kuvvetli) aşılar: Bu aşılar günümüzde en fazla kullanılan IBD aşılardır. Mild ve hot aşılar arasında iyi bir denge oluştururlar. Orta düzeyde maternal antikorları aşır, iyi bir bağışıklık sağlayabilirler. Bu tip aşılar, hayvandan hayvana direkt temasla yayılır, hastalık, ölüm ve immunsupresyona neden olmazlar. Stabildirler ve pasajlarla virulans artma gözlenmez. Bu aşılar sprey ve içme suyuyla uygulanmaktadır. Kas içi uygulamaları nadirdir. Intermediate aşılar maternal antikor seviyesi düşük sürüler 1.gün sprey şeklinde uygulanabilir. Hastalığın yaygın olduğu bölgelerde ikinci aşı 10-14. günde ve gerekliyse 3. aşılama son aşılamaı takip eden 7-10. günde yapılabilir (Akan 2002).

c) Hot (kuvvetli, intermediate plus) aşılar: Intermediate aşılara göre daha patojendir. Orta ve yüksek düzeyde maternal antikorları aşır iyi bir bağışıklık sağlayabilirler. Kısmen immunsupresyon oluştururlar, pasajlar sonrasında virulans kazanabilirler. IBDV enfeksiyonlarında intermediate aşılardan yarar sağlanmadığı, yüksek ölümlerin görüldüğü bölgelerde, maternal antikor seviyesi orta yüksek olan sürülerde kullanılması gereklidir. Hot aşının kullanımı için aşılacak civcivlerin maternal antikor seviyesi ve heterojenitesi uygun bir serolojik yöntemle (ELISA gibi) saptanması immunsupresyon ve virulans artma gibi bazı problemlerin görülmesini ortadan kaldırmaktadır (Akan 2002).

d) İnaktif aşılar: Yağ adjuvanlı olarak tek bir kombine olarak piyasa sürülen aşılardır. Canlı aşılar ile aşılaman hayvanlarda oluşan bağışıklığın etkinliğini ve süresini uzatmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu aşılar genellikle damızlıklarda canlı aşılardan kullanımından sonra 16-18. haftalarda enjeksiyon tarzında uygulanmaktadır. Gerektiği durumlarda bazı sürülerde ve işletmelerde 40-45. haftalarda tekrarlanmaktadır. İnaktif aşılardan kullanılması ile üniform bir antikor düzeyi sağlamak da mümkün olmaktadır. Günümüzde variant suşla enfeksiyon görülen bölgelerde standart suşlar ile variant suşlardan hazırlanan

inaktif aşılar da bulunmaktadır. Aşının inaktif olması nedeniyle primer immun yanıt oluşturulmamış sürülerde uyarıcı güçlerinin düşük ve yavaş olması, sadece enjeksiyon tarzında uygulanabilmesi ve pahalı olması nedenlerinden dolayı, broyler sürülerde kullanımını sınırlıdır (Akan 2002).

e) Rekombinant aşılar: IBD virusunun VP2 antijeni, viral ve maya hücrelerinde ekspre edilmiş ve elde edilen ürün yüksek düzeyde immunojenik bulunmuştur. Ancak hazırlanan bu rekombinant aşılar henüz pazara ticari bir ürün olarak sunulmamıştır (Akan 2002).

Çıkımdan sonraki ilk haftalarda civcivleri koruma zorunluluğu ve yüksek enfeksiyon baskısı sıkı hijyenik önlemlere rağmen aşılamaı kaçınılmaz hale getirmiştir. Tüm yumurtlama dönemi boyunca antikor seviyelerini yüksek düzeyde tutmak için damızlıklar inaktif aşılarla aşılanmaktadır. Çıkımdan sonra civcivler canlı aşılarla immunize edilirler. Canlı aşılar maternal antikorları nötralize edebileceğinden zamanlaması büyük önem taşımaktadır. Koruma titreleri sürü içinde epeyce farklılıklar gösterebilmektedir. Yüksek düzeyde atenüe edilmiş aşı suşları (mild ve intermediate aşılar) ile elde edilen immunitenin vvIBDV suşları ile kırılabilceğı düşünölmelidir. Diğer taraftan az atenüe edilmiş aşı suşları (hot aşılar) bursa folliküllerinde lezyona neden olabilmektedir. Ayrıca aşılanmış tavuklarda immunsupresyon gözlenebilmektedir.

Aşı virusu in vivo şartlarda optimum miktarda antikor ile komplike edilerek “immun kompleks” bir aşı geliştirilmiştir (Whitfill ve ark 1995). Bu aşı in ovo aşılama için kullanılmıştır. Immun kompleks aşının çalışma mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, civcivlerde immunsupresyon etkilerinin azaltılmasına yönelik olup, daha iyi bağışıklık sağladığı ileri sürölmektedir. Bu çalışma ile broiler piliçlerde immunkompleks IBD aşısının (IBD-Icx) etkinliğinin ELISA ile araştırılması hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Cıvıv Materyali

Araştırmamız Ülkemizde bulunan iki entegre tesise ait broiler kümeslerinde yapıldı. Bu entegre tesislere ait 10000 adetlik 5'şer kümesi araştırmada materyalini toplamak için kullanıldı. Kümeslerin 4 adedine immun kompleks aşı ve 1 adedine ise standart entegrasyon aşı programı uygulandı. Araştırmanın 0, 7, 14, 21, 28, 33 ve 42. günlerinde kümes başına 23 kan örneği olmak üzere toplamda 230 ve araştırmanın sonunda ise genel toplamda 1610 adet kan örneği alındı ve serumları ayrılarak ELISA çalışması için -20 derin dondurucuda saklandı.

2.2. Örneklemler

Çıkım gününden başlayarak 0.-7.-14.-21.-28.-33.-42. günlerde kümesteki hayvanlardan 23 adet kan alındı. Serumlar çıkarıldı. Serolojik inceleme yapıncaya kadar -20'de saklandı.

2.3. Aşılar ve Aşılama Programı

2.3.1. İmmun Kompleks Aşı Programı

- 0. gün Transmune IBD (sc) uygulandı
- 0. gün ND Clone 30 (sprey) uygulandı
- 10-12. gün ND Vac La sota (sprey) uygulandı
- 22. gün ND Vac La sota (içme suyu) uygulandı

2.3.2. Standart Entegrasyon Aşı Programı

- 0. gün ND Clone 30 (sprey) uygulandı
- 10-12. gün ND Vac La sota (sprey) uygulandı
- 14. gün IBD 228 E Nobilis (içme suyu) uygulandı
- 22. gün ND Vac La sota (içme suyu) uygulandı

Araştırmada immun kompleks aşı olarak, Transmune IBD Ceva-Phylaxia Budapeşte/Macaristan-0603S4D1F seri nolu, 03/2008 üretim tarihli ve 03/2010 son kullanma tarihli aşı kullanıldı.

2.4. Serolojik Kontrol

Araştırmada serolojik kontrol için Biocheck Firmasının İnfeksiyöz Bursal Hastalığı antikor test kiti (Code:CK113, Lot No: FS4925, Exp. Date:31/05/2010) kullanıldı.

Alınan kan serumları, Biocheck IBD antikor test kitinin test prosedürüne uygun olarak işlendi.

Tavuk serum örnekleri dilüe edilerek mikrolept çukurlarına eklendi. Anti-IBDV antikorları bağlanarak antijen-antikor kompleksleri oluştururlar. Nonspesifik antikorlar ve diğer serum proteinleri yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. Alkalın fosfotaz enzimi ile etiketlendirilmiş anti-chicken IgG eklenerek orijinal tavuk IBDV antikorlarını bağlarlar. Diğer bir yıkama işlemi ile bu işlevi tamamlamış konjugat ortamdan uzaklaştırılır. pNPP (p-Nitrofenil fosfat) formundaki substrat, *kromojen* olarak olarak eklenir. Oluşan sarı renk, serum örneklerindeki anti-IBDV miktarına bağlı olarak yoğunluk gösterir.

Kit içinde;

- IBDV kaplanmış pleytler (inaktive edilmiş viral antijen)
- Konjugat solusyonu (koyun anti-tavuk protein stabilizerleri ile tris buffer içinde Alkalın fosfotaz, inert red dye, koruyucu sodyum azid),
- Substrat tabletleri (pNPP tabletleri substrat buffer ile çözmek üzere)
- Substrat buffer (enzim co-faktörler ile dietanolamin buffer)
- Stop solusyonu (dietanolamin buffer içinde sodyum hidroksit) S
- Serum örneklerinin dilüenti (protein stabilizerleri ile fosfat buffer ve koruyucu sodyum azid)
- Yıkama solüsyonu (Powdered fosfat buffered saline with Tween)
- Negatif kontrol (Protein stabilizerleri ile fosfat bufferda SPF serumu ve koruyucu sodyum azid)
- Pozitif kontrol (Fosfat bufferda spesifik IBDV antikorları ve koruyucu sodyum azid) hazır olarak bulunmaktadır.

Ayrıca kullanılan diğer laboratuvar malzemeleri ise; Hassas pipet ve pipet uçları, 8-12 kanallı pipetler, distile veya deiyonize su, 405 nm filtreli mikrotitre pleyt okuyucusu ve mikrotitre pleyt yıkayıcısıdır.

Testin uygulama prosedürü aşağıdaki şekildedir:

- 1- IBDV kaplı pleytlerin A1 ve B1 çukurlarına 100 µl negatif kontrol serumu konuldu.
- 2- C1 ve D1 çukurlarına 100 µl pozitif kontrol serumu konuldu.
- 3- Serum örnekleri 1/500 oranında dilue edilerek 100'er µl'si diğer çukurlara uygun bir şekilde eklendi ve oda ısısında 30 dakika bekletildi.
- 4- Çukurların içerikleri aspire edilerek 3 kez yıkama solüsyonu (her bir çukur için 300µl) ile yıkandı.
- 5- Pleytler kurutma kâğıtlarına ters çevrilerek fazlalıklar alındı. 100µl konjugat her çukura eklendi ve oda ısısında 30 dakika bekletildi.
- 6- Tekrar her bir çukur 5 kez yıkandı.

- 7- Her çukura 100µl substrat eklenerek 15 dakika oda ısısında bekletildi.
- 8- Reaksiyonu durdurmak için 100µl durdurma solüsyonu ekledi. ELISA okuyucusunda 405nm’de okutularak veriler kaydedildi.

Negatif kontrol 0,3’ün altında okunursa ve negatif kontrol ile pozitif kontrol farkı 0,15’ten büyükse “test sonucu geçerlidir” olarak değerlendirilir.

Numunelerdeki antikorların relatif miktarları pozitif kontrol referans S/P (örneğin pozitif oranı) alınarak ile hesaplandı.

2.5. Sonuçların yorumlanması

BioCheck firmasının standart aşı değerlendirme kriterleri dikkate alınarak sonuçlar yorumlandı. Bu kriterler aşağıda Çizelge 2.5.1.’de belirtilmektedir.

Çizelge 2.5.1. ELISA testi kriterleri

Uygulanan IBD Aşısı	Aşılama Sonrasında Oluşması Beklenen Antikor Titreleleri	IBD Şüphesi Oluşturabilecek Titre Değerleri
İntermadiate Plus Aşı, 228E	6000-1000	> 14000
Transmune IBD	5000-14000	-

2.6. Antikor titresinin hesaplanması

Aşağıdaki formül 1:500 dilüsyondaki bir örneğin S/P değerinin en yüksek titreye oranı ile ilişkilidir (Çizelge 2.6.1.).

$$\text{Log10 Titre} = 1,1 * \text{Log (sp)} + 3,361$$

$$\text{Antilog} = \text{Titre}$$

Çizelge 2.6.1. ELISA testi antikor titresi değerlendirme kriterleri

S/P değeri	Titre Dağılımı	Antikor Durumu
0,149 veya daha düşük	284 veya daha düşük	Negatif
0,150- 0,199	285- 390	Şüpheli
0,200 veya daha büyük	391 veya daha büyük	Pozitif

Tüm bu S/P, titre ve genel sürü profili değerleri kit üreten firmaların yazılım programları ile hesaplanmıştır.

2.7. İstatistiksel Değerlendirme

Firmalar arası ve deneme-kontrol grupları arası istatistiksel farkların belirlenmesi için student t testi, aynı firma içinde farklı günler arasındaki istatistiksel farkların belirlenmesi için tek yönlü varyans analizi yapılmıştır. Varyans analizi sonucu istatistiksel fark bulunan gruplar için farkın hangi grup yada gruplardan kaynaklandığını belirlemek amacıyla Tukey testi yapılmıştır. İstatistiksel analizler SPSS[®] paket programı kullanılarak yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Klinik Gözlem

Araştırmamıza iki firmaya ait 10.000'er başlık kuluçkahanelereden sağlıklı olarak temin edilen 100.000 adet broiler civciv ile başlandı. Günlük olarak sağlık, yem ve su tüketimleri gözlemlendi. Haftalık canlı ağırlık ölçümleri ve FCR hesaplamaları yapıldı. Önemli hiçbir hastalık ve yönetim problemi ile karşılaşılmadı. Ortalama canlı ağırlık kontrol kümesinde 2.209 gr, çalışma kümesinde 2.124 gr, FCR ise kontrol kümesinde 1.764, çalışma kümesinde 1.7581, ölüm oranı ise kontrol kümesinde % 1.36, çalışma kümesinde % 2.87 olarak tespit edilmiştir.

3.2. Serolojik Bulgular

Kümeslerden alınan toplam 1600 adet kan serum örnekleri; ELISA ile IBD antikor titreleri açısından incelendi.

Biocheck firmasının öngördüğü titre değerlerine göre IBD için immun kompleks aşı uygulaması sonucunda 5000-14000 titre değeri bağışıklığın oluştuğunu göstermektedir. CV olarak gösterilen değer, titre değerlerinin sürü içindeki homojenitesini göstermektedir. Hesaplanan CV değeri ne kadar küçükse sürü titre değerleri açısından o kadar homojendir veya değer ne kadar büyükse o kadar heterojendir (Çizelge 3.2.1.).

Çizelge 3.2.1. IBDV antikorlarının firmalara göre ortalama değerleri ve istatistiksel sonuçları

Günler	Firma A				Önemlilik	Firma B				Önemlilik
	Çalışma (n=100)	%V	Kontrol (n=25)	%V		Çalışma (n=100)	%V	Kontrol (n=25)	%V	
0	1572 ^d	43	1572 ^d	43	Ö.D.	1557 ^d	43	1557 ^d	43	Ö.D.
7	705 ^{de}	65	946 ^d	56	**	745 ^{de}	62	880 ^{de}	52	Ö.D.
14	107 ^e	46	108 ^d	68	Ö.D.	117 ^e	56	105 ^e	65	Ö.D.
21	3422 ^c	81	453 ^d	158	***	3585 ^c	71	412 ^e	122	***
28	7845 ^b	32	9143 ^b	27	*	7930 ^b	32	8973 ^b	29	Ö.D.
33	7844 ^b	66	5758 ^c	46	**	7956 ^b	64	5342 ^c	48	***
42	12477 ^a	31	13525 ^a	24	Ö.D.	12688 ^a	33	12535 ^a	21	Ö.D.
Önemlilik	***		***			***		***		

Ö.D. : Önemli Değil

***** : P<0.05

****** : P<0.01

******* : P<0.001

a, b, c, d, e : Aynı satırda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arası fark istatistik olarak önemli (P<0.05)

Firma A'nın çalışma grubu ile Firma B'nin çalışma grubu, Firma A'nın kontrol grubu ile Firma B'nin kontrol grubu günler bazında analiz edilmiş ve gruplar arası fark bulunmamıştır (Çizelge 3.2.1.).

Firma A'nın çalışma ve kontrol grupları arasında 7. (P<0.01), 21. (P<0.001), 28. (P<0.05) ve 33. (P<0.01) günlerde istatistiksel anlamda önem bulunmuştur (Çizelge 3.2.1.).

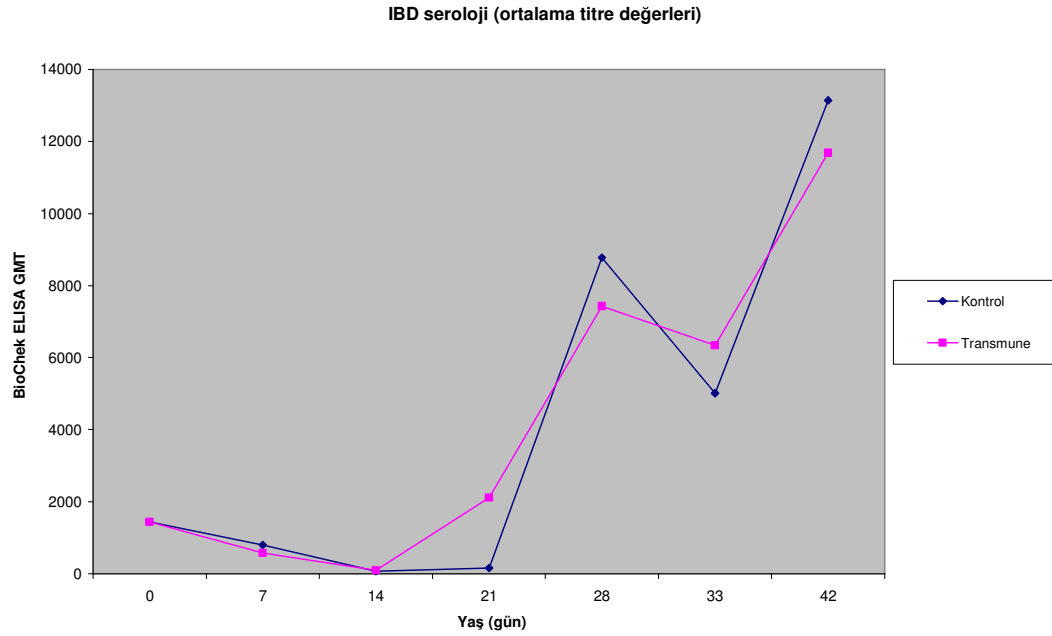
Firma B'nin çalışma ve kontrol grupları arasında 21. ve 33. günlerde istatistiksel anlamda önem bulunmuştur (P<0.001) (Çizelge 3.2.1.).

Firma A'nın ve Firma B'nin çalışma ve kontrol grupları ayrı ayrı günler bazında değerlendirmeye alındığında tüm gruplar arasında istatistiksel anlamda fark bulunmuştur (P<0.001) (Çizelge 3.2.1.).

Firma A'nın ve Firma B'nin çalışma grubunda 0.-7. ve 28.-33. günler arasında istatistiksel fark bulunmayıp, bu gruplarla diğer gruplar arasında ve diğer grupların kendi arasında istatistiksel anlamda fark bulunmuştur (Çizelge 3.2.1.).

Firma A'nın kontrol grubunda 0., 7., 14., 21. günler arasında istatistiksel anlamda fark olmayıp bu günlerin diğer günlerle ve diğer günlerin kendi aralarında istatistiksel anlamda fark bulunmuştur (Çizelge 3.2.1.).

Firma B'nin kontrol grubunda 0., 7., 14., 21. günler arasında istatistiksel anlamda fark olmayıp bu günlerin diğer günlerle ve diğer günlerin kendi aralarında istatistiksel anlamda fark bulunmuştur (Çizelge 3.2.1.).



Resim 3.2.1. Ortalama titre değerleri

Transmune gurubunda kontrol gurubuna göre 1 hafta daha erken antikor yanıt oluştuğu açık olarak görülmektedir. Burada karşılaşılan en ilginç nokta 14. gün yapılan 228E aşılmasının MDA titreleri çok düşmesine rağmen 21. gün saptanabilir antikor titreleri oluşturamamasıdır (Resim 3.2.1.).

4. TARTIşMA

Gumboro olarak da bilinen İnfeksiyöz Bursal hastalık, 3-6 haftalık civcivlerin akut bulaşıcı viral bir infeksiyonudur (Lukert and Saif 1991, Parkhurst 1964). IBD ilk kez Cosgrove (1962) tarafından, böbreklerde yaptığı hasar sebebiyle *avian nephrosis* olarak tanımlanmıştır. 1970 yılında avian nefrozisli bir tavuğun böbreğinden Gray suşu izole edilmiştir (Akan 2002). Başlangıçta bu suşun IBDV infeksiyonunun etkeni olduğu zannedilirken daha sonraki çalışmalarda Gray suşu ile immunize edilen deneme hayvanlarının enfeksiyöz bursal ajan ile enfekte oldukları ve bursa Fabricius'ta değişiklikler olduğu gözlenmiştir. Böylece Gray virusunun böbreklerde nefrotoksik etki yapan *Enfeksiyöz Bronşit Virus* olduğu, Gumboro hastalığını meydana getiren virusun bundan farklı olduğu kabul edilmiştir. Hastalık ilk defa A.B.D.'de Delaware'de Gumboro bölgesinde g r ld ğu için *Gumboro Hastalığı* denmiştir.

İnfeksiyöz Bursal hastalıktan korunmada en çok tercih edilen metot aşılamadır. Özellikle damızlık tavukların aşılanması çok önemli bir yer tutmaktadır. Çünkü aşılanmış damızlıklardan gelen maternal antikorlar civcivleri erken dönemde karşılaşabileceği immunsupresif infeksiyonlardan korumaktadır. Maternal antikorlar genellikle civcivleri 1-3 hafta aralığında korumaktadır. Bunun yanında damızlıklarda bağışıklığı yağlı adjuvan içeren aşılarla desteklemek, civcivlerde oluşacak pasif bağışıklığı 4-5 haftaya kadar uzatabilecektir (Baxendale ve Lutticken 1981, Lucio ve Hitchner 1979). Maternal antikor taşıyan civcivlerdeki aktif bağışıklığın sağlanabilmesinde karşılaşılan en büyük problem aşılama zamanının iyi ayarlanmasıdır. Bundan dolayı civcivlerdeki maternal antikor seviyeleri, aşılama yolları ve aşıda kullanılan virusun virulansı bu durumu etkilemektedir. Damızlık sürüler ve civcivlerinin antikor seviyelerinin ölçülmesi, aşılama zamanının tayininde yardımcı olmaktadır.

Araştırmamızda 0. günde elde edilen antikor titrelerine bakıldığında normalde 3000-13000 arasında olmasına beklenen maternal antikor titrelerinin 1572 titrede olduğu görülmektedir. Bu da damızlık sürülerde yapılan aşı uygulamalarında yeterli antikor miktarının oluşmadığını göstermektedir. Araştırmamızda elde edilen immun kompleks aşılama sonuçlarına göre, antikor titrelerinin özellikle 14. günden sonra istenilen en yüksek seviyeye çıktığı ve stabil bir durum görüldüğü tespit edilmiştir.

Aşılar da kullanılan virusun virulansı ve antijenik farklılıklarına göre, canlı aşılar da birçok seçenek bulunmaktadır. Virulansa göre, aşılar “mild, mild intermediate, intermediate, intermediate plus ve hot” olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Hot, intermediate ve avirulent suşların virus nötralizasyon testine göre antikor titreleri yaklaşık olarak sırasıyla 1:500, 1:250 ve 1:100’den az olarak ölçülmüştür (Lucio ve Hitchner 1979, Skeeles ve ark 1979).

Payla ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2003), immun kompleks IBD aşısını hem in ovo (çıkıştan 3 gün önce) hem de çıkım günü kuluçkahanede subkutan olarak uygulamışlardır. Kontrol grubu aşılanmamış ve tüm gruplara 14., 21., 28., 35. ve 42. günlerde MOM 94 suşu ile çalenç uygulamışlardır. Hem serolojik hem histopatolojik kontrollerle sonuçlar değerlendirilmiştir. Buna göre ilk üç hafta boyunca tüm gruplarda maternal antikorlarda düşüş görüldüğü araştırmacılar tarafından bildirilmektedir. Aşılı sürülerde üçüncü haftadan itibaren antikor seviyesi yükselme görülürken, aşısız sürülerde antikor seviyesinin düşmeye devam ettiği belirtilmektedir. Düşük maternal antikor seviyesine sahip (subkutan aşılı) grubun, yüksek maternal antikor seviyesine sahip (inovo aşılı) sürüden daha erken immun yanıt oluşturduğu tespit edilmiştir. 14. günde uygulanan çalençta inovo grup % 60, subkutan grup % 70 korunurken, kontrol grupları sırasıyla % 40 ve % 0 korunma sağlanmıştır. 21. günde uygulanan çalençta inovo grup % 80 ve subkutan grup % 100 oranlarında korunurken, kontrol grupları sırasıyla % 10 ve % 0 korunmuştur. 28, 35 ve 42.günlerde uygulanan çalençta her iki yöntemle aşılanmış grup da % 100 korunurken, kontrol gruplarının % 0 korunduğu bildirilmektedir. Histolojik bulgularda; bursal lezyonlar hem inovo hem subkutan yolla aşılanmış gruplarda aşı suşu replikasyonunu 14 ve 21. günlerde tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara göre, immun kompleks IBD ile aşılanan broilerler ister in ovo ister subkutan olsun 3.-4. haftalarda aktif immun yanıt oluşturduğu ve çalençten tam olarak korunduğu araştırmacılar tarafından savunulmaktadır. Ayrıca immun kompleks IBD aşısının etkinliğinin,

yüksek seviyelerdeki antikor titrelerinden aktif immun cevap oluşması sırasında etkilenmediği de bildirilmektedir. Hem serolojik hemde bursal patoloji çalışma sonuçları, immun kompleks IBD aşısının subkutan ve inovo uygulama sonrası maternal antikor seviyesi çok düşmeden aşı suşu replikasyonunun başladığını ve immunizasyonun oluştuğunu göstermektedir. Ayrıca aşı yapılmış ancak az da olsa şüpheli grupların varlığı hem maternal antikoru olmayan hem de immun kompleks IBD ile maternal antikor seviyesi büyük oranda azaltılmış civcivler olarak açıklanmıştır. Payla ve arkadaşları (2003) bu araştırma ile kuluçkahanede immun kompleks IBD aşısı ile aşılanan civcivlerin farklı maternal antikorlara sahip olmalarına rağmen, kümeslerdeki IBDV enfeksiyonu problemini elimine edilebileceği sonucuna varmışlardır.

Icochea ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2006) dört çalışma grubu üzerinde çalışılmıştır. A grubu subkutan olarak kuluçkada antijen-antikor kompleks aşısı olan (IBDV-2512 suşu) Transmune IBD ile; B grubu 10 ve 18. günlerde iki kez önce Lukert (mild suş), sonra CE (intermediate suş) ticari aşılarda; C grubu LZD 228 (plus intermediate suş) ticari aşısı ile aşılanmışlar ve D grubu kontrol grubu olarak hiçbir IBD aşısı uygulanmamıştır. Çalenç 35. günde uygulanmış olup, bunun için F52/70 Gumboro suşu kullanılmış. Klinik belirtiler, makroskopik ve mikroskopik lezyonlar, bursal indeks, serolojik yanıt (ELISA testi ile), üretim parametreleri açısından değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizlerden bursal indeks, antikor titreleri ve üretim performansları Anova testi tarafından analiz edilmiştir. Mikroskopik bursal lezyonlar Kruskal-wallis testi tarafından analize tabi tutulmuştur. Bu analizler sonucunda araştırmacıların elde ettikleri sonuçlarda; çalençten sonra hiçbir grup mortalite göstermemiştir, tüm gruplarda depresyon ve diyare görülmüştür, en çok klinik belirti ve lezyon aşılanmamış grupta görülmüştür. Klinik hastalığa karşı en iyi korumayı Transmune IBD aşısı yapılan Grup A'nın gösterdiği bildirilmektedir. Aşılanmış hiçbir grup atrofinin bursal indeks değerlerini göstermemiş durumda olduğu bildirilmektedir. Gruplar arasında bursal indeks açısından istatistiksel bir fark da görülmemiştir. Mikroskopik bursal lezyonlar açısından aşılanmış gruplar arasında istatistiksel fark görülmüş olup; Grup A en yüksek bursal mikroskopik lezyon skoru (3.8) ve en düşük grup B (1.8) elde edildiği bildirilmektedir. Aşılanmış gruplar arasında kesimhane verileri değerlendirildiğinde, vücut ağırlıklarının A grubu 345 g, B grubu 185 g, C grubu 134 g daha ağır geldiği tespit edilmiştir.

Ivan ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışmada, immunkompleks aşısı virusunun İnfeksiyöz Bursal Hastalık (IBD) dokularında dağılımı ve organların virus

yüklenmesi nicel olarak karşılaştırılmıştır. Çalışmada bir günlük Spesifik Patojen Free (SPF) civcivler ve maternal immun broyler civcivlere subkutan olarak Transmune IBD enjekte edilmiştir. Lenfoid ve non-lenfoid organlar çalışma boyunca belirli aralıklarla toplanmışlardır. Reverz transcriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) uygulaması ile en yüksek miktardaki IBD virus, SPF civcivlerde ilk olarak aşılama sonrası 14.günde, broyler grupta ilk olarak Bursa Fabricius'da aşılama sonrası 17. günde görüldüğü ve çalışmanın sonuna kadar aşılama sonrası 43. güne kadar orada kaldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada, infeksiyöz bursal hastalık virusunun hiçbir aşılanmış grupta dalak, timus, sekal tonsiller, karaciğer veya duodenumda görülmediği bildirilmektedir. Aşılanmamış grupların hiçbir örneklemesinde de etken tespit edilmemiştir. Bu araştırmada alınan serumlardan yapılan ELISA sonuçları, aşılama sonrası 28 gün sonra IBDV spesifik antikorları tespit etmiş ve aşılama sonrası 43 gün sonraya kadar da artışını sürdürdüğünü göstermiş bulunmaktadır. Aşılanmamış broyler civciv grubunda maternal antikor seviyesinin 14. günde baz seviyenin altına düştüğünü ve daha sonra da aktif immun yanıtın oluşmadığını araştırmacılar bildirmektedirler.

Pazani ve arkadaşlarının 2007 yılında broyler civcivlerde IBDV-Icx (CEVAC/Transmune IBD) aşısı ile yaptıkları aşı etkinlik çalışmasını 0, 14, 21, 35, 42. günlerde aldığı kan serumlarından ELISA yöntemi ile hem IBD hem de ND açısından değerlendirmişlerdir. Bir grup IBDV-Icx ile kuluçkada subkutan olarak, diğer grup ticari intermediate bir aşı ile içme suyu ile aşılanmıştır. IBDV antikor titrelerinin tüm gruplarda 21-28 günlerden itibaren yükseldiğini ve bu yükselmenin 42. güne kadar sürdüğünü tespit etmişlerdir. Gruplar arasında ND antikor titrelerinde ve vücut ağırlıklarında önemli bir farklılık görülmediği araştırmacılar tarafından bildirilmektedir. Corley ve arkadaşları (2001); antigen capture ELISA (ACCE) kullanarak SPF civcivlerde in ovo aşılama sonrası 6 gün sonra IBDV-Icx virüs proteinlerinin varlığını Bursa Fabricius'ta göstermiş bulunmaktadır. Sharma (1986), embriyolu yumurtalara yapılan aşının doku dağılımı açısından daha etkili ve dokularda virüs seviyesinin daha yüksek olması ile in ovo uygulamanın kuluçkada ilk gün yapılmasından daha etkili olduğunu bulmuştur.

Kumar ve Charan (2001), IBDV farklı antikorlarla kaplanırsa farklı derecelerde virus replikasyonu olacağını göstermişlerdir. Maternal immun broyler civcivlerde 17 .günde ilk olarak tespit edilen ve 43. güne kadar süren antikorlar, SPF'lerle karşılaştırıldığında birkaç

gün geç kaldığı görülmüştür. Bunun sebebinin maternal antikorların inhibisyon etkisi olabileceği araştırmacılar tarafından varsayılmıştır. Aynı yıl yapılan başka bir araştırmada maternal antikorların düşüşü IBDV-Icx'in sebep olduğu bursal yıkım zamanı ile bağlantılı olduğu bulunmuştur (Ivan ve ark 2001). Moody ve arkadaşları (2000) IBDV'nin kandan tamamıyla temizlenmesinin enfeksiyon 4. gününden sonra olduğunu göstermişler. Buna karşılık virus replikasyonunun hedef organ olan Bursa Fabricius'da uzun bir süre kaldığı bazı araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Sharma 2000, Van den Berg 2000).

Araştırmamıza, maternal antikor seviyelerinin beklenenin altında olduğu tespit edilen civcivlerle başlandı. Çalışma gruplarına kuluçkahanede subkutan IBDV Icx (CEVAC/ Transmune IBD) uygulaması yapıldı. Kontrol grubu ise sadece 14. gün içme suyu ile 228 E (intermediate plus) aşı ile aşılandı. 14. gün hem kontrol grubunda hem de çalışma grubunda maternal antikor seviyeleri belirgin bir şekilde düştüğü tespit edildi. Çalışma gruplarında 21. günden itibaren sürekli yükselerek ilerleyen titre kesime kadar bu eğilimini devam ettirdi. Klinik herhangi bir sorunla karşılaşmadı. Ölüm oranı %2.87, ortalama ağırlık 2124gr, yem dönüşüm oranı 1.75 olarak gerçekleşti. Kontrol grubunda 28. günde yükselmeye başlayan titre, 33. gün ölçümlerinde düşük ve 42.gün ölçümlerinde enfeksiyon titresi gösterdi. Enfeksiyon subklinik seyretmiştir. Ölüm oranı % 1.36, ortalama ağırlık 2209gr, yem dönüşüm oranı:1.76 olarak gerçekleşmiştir.

Yapılan bu tez araştırması, IBDV Icx (CEVAC/ Transmune IBD) aşısının, düşük maternal antikor seviyelerinde iyi bir şekilde çalıştığını, yoğun yetiştirme yapılan riskli bir bölgede bile iyi cevap alınabildiğini ve aşının sağladığı korumanın broyler civcivlerin kesimhaneye gidene kadar ki dönemde etkili bir düzeyde olduğunu göstermiştir. Bu tür yoğun yetiştirme ortamlarında enfeksiyon riski çok fazla olduğu için kontrol ve sürü yönetimi de zorlaşmaktadır. Yetiştirme ortamlarının içme suyu aşılamaında, yapılacak hataların enfeksiyon çeşitliliğini de arttırdığını da eklersek, IBD virusundan etkin korumanın IBDV Icx (CEVAC/ Transmune IBD) aşısı ile daha başarılı olunabileceği ve bu aşı uygulamasının bölgesel olarak yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Yağlı adjuvan içeren inaktif aşılar, damızlık sürülerin hastalığa karşı bağışıklığını desteklemek ve süreyi uzatmak için kullanılır. Ancak, pratik değildir ve civcivlerde primer cevabın oluşturulmasında tercih edilmezler. Yağlı adjuvan içeren aşılar, damızlıklarda canlı

virus aşılarıyla sağlanmış bağışıklığın devamı için kullanıldığında daha etkilidirler (Wyeth ve Cullen 1978).

IB hastalığında, maternal bağışıklık, çiftlik yönetimleri ve uygulama farklılıklarından dolayı ülkelerde ulusal bir aşılama programı uygulanmamaktadır. Eğer bir broyler iftliğinde maternal antikor seviyeleri kayıtlarda yüksek olarak tespit ediliyor ve bu seviyelerde önemli değişiklikler görülmüyorsa aşılamaya gerek duyulmamaktadır. Intermediate aşılarda aşılama zamanı, 7 gün ile 2-3 hafta olarak belirlenmiştir. Eğer broyler civcivler 1 günlükken aşılanacaksa, aşı Marek hastalığı aşısının içinde verilmelidir. Yağlı adjuvan içeren aşılar, genellikle 16.-18. haftalarda kullanılır. Kmeslerdeki antikor titrelerindeki ani düşüşlerde damızlıkların tekrar aşılama gerekmektedir. IB hastalığından korunmada, rekombinant aşılar da geliştirilmektedir, ancak henüz pazara ticari bir ürün olarak sunulmamıştır (Bayliss ve ark 1991, Darteil ve ark 1995, Fahey ve ark 1989, Macreadie ve ark 1990).

Araştırmamızda her iki firmaya ait çalışma grubu antikor titrelerine bakıldığında elde edilen ELISA sonuçlarının birbirine paralel olduğu grlmektedir. Bu sonuca göre immun kompleks aşılamalar sonucunda farklı çiftliklerde IBD korunmasında başarılı sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ

Araştırmamızda, ilgili entegre tesislerin farklı kümeslerinde retrospektif olarak yapılan değerlendirmeler sonucunda genellikle 7.-21. günler arası infeksiyon riski olduğu belirlenmiştir. Hayvanların hastalığa en hassas olduğu günler IBDV antikör titrelerine bakıldığında, koruma titrelerinin koruma düzeyi altında seyrettiği görülmektedir. Ancak, bu aşılama programı ile işletmedeki IBDV ve diğer infeksiyonlar (IB, ND) kontrol altına alınmış bulunmaktadır. Dolayısıyla, broiler kuluçkahanelerinde IBDV infeksiyondan korunmak için Transmune IBD aşısının başarı ile kullanılabileceği ve bu hastalığa karşı iyi düzeyde korunma sağlanabileceği sonucuna varılmıştır.

6. ÖZET

Araştırmamızda iki firmaya ait 10000'er başlık 10 adet kuluçkahaneden 0, 7, 14, 21, 28, 33 ve 42. günlerinde kümes başına 23 kan örneği olmak üzere toplamda her örnekleme günü için 230 ve araştırmanın sonunda ise genel toplamda 1610 adet kan örneği alındı ve serumları ayrılarak Biocheck Firmasının İnfeksiyöz Bursal Hastalığı antikor test kiti (Code:CK113, Lot No: FS4925, Exp. Date:31/05/2010) ile analizleri yapıldı.

Kümeslerden alınan kan serum örnekleri; ELISA IBDV antikorlarının 0, 7, 14, 21, 28, 33, 42. günler için firmalara göre ortalama değerleri değerlendirildiğinde; firma A için çalışma grubu ortalaması: 1572, 705, 107, 3542, 7832, 7844, 12477 ve ort. % CV değeri: 43, 65, 46, 81, 32, 66, 31, kontrol grubu: 1572, 946, 108, 453, 9143, 5758, 13525 ve ort. CV değeri: 43, 56, 68, 158, 27, 46, 24 olarak bulunurken; firma B için çalışma grubu ort.: 1557, 745, 117, 3585, 7932, 7976, 12688 ve ort. % CV değeri: 43, 62, 56, 71, 32, 64, 33, kontrol grubu: 1557, 880, 105, 412, 8972, 5342, 12535 ve ort. CV değeri: 43, 52, 65, 122, 29, 48, 21 olarak tespit edilmiştir. Biocheck firmasının öngördüğü titre değerlerine göre IBD için immun kompleks aşı uygulaması sonucunda 5000-14000 titre değeri bağışıklığın oluştuğunu göstermektedir.

Araştırmanın sonunuda Transmune IBD aşı grubunda kontrol gurubuna göre 1 hafta daha erken antikor yanıt oluştuğu açık olarak görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gumboro, Broiler, Transmune IBD aşısı, ELISA

7. SUMMARY

In our study, 23 blood samples were taken from 10 hatcheries containing 10000 chicken, per sampling 230, and at the end of the study, 1610 samples were taken in the days 0, 7, 14, 21, 28, 33, 42. Blood serum were separated and they were analyzed by test kit of Infectious Bursal Disease (Code:CK113, Lot No: FS4925, Exp. Date:31/05/2010) Biocheck Corporation.

Serum samples taken from hatcheries were evaluated by ELISA IBDV antibody in the days 0, 7, 14, 21, 28, 33, 42. and according to the hatchery companies, for company A, study group average ratio is: 1572, 705, 107, 3542, 7832, 7844, 12477 and average CV % value is 43, 65, 46, 81, 32, 66, 31, control group: 1572, 946,108, 453, 9143, 5758,13525, and average CV value: 43, 56, 68, 158, 27, 46, 24. For company B, study group average ratio is: 1557, 745, 117, 3585, 7932, 7976, 12688 and average CV % value is 43, 62, 56, 71, 32, 64, 33, control group: 1557, 880,105, 412, 8972, 5342,12535, and average CV value: 43, 52, 65, 122, 29, 48, 21. According to the titer values identified by Biocheck Corporation, 5000-14000 titer immunization comprised for IBD at the end of immune kompleks vaccine application.

As a result of the study, it is seen that, antibody response develops 1 week earlier in Transmune IBD vaccine group than in control group

Keywords: Gumboro, Broiler, Transmune IBD vaccine, ELISA

8. KAYNAKLAR

Akan M 2002 *İnfeksiyöz bursal hastalık*. In; *İzgür M., Akan M. (Eds) Kanatlı Hayvan Hastalıkları*. Medisan Yayınevi, I. Baskı, Ankara, Türkiye, pp 169-179.

Azad AA, Jagadish MN, Brown MA, Hudson PS 1987 *Deletion mapping and expression in E.coli of the large genomic segment of birnavirus*. Virology, 161: 145-152.

Baxendale W, Lutticken D 1981 *The results of field trials with an inactivated Gumboro vaccine*. Dev Biol Stand 51: 211-219.

Bayliss CD, Peters RW, Cook JK, Reece RL, Heine HG, Chapman A, Ward CW, Fahey KJ 1991 *Physicochemical and immunological characterization of the recombinant host-protective antigen (VP2) of infectious bursal disease virus*. Vaccine, 9: 715-722.

Bayliss CD, Spies U, Shaw K, Peters RW, Papageorgiou A, Müller H, Bournell MEG 1990 *A comparison of sequens of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2*. J.Gen.Virol., 71: 1303-1312.

Becht H, Müller H, Müller H 1988 *Antigenic Structure of the two serotypes of infectious bursal disease virus*. J.Gen.Virol., 69: 631-640.

Beug H, Müller H, Grieser S, Doederlin G, Graf T 1981 *Heamopoetik cells transformed in vitro by REVt avian reticuloendotheliasis virus Express characteristics of very immature lymphoid cells*. Virology, 115: 295-309.

Boot HJ, terHuurne AA, Hoekman AJ, Peeters BP, Gielkens AL 2000 *Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of very virulent phenotype*. J. Virol., 74: 6701-6711.

Brandt M, Yao K, Liu M, Heckert RA, Vakharia VN 2001 *Molecular determinants of virulence, cell tropism and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus*. J. Virol., 75: 11974-11982.

Cao YC, Yeung WS, Law M, Bi YZ, Leung FC, Lim BL 1998 *Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent and variant strains*. Avian Dis., 42: 340-351.

Chen HY, Zhou Q, Zhang MF, Giambrone JJ 1998. *Sequence analysis of the VP2 hypervariable region of nine infectious bursal disease virus isolates from mainland China*. Avian Dis., 42: 762-769.

Chettle N, Stuart JC, Wyeth PS 1989 *Outbreak of virulent infectious bursal disease in east Angila*. Vet. Rec., 125: 271–272.

Confer AW, Spring W, Shane SM, Donovan JF 1981 *Sequential mitogen stimulation of peripheral blood lymphocytes from chickens inoculated with infectious bursal disease virus*. Am. J. Vet. Res., 452: 2109-2113.

Corley MM, Giambrone JJ, Dormitorio TV 2001 *Detection of infectious bursal disease vaccine virus in lymphoid tissues after in ovo vaccination of specific-pathogen-free embryos*. Avian Dis.;45:897-905.

Cosgrove AS 1962 *An apparently new disease of chickens; avian nephrosis*. Avian Dis., 6: 385-389.

Darteil R, Bublot M, Laplace E, Bouquet JF, Audonnet JC, Riviere M 1995 *Herpesvirus of turkey viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against IBDV virulent challenge in chickens*. Virology; 211:481-490.

Dobos P, Hill BJ, Hallet R, Kells DT, Becht H, Teninges D 1979 *Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes*. J Virol. 32: 593-605.

Dohms JE, Jaeger JS 1998 *The effect of infectious bursal disease virus infection on local and systemic antibody responses following infection of 3-week old broiler chickens*. Avian Dis., 32: 632-640.

Ergün A 1989 *Tavukların Bazı viral hastalıklarının Epizootiyolojik taramasında Kullanılmak üzere Antijen Ve Antiserum Hazırlanması*. Etlik Vet. Mik. Derg., 6: 35-54.

Fahey KJ, Erny K, Crooks JA 1989 *Conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens*. J Gen Virol., 70:1473-1481.

Giambrone JJ, Dawe DL, Eidson CS 1977 *Specific suppression of the bursa-dependent immune system of chickens with infectious bursal disease virus*. Am. J. Vet. Res., 38: 581-583.

Hein HG, Boyle DB 1993 *Infectious bursal disease virus structural protein VP2 expressed by a fowlpox virus recombinant confers protection against diseases in chickens*. Arch Virol;131:277-292.

Hudson PJ, McKern NM, Power BE, Azad AA 1986 *Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus*. Nucleic Acid Research,14:5001-5012.

Icochea E; Alba M, Reyna P; Gonzalez R; Vidal K; Peredes W; Castro-Pozo X, Cruz P 2006 *Efficacy of vaccination against Infectious Bursal Disease in Broilers using an immune complex vaccine at one day old*. 143rd AVMA Annual Convention July 15-19, Honolulu, Hawaii.

Ivan J, Nagy N, Magyar A, Kacskovics I, Meszaras J 2001 *Functional Restoration of the bursa of Fabricius following in ovo infectious bursal disease vaccination.* Vet Immunopathol.;79:235-248

Ivan J, Velhner M, Ursu K, German P, Mato T, Dren CN, Meszaros J 2005 *Delayed vaccine virus replication in chickens vaccinated subcutaneously with an immunocomplex infectious bursal disease vaccine: Quantification of vaccine virus by real-time polymerase chain reaction.* Can J Vet Res. April;69(2):135-142.

Islam MR, Zierenberg K, Müller H 2001 *The genom segment B encoding the RNA dependent RNA polymerase protein VP1 of very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) is phylogenetically distinct from that of all other IBDV strains.* Arch. Virol., 146: 2481-2492.

Ivanyi J, Morris R 1976 *Immunodeficiency in the chicken. Part IV: An immunological study of infectious bursal disease.* Clin. Exp. Immun., 23:154-165.

Jackwood DJ, Jackwood RJ 1994 *Infectious bursal disease viruses: molecular differentiation of antigenic subtypes among serotype 1 viruses.* Avian Dis. 38: 531-537.

Jackwood DJ, Saif YM 1987 *Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses.* Avian Dis. 31: 766-770.

Jackwood DJ, Sommer SE 1999 *Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States.* Avian. Dis., 43: 310-314.

Jungmann A, Nieper H, Müller H 2001 *Apoptosis is induced by infectious bursal disease virus replication in productively infected cells as well as in antigen-negative cells in their vicinity.* J. Gen. Virol., 142: 1227-1236.

Kandil M 1978. *Hastalıklı piliçlerin Bursa Fabriciuslarında Enfeksiyöz Bursitis Virusunun İzolasyonu ve Bazı Özellikleri Üzerine Araştırmalar. Doçentlik Tezi, Fırat Üniv. Vet. Fak.*

Kaufer I, Weiss E 1980 *Significance of bursa of Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens.* Infect. Immun., 27: 364-367.

Kibenge FSB, Dhama V 1997 *Evidence that virion-associated VP1 of avibirnavirus contains viral RNA sequences.* Archives of Virology, 142: 1227-1236.

Kibenge FSB, Dhillon A.S, Russel RG 1988 *Biochemistry and immunogenicity of infectious bursal disease virus.* J.Gen.Virol., 69:1757-1775.

Kim IJ, Gagic M, Sharma JM 1999 *Recovery of antibody producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus.* Avian Dis., 43: 401- 413.

Kim I.J, You SK, Kim H, Yeh HY, Sharma JM 2000 *Characteristics of bursal T lymphocytes induced by infectious bursal disease virus.* J. Virol., 74: 8884-8892.

Kumar R, Charan S 2001 *Virus enhancement following infection With antibody-coated infectious bursal disease virus (IBDV) in chickens*. Ind J Exp Biol.;39:1314-1317

Lange H, Müller H, Kaufer I, Becht H 1987 *Pathogenic and structural properties of wild type infectious bursal disease virus (IBDV) and virus grown in vitro*. Arch.Virol., 97:187-196.

Lasher HN, Shane SM 1994 *Infectious bursal disease*. World's Poult Sci J; 50:133-166.

Leong JC, Brown D, Dobos P, Kibenge F, Ludert JE, Müller H, Mundt E, Nicholson B 2000 *Birnaviridae*. In: *M.H.V. Regenmortel, C.M.Fouquet, D.H.L. Bishop, E.B.Carstens, M.K.Estes, S.M.Lemon, J.Manilof, M.A.Mayo, D.J.McGeoch, C.R.Pringle, R.B.Wickner (Eds.). Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses*, Academic Press, pp.481-490.

Lim BL, Cao Y, Yu T, Mo CW 1999 *Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2*. J.Virol., 73: 2854-2862.

Lombardo E, Marever A, Cansten JR, Riviera J, Fernandez-Arizoz A, Serrano A, Carracosa JL, Rodriguez JF 1999 *VP1 the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, form complexes with the capsid protein VP3. Leading to efficient encapsidation into virus-like particles*. Journal of virology, 73: 6973-6983.

Lucio B, Hitchner SB 1979 *Infectious bursal disease emulsified vaccine: Effect upon neutralizing-antibody levels in the dam and subsequent protection of the progeny*. Avian Dis., 23: 466-478.

Lukert PD, Saif YM 1997 *Infectious bursal disease virus*. In: *Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM, editors. Diseases of poultry*. Ames: Iowa State University Press, pp. 721- 738.

Lukert PD Saif YM 1991 *Infectious bursal disease. Diseases of Poultry B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, W. M. Reid and H. W. Yoder (Ed.). 9th Edition*. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA.

Macreadie IG, Vaughan PR, Chapman AJ, McKern NM, Jagadish MN, Heine HG, Ward CW, Fahey KJ, Azad AA 1990 *Passive protection against infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast*. Vaccine 8:549—552.

McNulty MS, Allan GM, McFerran JB 1979 *Isolation of infectious bursal disease virus from turkeys*. Avian Pathol; 8: 205- 212.

Moody A, Seller S, Bumstead N 2000 *Measuring infectious bursal disease virus RNA in blood by multiplex real-time quantitative RT-PCR*. J Virol Meth.;85:55-64

Mundt E, Beyer J, Müller H 1995 *Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells*. Journal of General Virology, 76: 437-443.

Mundt E, Kollner B, Kretzschmar D 1997 *VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture*, Journal of Virology, 71: 5647-5651.

Murphy FA, Fauquer CM, Bishop DHL, Ghabriel SA, Jarvis AW, Martelli GP Mayo MA, Summers MD 1995 *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Six report of international committee on taxonomy of viruses.* Arch.Viral.,10: 240-244.

Müller H, Nitschke R 1987 *The two segments of infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90000-Da protein.* Virology, 159: 174-177.

Nieper H, Teifke JP, Jungman A, Löhr C, Müller H 1999 *Infected and apoptotic cells in the IBDV-infected bursa of Fabricius by double-labelling techniques.* Avian Pathol., 28: 279-285.

Ogawa M, Yamaguchi T, Setiyono A, Ho T, Matsuda H, Furusawa S, Fukishi H, Hirai K 1998 *Some characteristics of a cellular receptor for virulent infectious bursal disease virus by using flow cytometry.* Arch. Virol., 143: 2327-2341.

Oppling V, Müller H, Becht H 1991a *Heterogeneity of the antigenic site responsible for the induction of neutralizing antibodies in infectious bursal disease virus.* Arch.Virol., 119: 211-223.

Oppling V, Müller H, Becht H 1991b *The structural polypeptide VP3 of infectious bursal disease virus carries group and serotype specific epitopes.* J. Gen. Virol., 72: 2275-2278.

Panigrahy B, Mishra LK, Adams LG 1982 *Humoral and cell mediated immune response in chickens infectious bursal disease.* Vet. Microbiol., 7: 383-387.

Parkhurst RT 1964 *Pattern of mortality in avian nephrosis.* Poult. Sci., 43: 788-789.

Payla V, Forgach K, Süveges T, Kelemen M, Mezaros J, Benyada J 2003 *Control of Infectious Bursal Disease by an immune complex vaccine, XIII. WVPA congress, July 19-23, 2003, Denver, Colorado.*

Pazani J, Hassanzadeh M, Gandomi H, Farrokhzad F, Niknafs F 2007 *Efficacy of CEVAC/ Transmune IBD vaccine when delivered subcutaneously to day old commercial broiler chickens, 15th WVPA congress September 10-15, Beijing, China.*

Pitcovski J, Goldberg D, Levi BZ, DiCastro D, Azriel A, Krispel S, Maray T, Shaaltiel Y 1998 *Coding region of segment A sequence of a very virulent isolate of IBDV-comparisons with isolates from different countries and virulence.* Avian Dis., 42: 497-506.

Raue R, Islam MR, Islam MN, Islam KM, Badhy SC, Das PM, Müller H 2004 *Reversion of molecular engineered, partially attenuated very virulent infectious bursal disease virus during infection of commercial chickens.* Avian Pathol., in press.

Rautenschlein S, Yeh HY, Njenga MK, Sharma JM 2002a *Role of intrabursal T cells in infectious bursal disease virus (IBDV) infection: T cells promote viral clearance but delay follicular recovery.* Arch. Virol., 147: 285-304.

Rautenschlein S, Yeh HY, Sharma JM 2002b *The role of T cells in protection by an inactivated infectious bursal disease virus vaccine.* Vet. Immunol. Immunopathol., 89: 159-167.

Repp H, Nieper H, Draheim HJ, Koschinski A, Müller H, Dreyer F 1998 *Infectious bursal disease virus infection changes the potassium current properties of chicken embryofibroblasts*. Virology, 246: 362-369.

Rodenberger JK, Sharma JM, Balzer S, Nordgren R, Naqi S 1994 *Flow cytometric analysis of B-cell and T-cell subpopulations in specific pathogen-free chickens infected with infectious bursal disease virus*. Avian Dis., 38:16-21.

Sapats SI, Ignatovic J 2000 *Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia*. Arch. Virol. 145: 773-785.

Schnitzler D, Bernstein B, Müller H, Becht H 1993 *The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus*. Journal of General Virology, 74: 1563-1571.

Sharma JM 1986 *Embryo vaccination of specific-pathogen-free chickens With infectious bursal disease virus: tissue distribution of vaccine virus and protection of hatched chickens against disease*. Avian Dis.;30:776-780.

Sharma JM, Dohms JE, Metz AL 1989 *Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and their effect on humoral and cellular immune competence of specific pathogen-free chickens*. Avian Dis., 33:112-124.

Sharma JM, Kim IJ, Rautenschlein S, Yeh HY 2000 *Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression*. Dev. Comp. Immunol., 24: 223-235.

Skeels JK, Lukert PD, Fletcher OJ, Leonard JD 1979 *Immunization studies with a cell-culture-adapted infectious bursal disease virus*. Avian Dis., 23: 456-465.

Snyder DB, Lana DP, Cho BR, Marquardt WW 1988 *Group and strain specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies*. Avian. Dis., 32: 527-534.

Tanimura N, Sharma JM 1997 *Appearance of T cells in the bursa of Fabricius and cecal tonsils during the acute phase of infectious bursal disease virus infection in chickens*. Avian Dis., 41: 638-645.

Van den Berg TP 2000 *Acute infectious bursal disease in poultry a review*. Avian Pathol., 29: 175-194.

Van den Berg TP, Gonze M, Morales D, Meulemans G 1996 *Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of highly virulent strain*. Avian Pathology, 25: 751-768.

Van den Berg TP, Eterradossi N, Toquin D, Meulemans G 2000 *Infectious bursal disease virus (Gumboro disease)*. Rev Sci Tech Off Int Epiz.;19:527-543.

Van Loon AA, de Haas N, Zeyda I, Mundt E 2002 *Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens*. J. Gen. Virol. 83: 121-129.

Viswas KN, Muniyappa L, Suryanarayana VV, Byregowda SM 2002 *Nucleotide sequence analysis of variable region of VP2 gene of two infectious bursal disease virus isolates from commercial poultry farms*. Acta Virol., 46: 95-101.

Whitfill CE, Haddad EE, Ricks CA, Skeeles JK, Newbery LA, Beasley JN, Andrews PD, Thoma JA, Wakenell PS 1995 *Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV*. Avian Dis., 39: 687-699.

Wyeth PJ, Cullen GA 1978 *Transmission of immunity from inactivated infectious bursal disease oil-emulsion vaccinated parent chickens to their chicks*. Vet. Rec., 102:362-363.

Yamaguchi T, Ogawa M, Inoshima Y, Miyoshi M, Fukushi H, Hirai K 1996 *Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus*. Virology, 223: 219-223.

Yeh HY, Rautenschlein S, Sharma JM 2002 *Protective immunity against infectious bursal disease virus in chickens in the absence of virus-specific antibodies*. Immunol. Immunopathol., 89: 149-158.

Zhang MF, Huang GM, Qiao S 2002 *Early stages of infectious bursal disease virus in chickens detected by reverse transcription-polymerase chain reaction*. Avian Pathol., 31: 593-597.

Zierenberg K, Raue R, Müller H 2001 *Rapid identification of 'very virulent' strains of infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis*. Avian Pathol., 30: 55-62.

Zierenberg K, Raue R, Nieper H, Islam MR, Etteradossi N, Toquin D, Müller H 2003 *Generation of serotype 1/serotype 2 reassortant viruses of the infectious bursal disease virus and their investigation in vitro and in vivo*, submitted for publication.

ÖZGEÇMİŞ

1974 Gaziantep doğumluyum. 1997 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesinden mezun oldum. 1997-2000 yılları arasında kanatlı sektörünün önde gelen bir entegrasyon firmasında teknik yönetici kadrosunda çalıştım. 2001 yılında kanatlı sektörüne ELİZA test sistemleri pazarlayan bir firmada teknik eleman olarak görev yaptım. 2002 yılından itibaren eşimle beraber kanatlı sektörüne hizmet veren bir firma kurduk ve halen bu işi sürdürmekteyiz. Yabancı dil olarak İngilizce bilmekteyim. Evli ve bir çocuk annesiyim.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca ilgi ve yardımlarını gördüğüm danışmanım Prof. Dr. Osman KAYA'ya, tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Şükrü KIRKAN'a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve Araştırma görevlilerine Ayrıca doktora tezi çalışmalarımda destek veren aileme teşekkürlerimi iletirim.