

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**KANATLILARDA INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS
(ILT) HASTALIĞI ETKENİNİN PCR VE ELISA İLE
SAPTANMASI**

DEMİR ÖZDEMİR

**DANIŞMAN
PROF. DR. N. YAKUT ÖZGÜR**

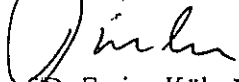
**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI /
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2007

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

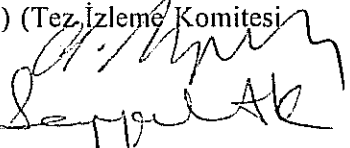
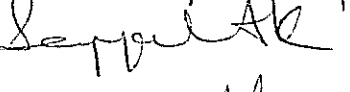
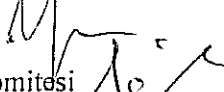


21/08/2007


Prof. Dr. Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Mikrobiyoloji AbD.
Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
Anabilim Dalı : Mikrobiyoloji AbD.
Tez Sahibi : Veteriner Hekim Demir ÖZDEMİR
Tez Başlığı : Kanatlılarda Infectious Laryngotracheitis(ILT)Hastalığı etkeninin PCR ve ELISA ile saptanması
Sınav Yeri : İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AbD.
Sınav Tarihi : 06 / 08 / 2007

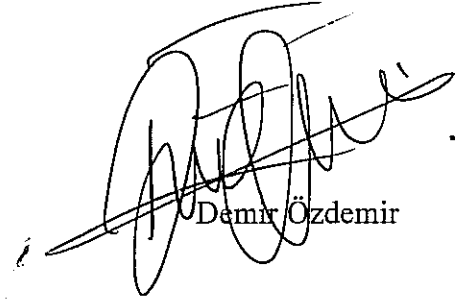
Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Atilla ILGAZ (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AbD.) (Tez İzleme Komitesi Üyesi) 
2. Prof. Dr. Seyyal AK (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AbD.) 
3. Prof. Dr. N. Yakut ÖZGÜR (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AbD.) (Danışman) 
4. Prof. Dr. Aydın GÜREL (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Patoloji AbD.) (Tez İzleme Komitesi Üyesi) 
5. Prof. Dr. Mihriban ÜLGEN (Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AbD.) 

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Demir Özdemir

İTHAF

Babam, Annem ve Ablama,
Bilim ve İlim'e hizmet eden tüm insanlara
ve
Sevgili Eşime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince destek ve yardımlarını esirgemeyen başta Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Atilla ILGAZ' a,

Doktora eğitimimin başlangıcından itibaren değerli bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren, destekleyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. N. Yakut ÖZGÜR'e,

Bilgi birikimleri, destekleri ve yardımlarıyla araştırmama katkıda bulunan Anabilim Dalımız öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Seyyal AK'a,

Tez yazımı sırasında verdiği destek ve yardımları nedeniyle Sayın Araş. Gör. Dr. Funda BAĞCIGİL'e,

Çalışmamın her aşamasında bana özveriyle yardımcı olan Anabilim Dalımız öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Serkan İKİZ'e, asistan arkadaşlarım Sayın Beren BAŞARAN, Sayın Belgi DİREN SİĞİRCİ, Sayın Dr. Kemal METİNER' e, Sayın MsC Sedat ÇAYUKLİ' ye, Sayın Biolog Nazan ATAÖĞLU ve teknisyenimiz Sayın Gülten KARAKUZ' a,

Doktora çalışmasına başladığım ilk günden beri destekleri ve kendisiyle birlikte keyifle çalıştığımız için Doktora ikizim Sayın Dr. Sonay SAĞNAK'a,

Çalışmamda kullanmak üzere A96 suşunu ve bilgi birikimini sunan Doç. Dr. Hakan BULUT'a,

Doktora tezim süresince çalışmalarına devam edebilmem için bana göstermiş oldukları iyi niyet ve destekten ötürü Müdürüm Ayşe Fügen ARDA ve tüm mesai arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan kardeşlerim ve arkadaşlarıma,

Tüm destekleri ile her zaman yanımda olan sevgili eşim ve aileme içtenlikle teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklemiştir. Proje No: T-542/21102004

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1. GEREÇ	14
3.1.1. Örnekler	14
3.1.1.1. Trakeal svap örnekleri:.....	15
3.1.1.2. Kan serumu örnekleri:.....	15
3.1.2. PCR	15
3.1.2.1. Ekstraksiyon Kitleri	15
3.1.2.2. Amplifikasyonda kullanılan gereçler	16
3.1.2.3. TBE buffer	18
3.1.2.4. Agaroz jel	18
3.1.2.5. Yükleme solusyonu.....	19
3.1.2.6. DNA Marker	19
3.1.2.7. Ethidium Bromide.....	19
3.1.3. ELISA	20
3.1.3.1. ELISA Kiti	20
3.1.3.2. Eksternal Referans Kontrol RF06 (Biocheck):	20
3.1.3.3. ELISA Okuyucusu	20
3.2. YÖNTEM	21

3.2.1. PCR	21
3.2.1.1. Trakeal svaplardan DNA ekstraksiyonu ve Amplifikasyonu.....	21
3.2.1.2. Jelden ILTV spesifik DNA'nın Ekstraksiyonu ve Amplifikasyonu	22
3.2.1.3. Elektroforetik seperasyon ve DNA' nın saptanması	22
3.2.1.4. Sonuçların Yorumlanması.....	23
3.2.2. ELISA	23
3.2.2.1. Sonuçların değerlendirilmesi	23
3.2.2.2. Testin Geçerliliğinin Belirlenmesi	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. PCR Bulguları	24
4.2. ELISA Bulguları	26
5. TARTIŞMA	29
KAYNAKLAR	34
HAM VERİLER	41
FORMLAR	42
ETİK KURUL KARARI	43
PATENT HAKKI İZİNİ	44
TELİF HAKKI İZİNİ.....	45
ÖZGEÇMİŞ	46

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1: Örneklerin alındığı yöreler ve örnek sayıları ile, örnek alınan tavukların yaş, tür ve klinik bilgileri	14
Tablo 4.1: Trakea örneklerinin alındığı tavuklara ait PCR bulguları	24
Tablo 4.2: Kan serumu örnekleri alınan tavuklara ait ELISA bulguları.....	26
Tablo 4.3: Tavuklara ait PCR ve ELISA sonuçları	28

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 4-1: Trakeal svap örneklerinden ekstraksiyonu takiben yapılan PCR'ın elektroforetik separasyonu..... 25
- Şekil 4-2: Jelden ekstraksiyonu takiben yapılan PCR'ın elektroforetik seperasyonu 25

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Infectious Laryngotracheitis	ILT
Infectious Laryngotracheitis Virus	ILTV
Enzim Linked Immuno Sorbent Assay	ELISA
Polimerase Chain Reaction	PCR
Agar Gel Presipitation	AGP
Immuno Flouresans	IF
Fluoresans Antikor	FA
İndirekt Fluoresans Antikor	IFA
Virus Nötralizasyon	VN
Kilobaz	kb
Base-pare	bp

ÖZET

Özdemir, D. (2007). Kanatlılarda Infectious Laryngotracheitis (ILT) Hastalığı etkeninin PCR ve ELISA ile saptanması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu araştırmada, Infectious Laryngotracheitis (ILT)' in varlığı PCR ve ELISA ile araştırıldı.

Infectious Laryngotracheitis Virus (ILTV) DNA'sını saptamak amacıyla, çeşitli ticari tavuk işletmelerinden 44' ü 1-40 günlük broyler ve 52' si 10-106 haftalık yumurtacı olmak üzere toplam 96 tavuktan alınan trakeal svap örnekleri PCR ile incelendi. 96 örneğin 14 (%14.58)' ünde 588 bp' lik spesifik bantlar gözlemlendi. ILTV DNA' sını saptanan 14 örneğin 11' inin 10-106 haftalık yaşlar arasındaki yumurtacı sürülerden, diğer 3 örneğin 20 günlük broyler sürülerinden alınan tavuklara ait olduğu belirlendi.

ILTV' ye spesifik antikorların saptanması amacıyla aynı tavuklardan alınan kan serumu örnekleri ELISA ile incelendi. 96 tavuk serumunun 40 (% 41,67)' i pozitif olarak saptandı. Sero-pozitif 40 tavuk serumundan 22' sinin 10-106 haftalık yaşlar arasındaki yumurtacı tavuklara, 18' inin 20-40 günlük broyler tavuklara ait olduğu belirlendi.

İncelenen 11 sürünün 10' unda ILTV saptanmıştır.

ILTV DNA' sını saptanan 14 tavuktan 6'sını ELISA ile sero-pozitif bulundu.

Elde edilen sonuçlar, ILT' nin incelenen yörelerde belli bir oranda bulunduğunu ortaya çıkarmıştır.

Anahtar kelimeler: Infectious Laryngotracheitis virus (ILTV), ILT, PCR, ELISA.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-542/21102004

ABSTRACT

Özdemir, D. (2007). The detection of Infectious Laryngotracheitis (ILT) Disease agent from Chickens with PCR and ELISA. İstanbul University Institute of Health Science, Microbiology Department. Doctorate Thesis. İstanbul.

In this study, the presence of Infectious Laryngotracheitis Virus (ILTV) was searched with PCR and ELISA.

For detecting the Infectious Laryngotracheitis (ILTV) DNA, the 96 tracheal swabs were examined with PCR that are collected from commercial poultry operations. The distribution of the samples; 44 samples from 1-40 days old broilers, 52 samples from 10-106 week old layers. The specific bands of 588 bp were detected in 14 (14.58%) samples. 11 of the ILTV DNA detected samples were collected from 10-106 weeks old layers and 3 of the ILTV DNA detected samples were collected from 20 days of broilers.

The blood samples from the same birds were tested with ELISA for the detection of ILTV specific antibodies. 40 (41,67 %) samples were detected positive. 22 of the seropositive samples were collected from 10-106 weeks old layers and 18 of the seropositive samples were collected from 20-40 days old broilers.

ILTV was detected in 10 of 11 flocks of investigation.

6 of 14 ILTV DNA detected samples were also positive with ELISA.

The results revealed the presence of ILTV in certain ratios within the investigated regions.

Key Words: Infectious Laryngotracheitis virus (ILTV), ILT, PCR, ELISA.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. T-542/21102004

1. GİRİŞ VE AMAÇ

DNA virus yapısına sahip Infectious laryngotracheitis virusu (ILTV), Herpesviridae ailesi içinde *Alphaherpesvirinae* alt ailesine dahil olup Gallid herpesvirus I olarak adlandırılmıştır (2). ILTV; Infectious bronchitis virus (IBV), avian influenza virus (AIV), Newcastle hastalığı virusu (NDV), *Mycoplasma gallisepticum* (MG) ve *M. synoviae* (MS)' nin da dahil olduğu önemli 6 kanatlı solunum yolu hastalığı etkenlerinden biri olup, öncelikle tavuklarda hastalık oluşturmakta ise de güvercin, sülün, keklik ve tavus kuşlarını da etkilemektedir.

Infectious Laryngotracheitis (ILT), tavuklarda yumurta veriminde azalma ya/ya da mortaliteye bağlı olarak üretim kaybı ile sonuçlanan viral bir solunum yolu enfeksiyonudur. Enfeksiyonun şiddetli epizootik formları solunum güçlüğü, kanlı mukus atılımı ve yüksek mortalite ile seyretmektedir. Gelişmiş kanatlı işletmelerinde enfeksiyonun hafif enzootik formu ile sıklıkla karşılaşılmakta olup; mukoid trakeit, sinüzit, konjunktivit, genel verimsizlik ve düşük mortalite şeklinde kendini göstermektedir.

ILT' nin varlığı ülkemizde 1930 ve 1980'li yıllar arasında çeşitli araştırmacılar tarafından genellikle serolojik ve histopatolojik olarak araştırılmış olmasına karşın, ülkemizdeki ticari işletmelerde hastalığın durumuyla ilgili sağlıklı veriler bulunmamaktadır.

Bu araştırmada, değişik yörelerde ticari işletmelerde yetiştirilen broyler ve yumurtacı tavuklardan alınan trakeal svap örneklerinden spesifik ILTV DNA' sının varlığı PCR ile, aynı tavuklardan alınan kan serumu örneklerinden spesifik ILTV antikorlarının varlığı ELISA ile incelenerek, hastalığın durumu hakkında bilgi elde edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

İnfeksiyonun şiddetli epidemik formları solunum depresyonu, solunum güçlüğü, kanlı mukus atılımı ve yüksek mortalite ile seyretmektedir. İnfeksiyonun hafif enzootik formları ile gelişmiş kanatlı endüstrilerinde artan şekilde karşı karşıya gelinmekte olup mukoid trakeit, sinüzit, konjunktivit, genel verimsizlik ve düşük mortalite şeklinde kendini göstermektedir (1, 6, 7, 9, 13, 14, 21).

Hastalık ilk kez 1924 yılında tanımlandıktan sonra “laryngotracheitis”, “infectious laryngotracheitis” ve “avian diphtera” olarak adlandırılmıştır. Laryngotracheitis tanımı 1930’ lara kadar kullanılmış, 1931’ de Amerika Veteriner Hekim Birliği Kanatlı Hastalıkları Özel Komitesi hastalığın adını “Infectious Laryngotracheitis” olarak benimsemiştir (7, 36).

ILT’ nin etkeni ilk kez 1930 yılında Beaudette tarafından filtrelenebilir virus olarak gösterilmiştir (7). Inque ve Nishibe 1973’ de ILT virus (ILTV) ve insanlarda görülen subakut miyelooptikonöropati (SMON) arasında serolojik bir ilişki olduğunu göstermiştir. Kono 1975’ de bu teoriyi çürütmüş ve SMON’ un nedeninin diaquinol toksisitesi olduğunu belirtmiştir. Bu zamandan sonra başka hiç bir laboratuvarın Inque ve Nishibe’ nin çalışmalarını doğrulamaması ve Japonya’ da diaquinol yasağından sonra hastalığın şekillenmemesi nedeniyle SMON ve ILTV arasında bir ilişki olmadığı ortaya çıkmıştır (31).

ILT ABD, Avrupa, Çin, Güneydoğu Asya ve Avustralya gibi pek çok ülkede saptanmış olup, halen özellikle şüpheli kanatlı topluluklarının yoğun olarak bulunduğu bölgelerde önemli bir hastalık olmaya devam etmektedir (2, 5, 6, 7, 13, 14, 15, 44, 68). Hastalık yumurtacı sürülerde modifiye canlı aşı kullanılarak kontrol altına alınmaya çalışılmaktadır. Broyler sürülerde hayvanların yaşam sürelerinin kısa olması nedeniyle, yüksek karantina önlemleri kullanıldığı takdirde profilaktik aşı kullanımını gereksinimi düşürülebilmektedir. Gelişmiş ülkelerde dahi ILTV bahçe, kümes ve kafes tavuk sürülerinde endemik olarak varlığını devam ettirmektedir (6, 7, 9, 23, 33). Türkiye’ de 1933-1988 yılları arasında çeşitli araştırmacılar tarafından ILT’ nin varlığı serolojik olarak % 1 düzeyinin altında bir oranda bildirilmiş olup, hastalığın sorun yaratacak bir düzeyde olmadığı belirtilmiştir (3, 17, 18). Eröksüz ve ark. (18), 1994 yılında bir dövüş horozunda histolojik ve serolojik olarak bir ILT olgusu tanımlamışlardır. Gülçatı ve ark.

(27), Elazığ yöresinde bir bahçe tavuğu sürüsündeki 9 tavuğun trakeasından PCR ile ILTV DNA' sını izole etmişlerdir. Ülkemizde sahadan ILTV' nin izolasyonuna ya da moleküler tekniklerle ortaya konulmasına yönelik geniş çaplı bir araştırma yapılmamıştır.

ILTV, Herpesviridae familyasının bir üyesi olarak sınıflandırılmış olup Alphaherpesvirinae alt familyasına dahildir. Taksonomide Gallid herpesvirus 1 olarak tanımlanmaktadır (7, 21, 22, 28, 36, 57).

Elektron mikroskopide infekte tavuk embriyo hücre kültürlerinde morfolojik olarak herpes simpleks virusa benzerlik gösteren ikosahedral viral parçacıkları saptanmıştır (7, 36, 55, 65, 71). Watrach ve ark. (1963), altıgen yapıda ve 80-100 nm çapında ikosahedral simetriye sahip ve uzamış 162 boş kapsomerin oluşturduğu ILTV nükleokapsidini tanımlamışlardır (6). Virusun tamamı 195-250 nm çapında olup çekirdek zarını saran düzensiz zarf yapısını da kapsamaktadır. Zarf, yüzeydeki önemli antijenik viral glikoproteinleri kapsar. Elektron mikroskop altında çekirdeksiz boş ya da zarfsız parçacıklar görülebilir fakat yalnızca hem çekirdeğe hem de zarfa sahip olanlar infektiftir (6, 7, 23, 36, 51, 65).

ILTV nükleik asidi diğer herpesviruslarda da sabit olan 1,704 g/ml yüzen hacim değerine sahip DNA' dan oluşmaktadır. ILT DNA' sını iki izomerik formda genoma sahip olup, molekül ağırlığı yaklaşık olarak 100×10^6 dır. DNA' daki % 45' lik guanin + sitozin oranı diğer birçok hayvansal herpesvirustan düşüktür. ILTV, 155 kb çift sarmal molekül lineer genoma sahip, 120 kb tek uzun (UL) ve 17 kb tek kısa (US) segmentleri 9 kb ters yüz tekrarlar (IRS) ile kuşatılmıştır. ILTV DNA' sının rastgele DNA zincir sekansından 21 gen tanımlanmıştır (6, 7, 22, 36). Timidin kinaz geni ve ILTV' nin üst üste binen genlerinin zincir sıralama verileri, ILTV ve diğer alfaherpesviruslar arasında DNA düzeyinde homoloji olduğunu göstermiştir (6, 13, 14). Virusun glikoproteinleri diğer herpesviruslarda olduğu gibi humoral ve hücrel immun yanıt uyarımından sorumludur. 205, 160, 115, 90 ve 60 kd ağırlığına sahip beş önemli zarf glikoproteinini bulunduğu, bunların ILTV' nin en önemli immunojenleri olduğu bildirilmiştir (6, 7, 22, 65).

ILTV yapı taşları lipofilik ajanlar, ısı ve çeşitli dezenfektanlara karşı duyarlıdır. Zarflı ILTV' nin infektivitesi kloroform ve eter gibi organik çözücülerden etkilenir. Fitzgerald ve Hanson (1963), ILTV' nin 24 saat etere maruz bırakılması sonucu tüm infektivitesini yitirdiğini bildirmiştir (6). ILTV' nin infektivitesinin, +4°C de gliserol ya da nutrient broth gibi dilüentler içinde saklandığı takdirde bir kaç ay devam ettiği, -20°C ile -60°C arasında liyofilize olarak uzun süre saklanabileceği bildirilmiştir (7, 36). ILTV' nin infektivitesinin 55°C de 15 dakikada ya da 38°C de 48 saatte yok edildiği, tavuk karkasındaki trakea dokusunda 37°C de 44 saat içinde ya da koriyo allantoik zarlarda 25°C de 5 saat içinde yok olduğu, trakeal eksudatlarda ve tavuk karkaslarında 13-23°C de 10-100 gün varlığını sürdürebildiği belirtilmiştir (7). % 3 kresol yada %1 küllü su ILTV' yi bir dakikadan kısa bir sürede inaktif hale getirir. Laboratuvar tezgahları ticari iyodoforlar ya da halojen-deterjan karışımları ile kolayca dekontamine edilebilir. ILTV' nin tamamen etkisiz hale getirilmesi % 5' lik hidrojen peroksit buğusu ile tüsüleme yolu ile kanatlı kümeslerindeki ekipmanlarda gerçekleştirilebilir (7, 36, 56).

ILTV suşlarının virulensinin; tavuklarda ve tavuk embriyolarında, plak büyüklükleri ve morfolojilerinin; hücre kültürlerinde ve embriyolu tavuk yumurtası korioallantoik zarlarında farklılık gösterdiği, sahada bulunan ILTV suşlarının virulenslerinin infeksiyona maruz kalan tavuklarda yüksek morbidite ve mortalite şekillendiren yüksek virulensli suşlardan, zayıf-belirsiz infeksiyon şekillendiren düşük virulensli suşlara kadar değişiklik gösterdiği belirtilmiştir (11, 61). ILTV suşlarının virus-nötralizasyon, immuno flouresans (IF) ve çapraz koruma çalışmaları temelinde antijenik olarak homojen gözüktüğü, heterolog antiserumlar ile zayıf da olsa nötralize olan bazı suşların ufak antijenik farklılıkları işaret ettiği bildirilmiştir (6, 7, 22, 36). Özellikle farklı virulense sahip yabancı tip (wild type) ve modifiye canlı-aşı ILTV suşlarının ayırımı, uygulamada önemli bir sorundur. ILTV suşlarının ayırımına yönelik olarak tavuk embriyo virulens, viral DNA restriksiyon endonükleaz analizleri, DNA hibridizasyon tekniklerinin de dahil olduğu pekçok yöntem ile çalışılmıştır (7, 13, 25).

ILTV embriyolu tavuk yumurtasında ve farklı hücre kültürlerinde üretilebilir. Virus embriyolu tavuk yumurtasının korioallantoik zarında nekroz ve proliferatif doku reaksiyonları oluşturarak opak plak oluşumlarına neden olur. Korioallantoik zarda bulunan plaklar genellikle opak kenarlı ve ortası basılmış nekroze bölgelere sahiptir.

Plaklar inokulasyondan en erken iki gün sonra görülür ve embriyo ölümleri inokulasyondan 2-12 gün sonra şekillenir. İnokule embriyoların hayatta kalma süreleri ek yumurta pasajları arttıkça azalır. Virus embriyolu tavuk yumurtası dışında, tavuk embriyo karaciğer, tavuk embriyo akciğer, tavuk embriyo böbrek ve tavuk böbrek hücre kültürlerinin dahil olduğu farklı kanatlı hücre kültürlerinde üretilebilmiştir. Tavuk embriyo fibroblast hücreleri, Vero hücreleri ve bıldırcın orijinli hücreler ise ILTV üretimi için zayıf substratlar olarak belirlenmiştir. Son çalışmalar ILTV' nin, kimyasallar ile oluşturulan tavuk karaciğer tümöründen elde edilmiş sürekli kanatlı hücre kültürü olan LMH hücrelerinde replike olduğunu göstermiştir. ILTV' nin LMH hücrelerinde replike olmasının adaptasyon süreci gerektirdiği, bu nedenle bu hücrelerin primer izolasyonu da kapsayan tanı amaçlı kullanımlar için uygun olmasa da laboratuvar çalışmalarında virus-konak etkileşim çalışmaları gibi diğer amaçlar için uygun olabildiği bildirilmiştir (6, 7, 12, 22, 36).

Tavuklar ILTV' nin birincil ve doğal konağıdır. Hastalık tüm yaşları etkilese de, en tipik belirtiler erişkin tavuklarda görülmektedir. Viral replikasyonun solunum dokuları ile sınırlı olduğu, viremi hakkında yeterli kanıt bulunmadığı belirtilmiştir (7, 36).

ILTV' nin sülünlerde gözlenen ve sülünlerden-tavuklara geçen bir formu tanımlanmıştır. Winterfield ve So (1968), genç hindilerin üst solunum yolunda lezyonlar oluşturduklarını, ayrıca tavuskuşu trakeasından ILTV izole ettiklerini bildirmişlerdir. Sığırcık, serçe, karga, kumru, güvercin ve beç tavukları ILTV' ye dayanıklı olmalarına karşın ördeklerde subklinik hastalığa yol açan ve serolojik dönüşümün şekillendiği deneysel infeksiyon bildirilmiştir. Embriyolu hindi ve tavuk yumurtaları ILTV' ye duyarlı, ördek yumurtaları daha düşük bir düzeyde duyarlı iken, beç tavuğu ve güvercin yumurtalarının dirençli olduğu belirlenmiştir (7).

ILTV' ye duyarlılığının yaşla birlikte azaldığı, bunun yanı sıra erkek broylerlerin dişilere göre daha duyarlı olduğu, yüksek çevre sıcaklığına (35°C) bağlı olarak ILTV infeksiyonu sonucu oluşan mortalitenin ağır damızlık sürülerde hafif sürülerden daha fazla ölüme yol açtığı bildirilmiştir (7, 36).

ILTV solunum yoluyla ve oküler yolla bulaşmaktadır. Akut infekte hayvanların virüsü, klinik olarak düzelmiş taşıyıcı hayvanlara oranla daha kolay bulaştırdıkları belirlenmiştir (6, 7, 16, 49). Kontamine ekipman ve altlığın kullanımı ile mekanik bulaşma da şekillenebilir. Yumurtanın içinde ya da dışında bulunan virusun yumurta bulaşması henüz kanıtlanamamıştır (6, 7, 36). ILTV ile infekte edilmiş embriyoların çıkımdan önce öldüğü ve ILTV' nin 37°C de 24 saat içinde aktivasyonunu yitirdiği bildirilmiştir (6, 7, 22, 36, 55).

ILTV' nin duyarlı hayvanların üst solunum yolunu infekte etmesinin ardından yoğun viral replikasyon şekillenir. Birbirinden bağımsız bir kaç çalışma, infektif virusun genellikle inokulasyondan sonra 6-8 gün, çok düşük düzeylerde inokulasyondan sonra ise 10 güne kadar trakea dokusunda ve salgılarda bulunduğunu doğrulamıştır (6, 7, 16, 22, 27, 36). Enfeksiyonun viremik safhası olduğuna dair net bir kanıt bulunmamaktadır. Bagust ve ark. (5), virulent Avustralya suşuna maruz kalmış tavukların % 40' ında trakeal inokulasyondan 4-7 gün sonra trigeminal gangliona trakea dışı yayılım belirlemişler, bir sürüde latent ILTV' nin aşılamaadan 15 ay sonra trigeminal gangliondan reaktive olduğunu bildirmişlerdir. Hughes ve ark. (39), taşıma stresi sonrası ve üretim başlangıcında latent infekte tavuklardan ILTV' nin tekrar salındığını bildirmişlerdir. Williams ve ark. (64), trakea içi ILTV saha suşu inokule edilmiş olgun yumurtacı tavuklarda inokulasyondan sonraki 31, 46 ve 61. günlerde PCR ile trigeminal ganglionda viral DNA' yı saptamışlardır.

Solunum yolunda klinik belirti göstermeden devam eden ILTV' nin neden olduğu üst solunum yolu enfeksiyonu, kronik bir laringo trakeit tablosunun belirtisidir. Komarov ve Beaudette (1932); Seddon (1952) ve Gibbs (1933), hastalığı geçirip iyileşmiş tavuklardan alınan larinks ve trakea svaplarının, salgından 16 ay sonra duyarlı hayvanlara inokule edilmesi sonucu yaklaşık % 2 "saha taşıyıcı" oranı olduğunu belirtmişlerdir (7). Deneysel olarak, Avustralya yabani-tip ve aşı ILTV suşları ile infekte edilmiş tavuklardan alınarak hazırlanan trakea organ kültürleri ile yapılan diğer çalışmalar, benzer sürelerde infekte tavukların % 50 ya da daha fazlasında latent trakeal enfeksiyonları göstermiştir (5). Hafif patojenik U.K. saha suşu ya da ILTV aşı suşu ile deneysel olarak infekte edilmiş küçük bir grup tavuğun tekrarlanan trakeal svaplamaları ile enfeksiyondan sonra 7 ile 20 hafta arasında aralıklı ve görüldüğü kadarıyla spontane bir şekilde ILTV saçılımı olduğu saptanmıştır. Siklofosamid, deksametazon gibi

immün baskılayıcı ilaçların, latent ILTV' nin yeniden aktivasyonunda henüz bir başarı sağlamadığı bildirilmiştir (7, 36).

Klinik bulgular, doğal infeksiyondan 6-12 gün sonra ortaya çıkmaktadır. Trakea içi inokulasyon sonrası inkubasyon süresi 2-4 gündür (7, 16, 38, 54, 55, 58, 59). Hastalığın şiddetli epizootik formları, % 90-100 arasında yüksek bir morbiditeye neden olurlar. Mortalite genelde % 5 - % 70 arasında değişse de ortalama % 10-20 arasındadır. Hastalığın hafif enzootik formunun, % 5 kadar az morbidite ve % 0.1-2 kadar çok düşük mortaliteye neden olduğu rapor edilmiştir (36, 40, 65, 68).

ILTV tavuklarda genel olarak akut bir solunum hastalığına neden olur. Hastalığın şiddetli epizootik formunda tipik klinik belirtiler; hırıltılı solunum öksürük, solunum gücünü izleyen burun akıntısı ve kanlı mukus atılımıdır (6, 16, 36, 54, 58). Geçmiş yıllarda ILTV' nin şiddetli epizootik formu daha sık ortaya çıkmaktayken, son zamanlarda yoğun kanatlı yetiştiriciliğinin yapıldığı Avrupa, Avustralya, Yeni Zellanda ve Amerika Birleşik Devletleri gibi ülkelerde hafif enzootik form daha çok görülmektedir. Hafif enzootik form ile ilişkili klinik belirtiler; verimsizlik, yumurta veriminde azalma, gözlerde yaşlanma, infraorbital sinüslerde şişkinlik, devamlı burun akıntısı ve hemorajik konjunktivittir. Enfeksiyonun seyri lezyonların şiddetine göre değişmektedir. Genel olarak, 10-14 gün arasında iyileşme olur, ancak 1-4 haftalık tedavi süreleri de bildirilmiştir (7, 12, 22, 36).

ILTV ile infekte olmuş tavuklarda lezyonlar konjunktivada ve solunum yolu boyunca bulunabilir, fakat en yoğun olarak larenks ve trakeada gözlemlenirler. Trakea ve larenks dokularındaki değişiklikler hafif seyirde yalnızca yoğun mukusun görüldüğü, ya da şiddetli seyirde hemorajik ya da difterik değişiklikler şeklinde kendini gösterebilir. ILTV' nin hafif formunda, konjunktiva ve infraorbital sinüs mukozasında ödem ve konjesyon görülür. Şiddetli formlarda, enfeksiyonun erken dönemlerinde mukoid yangı ile dejenerasyon, nekroz ve son dönemlerde hemoraji şekillenir. Tüm trakea boyunca uzanan mukus nedeniyle kalıplar şeklinde difterik değişiklikler dikkati çeker. Yangı bronşlar, akciğerler ve hava keselerine kadar inebilir. Konjunktiva ve infraorbital sinüs mukozasında görülen ödem ve konjesyon hafif formda gözlemlenebilecek tek patolojik lezyondur (1, 6, 7, 11, 16, 27, 32, 36, 58).

ILTV infeksiyonu sonrasında çeşitli immün yanıtlar oluşmaktadır. Virusu nötralize eden antikorların inokulasyondan sonra 5-7. günlerde saptandığı, yaklaşık 21. günde pik yaptığı, daha sonra birkaç ay azalarak düşük düzeylere indiği, bu nötralizan antikorların bir yıl ya da daha fazla süreyle saptanabildiği bildirilmiştir (47). Trakea salgısında inokulasyon sonrası yaklaşık 7. günden sonra antikor saptanabildiği ve 10-28. günlerde miktarlarının sabit bir durum gösterdiği belirlenmiştir (6, 7, 36). York ve ark. (68), trakeal yıkantı sıvısında inokulasyondan 5 gün sonra ILTV' ye karşı total spesifik antikorların saptanabileceğini, IgA' ların inokulasyondan 6 gün sonra ortaya çıktığını, ancak nötralizan antikorların 14 günden önce saptanamadığını bildirmişlerdir. IgA' ların da dahil olduğu salgısal antikorların solunum yolu gibi mukozal yüzeylerde direnç şekillenmesinde önemli rol oynadığı, mukozal IgA antikor yanıtlarının lokal olarak etkinlik sağlanmada antijenin sistemik verilışinden daha etkili olduğu belirtilmiştir (7, 36, 68).

Herpes virus infeksiyonlarının tedavisinde hücresel immünite mekanizması etkilidir. Benzer mekanizmaların tavukların ILTV ile tekrar infekte olmalarını önlemeyle ilgili olduğu belirtilmiştir. Bununla ilişkili olarak bursa fabrisiusları çıkartılmış spesifik antikor sentezlemesi mümkün olmayan tavukların sıvısal bağışıklık oluşturamasa da aşılardan sonra eprüvasyondan korundukları, dalak hücreleri ve periferel kan lökositleri gibi histolojik uyumlu immün lenfoid hücrelerin transfer edildiği zayıf tavukların infeksiyona karşı dirençli hale gelebildiği vurgulanmıştır (53). Fahey ve York (19), ILTV direncinin başlıca aracısının trakeadaki lokal hücresel immünite olduğunu belirtmişlerdir.

Yumurta aracılığıyla yavruya geçen maternal antikorlar ILT' ye karşı koruma sağlamamaktadır (36). İki haftalık yaştan daha büyük tavuklarda aşılardan 3-4 gün sonra antikor sentezinin başladığı, 6-8 gün sonra tam bir koruma sağlayacak titreye eriştiği belirtilmektedir (36). Oluşan bağışıklığın en erken aşılardan 8-15 hafta sonra azalmaya başladığı, fakat genellikle aşılardan 15-20 hafta sonrasına kadar yeterli sürü bağışıklığının devam ettiği saptanmıştır (7, 49).

ILT' nin laboratuvar tanısı; virus izolasyonu, şüpheli hayvanların kan serumunda antikor aranmasına yönelik serolojik testler ya da dokularda sınıtial hücre içi inklüzyon cisimciklerinin saptanması amacıyla histopatolojik incelemelerle

yapılabilmektedir. Ayrıca DNA prob-hibridizasyonu ve PCR gibi moleküler tanı yöntemleri hastalığın tanısında önemli bir yer tutmaktadır (1, 37, 54, 68, 71).

Virus izolasyonu için en iyi inceleme örneğinin trakeal svap örnekleri olduğu belirtilmiştir (65, 71). Bu amaçla, alınan inceleme örneklerinden, en az üç adet 10-12 günlük embriyolu tavuk yumurtasının korioallantoik zarına inokulasyonlar yapılarak, 37°C de 7 gün süreyle inkübasyona bırakıldıktan sonra ölenlerin ya da 7 gün canlı kalanların korioallantoik zarında tipik plak oluşumları incelenmektedir. İzolasyon amacıyla ayrıca, tek katlı tavuk embriyo karaciğer ya da tavuk embriyo böbrek hücre kültürlerine inokulasyon yapılarak, 7 gün inkübasyondan sonra mikroskop altında sinsityal hücre sitopatik etkisi yönünden incelenmektedir (65, 71). Şüpheli bir örneğin negatif olarak kabul edilmesi için 7 gün aralıklarla en az üç kez pasaj yapılması gerektiği vurgulanmıştır (71). İzole edilen virusun, ILTV' ye karşı elde edilen hiperimmun serum kullanılarak yumurta ya da hücre kültüründe nötralizasyon testi ile doğrulanabileceği bildirilmiştir. Alternatif olarak, hücre kültürü sıvısından ya da korioallantoik zar üstündeki plaklardan elde edilen virus parçacıkları, elektron mikroskopi ya da floresans antikor (FA) tekniği ile de tanımlanabilmektedir (7, 22, 36, 71).

Virus izolasyonunun çok uzun sürmesi ve bunun yanında bakteriyel kontaminasyonlardan çok fazla etkilenmesi, tanıda farklı yöntemlerin geliştirilmesi zorunluluğunu ortaya çıkarmıştır (1, 4, 65). Bu amaçla şüpheli hayvanların kan serumlarında antikor aranmasına yönelik serolojik testler kullanılmaya başlanmıştır. ELISA, agar jel presipitasyon (AGP), virus nötralizasyon (VN), indirekt immunofluoresans testleri geliştirilmiş olmakla birlikte (7, 22, 68, 69), günümüzde en sıklıkla kullanılan yöntem ELISA' dır (4, 9, 28, 46, 66). York ve ark. (68), ILTV spesifik monoklonal antikor kullanarak geliştirdikleri ELISA yönteminin virus izolasyonunundan daha hızlı, AGP ve floresans antikor (FA) testlerinden daha doğru sonuç verdiğini ve tüm bu özellikleri sayesinde hastalığın rutin tanısında güvenle kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Abbas ve ark. (1), ILTV' nin tanısında kullanılan indirekt floresans antikor (IFA) tekniği, immunoperoksidaz tekniği, virus izolasyonu, histopatoloji, PCR ve DNA hibridizasyon tekniklerini sensitivite ve spesifite yönünden karşılaştırdıkları çalışmalarında, sırasıyla immunoperoksidaz, IFA, PCR, histopatoloji ve hibridizasyon tekniklerinin sensitivitelerinin; PCR, histopatoloji, hibridizasyon,

immunoperoksidaz tekniği ve IFA' nın spesifitelerinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Ticari olarak geliştirilmiş ve doğruluğu kanıtlanmış ELISA kitlerinin en büyük dezavantajı, saptanan antikor titrelerinin aşılamaya bağlı olarak mı yoksa saha infeksiyonu nedeniyle mi şekillendiğinin ayırt edilememesidir (4, 46, 66). Bu konuyla ilgili olarak, Chang ve ark. (15), saflaştırılan r-gp60 ve r-gE proteinlerinin antijen olarak kullanıldığı ELISA ile, aşılamaadan 2 hafta sonra aşı ve aşısız sürüleri ayırt edebilecek bir ELISA yöntemi geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Bunun dışında, ELISA ile hastalığın erken dönemlerini saptamada da sorunlar yaşanmaktadır. Gerek doğal infeksiyonlarda gerekse deneysel çalışmaların sonuçları, infekte hayvanlarda antikor titrelerinin ELISA ile infeksiyondan en erken 2 hafta sonra (ortalama 2-6 hafta) saptanabildiğini ortaya çıkarmıştır (16, 50, 51, 53).

ILTV hastalığının tanısında moleküler tanı yöntemleri özellikle 1990' ların başından itibaren çok önem kazanmıştır (65). Birçok araştırmacı klinik örneklerin incelenmesinde, PCR' ın virus izolasyonundan çok daha hassas olduğunu bildirmiştir (22, 27, 65). Williams ve ark. (64), direkt elektron mikroskopi, virus izolasyonu ve PCR' ı karşılaştırdıkları araştırmalarında, kullandıkları her yöntemin birbirinden üstün taraflarının olduğunu ancak PCR tekniğinin en önemli avantajının, inceleme örneklerinde canlı virusa gereksinim duyulmamasının yanısıra diğer bakteriyel ve viral kontaminasyonlardan ya da dokulardaki dejenerasyonlardan etkilenmemesi olduğunu belirtmişlerdir. Beltrao ve ark. (9) nested-PCR, virus izolasyonu ve histopatoloji yöntemlerini karşılaştırmışlar ve ILTV' nin tanısında nested-PCR' ın sensitivitesinin yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Alexander ve ark. (2), Kanada ILTV suşu ile geliştirilen primerler kullanılarak gerçekleştirdikleri PCR çalışması ile, bu yöntemin saha salgınlarından izole edilen farklı izolatları saptadığını göstermişlerdir. Calisson ve ark. (12), geliştirdikleri real-time Taqman PCR ile klinik numunelerden, virus izolasyonuna oranla 3.7 kat daha fazla pozitiflik saptayabildiklerini ve bu yöntemin spesifik, sensitif ve viral nükleik asidi güvenilir şekilde ölçülebilir olduğunu bildirmişleridir. Bunlara ek olarak Han ve ark. (29), TK ve gG genlerine spesifik primerlerin kullanıldığı PCR-RFLP yöntemi geliştirerek aşı suşu, düşük virulensli ve virulent ILTV suşlarını ayırt ederek tanıda önemli bir adım atmışlardır. PCR tekniğinin, hastalıktan şüpheli hayvanların tanısında kullanılabildiği gibi, hastalığın

epizootiyolojisinde önemli bir infeksiyon kaynağı olan aşılardaki ILTV kontaminasyonunun saptanmasında da güvenilir bir şekilde kullanılabilceği bildirilmiştir (63).

Araştırmacıların sunduğu veriler ışığında ELISA ve PCR teknikleri, ILTV' nin tanısında sensitif ve spesifik sonuçlar vermekte olup, sahada salgınların hızlı bir şekilde tanısında ve hastalığın farklı bölgelerdeki durumu hakkında yetiştiricilere ve araştırmacılara gerekli olan doğru bilgileri sunmaktadır (5, 7, 22, 36, 41, 50, 66, 71).

Bir sürüde ILTV salgını ortaya çıktıktan sonra, hastalığın semptomlarını ya da lezyonların şiddetini azaltabilecek etkili bir ilaç bulunmamaktadır. Bu nedenle de hastalığın eradikasyonuna yönelik korunma ve kontrol uygulamaları büyük önem taşımaktadır. Bu eradikasyon programlarının başarısı yerel yönetimler ve özel sektörün işbirliği içinde çalışmasına bağlıdır (36, 71).

Hastalıkla mücadelede en önemli koşullardan biri biyo-güvenlik önlemlerinin alınmasıyla, sağlıklı hayvanların etkenle temas haline geçmelerinin önlenmesidir (7). ILTV dezenfektanlara ve sıcaklık gibi fiziksel etkenlere duyarlı olduğundan yeterli sanitasyon ve dezenfeksiyon önlemleri ile sürüler arası geçiş önlenmektedir (36). Ayrıca karantina ve hijyen uygulamaları ile potansiyel kontamine görevliler, yem, ekipman ve tavuk hareketlerinin önlenmesi ILTV' ye karşı başarılı bir mücadelede kilit rol oynamaktadır (6, 71).

Ülkemizde 3285 sayılı Hayvan Sağlığı ve Zabıtası Kanununun 4. maddesinde; ithal edilecek kasaplık canlı tavuk, tavuk eti, sakatatı ve yumurtalarının geldiği bölgenin Avian Infectious Bronchitis, Avian Infectious Laryngotracheitis, Avian Tuberculosis, Fowl pox, Marek's disease, Avian Mycoplasmosis (*M. gallisepticum*, *M. synoviae*), Avian Chlamydiosis, Salmonella Enteridis ve *S. Typhimurium* hastalıkları yönünden ari olması ve bu durumun sağlık sertifikalarında belirtiliyor olması gerekliliği belirtilmektedir (74). Ülkemizde ILTV' nin tanısına yönelik araştırma sayısının yok denecek kadar az olması ve buna bağlı olarak hastalığın ülkemizdeki yaygınlığı ile ilgili bilgi bulunmaması nedeniyle ILT ile mücadeleye yönelik bir önlem alınmamış olmakla birlikte, herhangi bir salgın çıktığında izlenecek prosedürlerle ilgili bir yönetmelik de bulunmamaktadır. Ancak birçok Avrupa ülkesinde ve Amerika' da bir salgın sırasında yapılması gerekenler; ilgili makamların zaman kaybedilmeden bilgilendirilmeleri, salgının görüldüğü bölgenin çevresindeki yem fabrikaları da dahil olmak üzere tüm

tavukçulukla ilgili işletmelerin uyarılmaları ve gerekli imha ve karantina işlemlerinin başlatılması şeklindedir (6, 11).

Korunmada önemli bir diğer noktanın, hızlı ve güvenilir tanı yöntemlerinin geliştirilmesi olduğu, bu sayede işletmenin hastalıktan arı olduğunun saptanarak, işletmeye güvenle yeni hayvan alımının mümkün olacağı bildirilmiştir (11). Hastalıktan şüpheli hayvanların tanısında PCR gibi moleküler tanı yöntemleri önerilirken, sahada sürülerin taranması amacıyla ELISA sıklıkla kullanılmaktadır. ILT' de vertikal bulaşma olmadığı için yumurtadan yeni çıkan civcivlerin serolojik olarak negatif olacaklarından Newcastle, Infectious Bronchitis, IBD (Infectious Bursal Disease) gibi diğer önemli kanatlı hastalıklarının kontrolleri sırasında ILT yönünden de serolojik incelemelerin yapılması önerilmektedir (46, 66). Hastalığın endemik olarak seyrettiği bölgelerde broyler ve yumurtacı sürülerin belirli aralıklarla serolojik olarak taranması da işletmenin geleceği açısından önemli kabul edilmektedir (66, 68).

Hastalıktan korunmada en önemli araçlardan biri de etkili bir aşılama programının uygulanmasıdır. Günümüzde birçok firma tarafından piyasaya sunulmuş modifiye canlı, inaktif ve rekombinant aşılar bulunmaktadır (22, 36, 62). Aşılamalar kloakal, kanat zarına batırma, intranazal, sub-konjunktival, içme suyu ya da aerosol yollardan herhangi biriyle yapılabilmektedir (5, 22, 31). Fulton ve ark. (23), iki aşılamadan tek aşılamadan daha iyi koruma sağladığını ve sub-konjunktival yöntem ile aşılamadan, aerosol ve içme suyu yönteminden çok daha etkili olduğunu saptamışlardır.

Yapılan çalışmalar, özellikle modifiye canlı virus aşılarının kullanıldığı ve aşılamada yeterli özenin gösterilmemesi sonucu aşının tüm sürüye homojen olarak dağılmadığı durumlarda, aşıları tavuklardan aşısız olanlara aşı virusunun bulaşabileceğini, bunun ardından çok daha şiddetli klinik belirtilerin şekillenebileceğini ortaya koymuştur (5, 6, 12, 24, 29). Bununla ilişkili olarak, Burns (11), broyler sürülerinde hafif enzootik formun kontrolünde aşılamayı önermemiş, geleneksel kontrol mekanizmaları ile eradikasyon çalışmalarının bu varyanta karşı etkili olmamasına karşın, arttırılan önlemler ile klinik tablo gösteren çiftlik sayısında düşüş sağlandığını bildirmiştir. Mutalib (47), aşıları hayvanlardan aşısızlara bulaşmanın virulent ve avirulent virus karışımlarından elde edilen modifiye aşılarında görüldüğünü, tavuk embriyosunda üretilmiş viruslardan elde edilen aşılarıdaki virusun duyarlı hayvanlar arasındaki her bulaşmada virulensinin de arttığını belirtmiştir. Araştırmacı kendi çalışmasında kullandığı

hafif attenuue klon aşısında da bu şekilde bir yayılmanın gerçekleştiğini ancak diğer canlı aşılarından farklı olarak, hücre kültürü kaynaklı olan bu aşı virusunun virulensinde 20 pasajı takiben artış olmadığını bildirmiştir. Veits ve ark. (61), ILTV' nin UL0 genini çıkartarak hazırladıkları bivalent canlı aşının, mevcut aşılarla alternatif olarak kullanılabileceğini bildirmiştir.

Tüm bu bilgiler ışığında araştırmacılar, ILT kontrolünde en etkili yaklaşımın hızlı tanı, virusun saçılmasının önlenmesi, aşılama programı oluşturulması süreçlerinin koordinasyon içinde yürütülmesi ile eradikasyonun sağlanması olduğunu bildirmişlerdir (22, 36, 63).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Örnekler

ILT virusu spesifik DNA'sının saptanması için trakeal svaplar, etkene karşı oluşan antikorların varlığının araştırılması amacıyla kan örnekleri kullanıldı. Örnekler infeksiyonun yurdumuzdaki prevalansının henüz saptanmamış olması nedeni ile tahmini prevalans % 50 kabul edilerek % 95 güven düzeyi ve % 10 absolut kesinliğe göre tesadüfi örnekleme ile Kasım 2006 - Nisan 2007 tarihleri arasında Bandırma, İzmir, Afyon ve Bolu bölgelerinde yetiştirilen, solunum problemi bulunan ya da yetiştirmeden çıkarılan 44' ü 1-40 günlük broyler ve 52' si 10-106 haftalık yumurtacı olmak üzere toplam 96 tavuktan alındı. Örneklerin alındığı yöreler ve örnek sayıları ile örnek alınan tavukların yaş, tür ve klinik bilgileri Tablo 3.1' de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Örneklerin alındığı yöreler ve örnek sayıları ile, örnek alınan tavukların yaş, tür ve klinik bilgileri

No	Örnek alınan kaynak	Adet	Yaş	Tür	Klinik belirti
1	Bandırma	15	10-11 Hafta	Yumurtacı	Solunum Problemi
2	Bandırma	22	20 Günlük	Broyler	Solunum Problemi
3	İzmir	7	40 Günlük	Broyler	Solunum Problemi
4	İzmir	5	1 Günlük	Broyler	--
5	İzmir	9	91 Haftalık	Yumurtacı	Solunum Problemi
6	Afyon	4	100-102 Hafta	Yumurtacı	Solunum Problemi
7	Afyon	8	40 Hafta	Yumurtacı	Solunum Problemi Yumurta Verimi Kaybı
8	Afyon	9	104-106 Hafta	Yumurtacı	Solunum Problemi
9	Afyon	7	104 Hafta	Yumurtacı	Solunum Problemi
10	Bolu	4	20 Günlük	Broyler	Solunum Problemi
11	Bolu	6	40 Günlük	Broyler	Solunum Problemi

3.1.1.1. Trakeal svap örnekleri:

Tavuklardan trakea örnekleri alınarak steril örnek poşetleri içerisinde soğuk zincir altında Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına getirildi ve kullanılıncaya kadar -20°C de saklandı. PCR için ekstraksiyon yapılmadan hemen önce derin dondurucudan çıkarılan trakea örnekleri tamamen çözdürüldü. Trakeaların orta bölgelerinin yüzeylerinde steril bistüriler ile kesitler açılarak steril svaplar ile trakea mukozasından sürüntüler alındı ve 2' şer ml steril PBS içeren tüplere aktarıldı. Hazırlanan süspansiyonlar spesifik DNA' nın saptanması amacıyla PCR yöntemi ile incelendi.

3.1.1.2. Kan serumu örnekleri:

Trakeaları alınan tavuklardan toplanan kan örnekleri de soğuk zincir altında laboratuvara getirildi, santrifüje edilerek serumları ayrıldı ve ELISA' da kullanılıncaya kadar -20°C de saklandı.

3.1.2. PCR

3.1.2.1. Ekstraksiyon Kitleri

A. QIAamp DNA Mini ekstraksiyon kiti (Lot No 12181565): Trakea örneklerinde total DNA' nın elde edilmesi amacıyla kullanıldı.

QIAamp DNA Mini ekstraksiyon kitinin içeriği

- AL Buffer (lisis buffer)
- AW1 Buffer (wash buffer)
- AW2 Buffer (wash buffer)
- AE Buffer (elution buffer)
- Proteinaz K
- QIAamp Spin Kolonları
- Toplama tüpleri

B. GF-1 Gel DNA Recovery ekstraksiyon kiti (Lot No GF-GP-050): Elektroforetik seperasyon sonucunda agaroz jelde saptanan spesifik DNA'nın saflaştırılması amacıyla kullanıldı.

GF-1 Gel DNA Recovery ekstraksiyon kitinin içeriği

- Gel DNA Binding Buffer (GB Buffer)
- Wash Buffer
- Elution Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.5)
- GF-1 Spin Kolonları
- 2 ml toplama tüpleri

3.1.2.2. Amplifikasyonda kullanılan gereçler

- Primer FORWARD (Integrated DNA Technologies, Inc.)
5' CTA CGT GCT GGG CTC TAA TCC 3'
- Primer REVERSE (Integrated DNA Technologies, Inc.)
5' AAA CTC TCG GGT GGC TAC TGC 3'
- Taq DNA Polymerase (Fermentas-EP0402)
- 10 X Taq buffer (NH₄)₂SO₄ (Fermentas-B33)
(750 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% (v/v) Tween 20)
- 10 X Taq buffer KCl (Fermentas-B15)
(100 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 500 mM KCl, 0.8% (v/v) Nonidet P40.)
- MgCl₂ (Fermentas- R0971)
- dNTP Mix (Fermentas- R0181)
- Pozitif Kontrol: ILTV A96 suşu

dNTP Mix hazırlanması:

Dietilpirokarbonat (DEPC) ile işlem görmüş distile su (Ambion-AM9920) ile 25 mM konsantrasyonda A, T, C, G dNTP içeren toplam 200 µl stok solüsyon hazırlandı.

Primer hazırlanması:

DEPC'li distile su ile 20 pmol/ μ l konsantrasyonda stok solüsyonları hazırlandı.

Master Mix' lerin hazırlanması:

Trakea örneklerinden elde edilen total DNA'dan ILTV spesifik DNA'nın amplifikasyonunda ve elektroforetik seperasyon sonrasında agaroz jelde saptanan spesifik DNA'nın amplifikasyonunda kullanılmak üzere iki farklı master mix (Master Mix I ve Master Mix II) hazırlandı.

Master Mix I, Trakea örneklerinden elde edilen total DNA'dan ILTV spesifik DNA'nın amplifikasyonunda kullanıldı.

▪ 10 X buffer (NH ₄) ₂ SO ₄	5 μ l
▪ MgCl ₂ (25 mM)	5 μ l
▪ dNTP Mix (10 mM)	5 μ l
▪ Primer FORWARD	1 μ l
▪ Primer REVERSE	1 μ l
▪ Taq DNA Polymerase (5u/ μ l)	0.5 μ l
▪ dH ₂ O	30.5 μ l
▪ Hedef DNA	2 μ l
TOPLAM	50 μ l

Master Mix II, elektroforetik seperasyonu sonucu agaroz jelde saptanan spesifik DNA'nın amplifikasyonunda kullanıldı.

▪ 10 X buffer KCl	5 µl
▪ MgCl ₂ (25 mM)	5 µl
▪ dNTP Mix (10 mM)	5 µl
▪ Primer FORWARD	1 µl
▪ Primer REVERSE	1 µl
▪ Taq DNA Polymerase (5u/µl)	0.5 µl
▪ dH ₂ O	30.5 µl
▪ Hedef DNA	2 µl
TOPLAM	50 µl

3.1.2.3. TBE buffer

Agaroz jelin hazırlanması, elektroforez ve DNA bantlarının boyanması sırasında sulandırıcı olarak 1X TBE buffer (89 mM Tris-HCl, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA, pH 8.0) hazırlandı. Bu amaçla bir hacim 10X TBE buffer (SIGMA-D30926), 9 hacim steril distile su ile karıştırıldı.

3.1.2.4. Agaroz jel

Amplifiye edilmiş ürünlerin elektroforezinde kullanılmak üzere % 2 oranında hazırlandı.

Agaroz (Sigma- A0576)	0,600 g
1X TBE buffer	30 ml

Belirtilen miktarda agaroz ve TBE buffer ısıtılarak çözündürüldü. Agaroz 50°C ye kadar soğutulmuş jel kalıbına döküldü, tarak yerleştirildi. Jel formunu alıncaya kadar beklendi ve tarak çıkarıldı. Agaroz jel tanka aktarılarak üzeri 1X TBE buffer ile kaplandı.

3.1.2.5. Yükleme solusyonu

PCR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi için kullanıldı. Bu amaçla 2 µl 6X yükleme solusyonu (Fermentas- R0611), 10 µl PCR ürünü ile karıştırılarak kullanıldı.

3.1.2.6. DNA Marker

Elektroforezde DNA' ların ağırlıklarının saptanması için kullanıldı. 1 µl DNA Marker (Fermentas, QX174 DNA/BsuRI), 1µl yükleme solusyonu, 4 µl deiyonize su karıştırıldı.

3.1.2.7. Ethidium Bromide

Elektroforetik seperasyon sonrası oluşan DNA bantlarının boyanması için % 0.5 oranında hazırlandı. Bu amaçla 100 ml 1X TBE buffer içine 30 µl ethidium bromide (Sigma- E-8751) eklendi.

E. Diğer Gereçler

- % 95'lik Ethanol (Riedel-deHaen 32221)
- Mineral yağ (Sigma- M8410)
- 1,5 ml ve 2 ml kapaklı mikrosantrifüj tüpleri
- 0,5 ml'lik ince çeperli DNase, RNase free PCR tüpleri
- Pipetler (0,5-10µl, 10-100µl,100-1000µl otomatik pipetler)
- 10µl DNase, RNase free filtreli pipet uçları
- 100µl DNase, RNase free filtreli pipet uçları
- 1000µl DNase, RNase free filtreli pipet uçları
- Thermalcyclers (Biometra Uno-thermoblock)
- Mikrosantrifüj (Hettich- Mikro22)
- Vorteks (Biosan- V1)
- Agaroz jel elektroforez tankı (Agagel Mini) ve güç kaynağı (Biometra-Power pack P25)
- UV Transmilatör (Biometra-TI 1)

3.1.3. ELISA

3.1.3.1. ELISA Kiti

Tavukların kan serumlarında ILTV'ye karşı oluşan antikorların saptanmasında Infectious Laryngotracheitis Virus Antibody ELISA Test Kit (BioCheck- FS4312) kullanıldı.

ELISA Kitinin içeriği

- ILTV antijeni ile kaplı 96 kuyucuklu mikropalakalar
- Sheep anti-chicken alkalın fosfataz konjugat
- pNPP (p-Nitrofenil Fosfataz) substrat tabletleri ve substrat çözeltisi
- Örnek sulandırma sıvısı
- Yıkama solüsyonu
- Durdurma solüsyonu
- Pozitif ve negatif kontrol serumları

3.1.3.2. Eksternal Referans Kontrol RF06 (Biocheck):

NDV, IBV, IBD, REO, AE, ART, MG, MS, EDS, ILT, SE, ORT ve AI antikorlarını içeren bu pozitif kontrol serumu ELISA testinin güvenilirliğini kontrol amacıyla kullanıldı.

3.1.3.3. ELISA Okuyucusu

ELISA sonuçları Organon Technica Microwell System Reader 230 optik okuyucu ile değerlendirildi.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. PCR

PCR yöntemi iki aşamalı olarak gerçekleştirildi.

- Trakeal svaplardan DNA ekstraksiyonu, amplifikasyonu, DNA saptanması
- Jelden ILTV spesifik DNA'sının ekstraksiyonu, amplifikasyonu, DNA saptanması

3.2.1.1. Trakeal svaplardan DNA ekstraksiyonu ve Amplifikasyonu

A. Trakeal svaplardan DNA ekstraksiyonu

Kit içeriğinde üretici firma tarafından belirtilen yönteme göre yapıldı. 2 ml' lik trakeal svap süspansiyonları 7.500 rpm de 10 dakika santrifüje edildi ve dipteki tortular 200' er µl PBS ile sulandırıldı. Bu sıvılardan 200' er µl alınarak 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı, üzerlerine 20 µl Proteinase K ve 200 µl AL buffer eklenerek 15 saniye vortekslendi. 56°C de 10 dakika bekletildi. Lizatlara 200' er µl etanol eklendi ve 15 saniye vortekslendi. 2' şer ml'lik toplama tüpleri üzerine spin kolonlar yerleştirildikten sonra lizatlar mikropipetler ile kolonlara aktarıldı ve 1 dakika süreyle 8.000 rpm'de santrifüje edildi. Filtratları içeren tüpler atıldı. Kolonlar yeni 2' şer ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi. Spin kolonlara 500' er µl AW1 buffer eklendi ve 8.000 rpm de 1 dakika santrifüje edildi. Filtratları içeren tüpler atıldı. Spin kolonlar 2' şer ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi ve üzerlerine 500 µl AW2 buffer eklendi. 14.000 rpm de 3 dakika santrifüje edildi. Filtratları içeren tüpler boşaltıldı. Spin kolonlar 1.5' er ml' lik santrifüj tüplerine aktarıldı, 200' er µl AE buffer eklendi, oda ısısında 1 dakika bekletildi, 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüje edildi. Elde edilen DNA'lar kullanılıncaya kadar – 20°C de saklandı. Pozitif kontrol amacıyla kullanılan ILTV A96 suşunun DNA' sı da aynı yöntemle ekstrakte edildi.

Bu ekstrakte DNA'nın 2 µl'si PCR amplifikasyonunda kullanıldı.

B. Amplifikasyon

Vögtlin ve ark. (63) tarafından bildirilen yönteme göre uygulandı. 48' er µl master mix I ve 2' er µl DNA ekstraktları, 0.5 ml'lik PCR tüplerine konuldu, hafifçe vortekslendi, 5 saniye süreyle santrifüje edildi, üzerleri 50'şer µl mineral yağ ile

kapatıldı. Pozitif kontrol olarak 2 µl ILTV A96 suşu ekstraktı, negatif kontrol olarak 2 µl DEPC'li su 48' er µl master mix ile karıştırılarak kullanıldı.

PCR tüpleri thermocycler'a yerleştirildi. 95°C de 3 dakika ön denatürasyonun ardından, 95°C de 30 saniye (35 siklus) denaturasyon, 60°C de 30 saniye (35 siklus) primer bağlanması, 72°C de 30 saniye (35 siklus) sentez aşamaları gerçekleştirildi. 72°C de 10 dakika (1 siklus) final sentez aşamasından sonra + 4°C ye kadar soğutulmuş elektroforetik seperasyon yapıncaya kadar termocycler' da bekletildi .

3.2.1.2. Jelden ILTV spesifik DNA'nın Ekstraksiyonu ve Amplifikasyonu

A. Jelden ILTV spesifik DNA'nın Ekstraksiyonu

Üretici firma tarafından kitte belirtilen yöntemle yapıldı. Elektroforetik seperasyon sonucu saptanan ILTV DNA bantlarının bulunduğu bölüm agaroz jelden kesilerek çıkartıldı ve önceden tartılmış 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Jel dilimlerinin net ağırlıkları belirlendi ve üzerlerine 1' er hacim jel için 5' er hacim GB buffer eklendi. Jeller tamamen eriyinceye kadar 50°C de bekletildi ve spin kolonlara aktararak 13.400 rpm'de 1 dakika santrifüje edildi. Filtratlar atılarak spin kolon içine 750' şer µl wash buffer eklendi ve 2 dakika bekletildi. 13.400 rpm'de 2 dakika santrifüje edildi. Filtratları içeren tüpler atıldı. Spin kolonlar yeni 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi ve üzerlerine 50' şer µl elution buffer eklendi. 2 dakika bekletildikten sonra 3400 rpm'de 1 dakika santrifüje edildi. Filtratlar -20°C de saklandı.

B. Amplifikasyon

DNA amplifikasyonunda kullanılan örneklerin hazırlanışı, trakealardan ekstrakte edilmiş olan DNA'ların amplifikasyonunda uygulanan yöntemle göre hazırlandı. Farklı olarak master mix I yerine ile master mix II kullanıldı. Amplifikasyon prosedürü olarak trakealardan ekstrakte edilen DNA' ların amplifikasyon prosedürü uygulandı.

3.2.1.3. Elektroforetik seperasyon ve DNA' nın saptanması

Trakeal örneklerden ve jelden ekstrakte edilerek amplifiye edilen DNA' ların elektroforetik seperasyonları aynı şekilde gerçekleştirildi. Bu amaçla amplifiye edilmiş PCR ürünlerinden 10' ar µl alınarak üzerlerine 2' şer µl yükleme solusyonu eklendi. Bu karışımlardan 10' ar µl agaroz jeldeki kuyucuklara yüklendi. İlk sıraya 1 µl DNA marker, ikinci sıraya 10 µl negatif kontrol, üçüncü sıraya 10 µl pozitif kontrol ve diğer

sıralara amplifiye edilmiş PCR ürünleri konuldu. Elektroforez işlemi 90 voltta bir saat süreyle gerçekleştirildi. Bu sürenin sonunda agaroz jel tanktan alınarak ethidium bromide solüsyonunda 60 dakika süreyle bekletildi. DNA bantlarının oluşumu UV transilatör üzerinde gözlemlendi (63).

3.2.1.4. Sonuçların Yorumlanması

Agaroz jel elektroforetik seperasyonlar sonucunda 588 bp moleküler ağırlığında bant oluşumu pozitif değerlendirildi (63).

3.2.2. ELISA

Üretici firma tarafından kitte belirtilen yöntemine göre yapıldı. Kan serumları sulandırma sıvısı ile 1/500 oranında sulandırıldı. Mikroplaka üzerindeki A₁ ve B₁ çukurlarına 100'er µl negatif kontrol, C₁ ve D₁ çukurlarına 100'er µl pozitif kontrol, E₁ ve F₁ kuyucuklarına 100'er µl referans kontrol serumları ilave edildi. Diğer boşluklara test edilecek sulandırılmış serum örneklerinden 100' er µl ilave edildi. Plakanın üstü kapatıldı ve oda ısısında 60 dakika bekletildi. Mikroplakalar her kuyucuğa 300' er µl dolacak şekilde yıkama sıvısı ile 4 kez yıkandı. Tüm kuyucuklara 100' er µl konjugat ilave edildi. Üstü kapatılarak oda ısısında 60 dakika bekletildi. 4 kez yıkandı. Kuyucukların tümüne 100' er µl substrat ilave edildi, oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. her kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu ilave edildi. ELISA okuyucusu ile 405 nm dalga boyunda okundu.

3.2.2.1. Sonuçların değerlendirilmesi

Kite özgü bilgisayar yazılımı (Biochek Software) ile gerçekleştirildi. Hesaplama sonucu 0.5'in üstünde değerlere sahip olan örnekler pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.2.2. Testin Geçerliliğinin Belirlenmesi

Yazılım analizi sonucu RF06 kontrol serumundan elde edilen değerlerin istenilen aralıkta olup olmadığı kontrol edilerek belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. PCR Bulguları

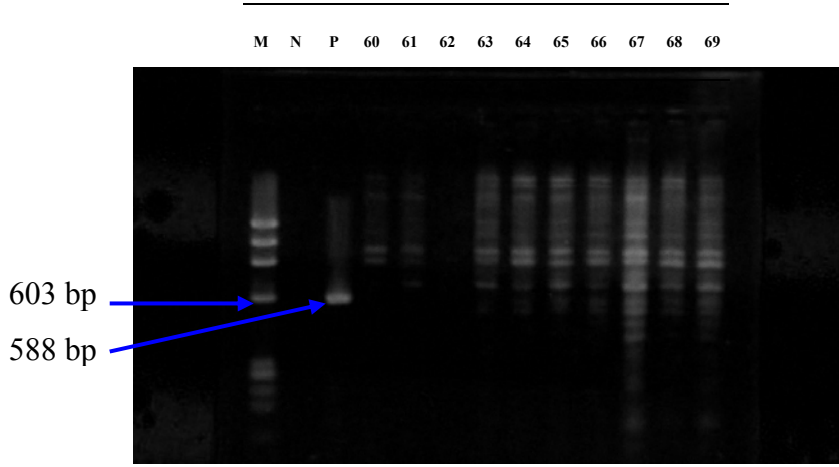
ILTV spesifik primerleri kullanılarak PCR ile incelenen 96 tavuğa ait trakeal svap örneklerinden 17' sinde 588 bp' de şüpheli bantlar gözlemlendi (Şekil 4.1). Bu şüpheli örneklerin jelden yapılan ekstraksiyonu sonucunda, örneklerin 14' ünde 588 bp' de spesifik bantlar gözlemlendi (Şekil 4.2).

Toplam 96 örneğin 14 (% 14.58)' ünde ILTV DNA'sı saptandı.

PCR ile pozitif bulunan 14 örneğin 11' inin 10-106 haftalık yaşlar arasındaki yumurtacı sürülerden, diğer 3 örneğin 20 günlük broyler sürülerinden alınan tavuklara ait olduğu belirlendi (Tablo 4.1.).

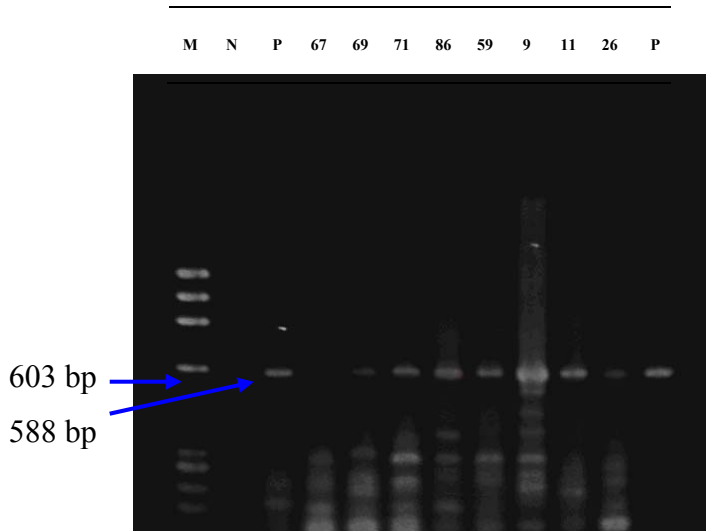
Tablo 4.1: Trakea örneklerinin alındığı tavuklara ait PCR bulguları

Kaynak	Yaş	Yetiştirme şekli	Örnek sayısı	ILTV DNA' sı saptanan örnek sayısı	%	
Bandırma	10-11 haftalık	Yumurtacı	15	2		
	20 günlük	Broyler	22	1		
İzmir	1 günlük	Broyler	5	0		
	40 günlük	Broyler	7	0		
	91 haftalık	Yumurtacı	9	5		
Afyon	100-102 haftalık	Yumurtacı	4	1		
	40 hafta	Yumurtacı	8	1		
	104-106 hafta	Yumurtacı	9	1		
	104 haftalık	Yumurtacı	7	1		
Bolu	20 günlük	Broyler	4	2		
	20- 40 günlük	Broyler	6	0		
Toplam			96	14		14.58



Şekil 4-1: Trakeal svap örneklerinden ekstraksiyonu takiben yapılan PCR'ın elektroforetik separasyonu

M= Marker, N=Negatif Kontrol, P=Pozitif Kontrol, Pozitif Şüpheli Örnekler 67, 69.



Şekil 4-2: Jelden ekstraksiyonu takiben yapılan PCR'ın elektroforetik seperasyonu

M= Marker, N=Negatif Kontrol, P=Pozitif Kontrol, Pozitif Örnekler 69, 71, 86, 59, 9, 11, 26
Negatif Örnek 67

4.2. ELISA Bulguları

ILTV spesifik antikorların varlığı yönünden ELISA ile incelenen 96 tavuk serumunun, 40 (% 41,67)' ı pozitif olarak saptandı.

Sero-pozitif 40 tavuk serumundan 22' sinin 10-106 haftalık yaşlar arasındaki yumurtacı tavuklara, 18' inin 20-40 günlük broyler tavuklara ait olduğu belirlendi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Kan serumu örnekleri alınan tavuklara ait ELISA bulguları

Kaynak	Yaş	Yetiştirme şekli	Örnek sayısı	Sero-pozitif tavuk sayısı	%
Bandırma	10-11 haftalık	Yumurtacı	15	1	
	20 günlük	Broyler	22	14	
İzmir	1 günlük	Broyler	5	0	
	40 günlük	Broyler	7	0	
	91 haftalık	Yumurtacı	9	2	
Afyon	100-102 haftalık	Yumurtacı	4	1	
	40 hafta	Yumurtacı	8	7	
	104-106 hafta	Yumurtacı	9	6	
	104 haftalık	Yumurtacı	7	5	
Bolu	20 günlük	Broyler	4	2	
	40 günlük	Broyler	6	2	
Toplam			96	40	

PCR ile trakealarında ILTV DNA' sı saptanan 14 tavuktan 6 (% 42.86)' sının kan serumunda ELISA ile antikor saptanırken, 8 tavuk serumunun sero-negatif olduğu belirlendi. Trakealarında PCR ile ILTV DNA' sı saptanmayan 82 tavuk serumundan 34 (% 41,46)' ü sero-pozitif saptandı. Yumurtacı sürülerden 4, broyler sürülerden 2 tavuk PCR ve ELISA ile pozitif bulundu (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Tavuklara ait PCR ve ELISA sonuçları

Kaynak	Yaş	No	PCR	ELISA	Kaynak	Yaş	No	PCR	ELISA
Bandırma	10-11 haftalık	1	-	-	İzmir	91 haftalık	50	-	-
		2	-	-			51	-	-
		3	-	-			52	+	-
		4	-	-			53	-	-
		5	-	-			54	-	-
		6	-	-			55	+	+
		7	-	+			56	+	-
		8	-	-			57	+	-
		9	+	-			58	+	+
		10	-	-			59	+	-
		11	+	-			60	-	-
		12	-	-			61	-	+
		13	-	-			62	-	-
		14	-	-			63	-	+
		15	-	-			64	-	-
Bandırma	20 günlük	16	-	+	Afyon	40 haftalık	65	-	+
		17	-	+			66	-	+
		18	-	-			67	-	+
		19	-	-			68	-	+
		20	-	-			69	+	+
		21	-	+			70	-	+
		22	-	-			71	+	-
		23	-	+			72	-	-
		24	-	+			73	-	+
		25	-	+			74	-	-
		26	+	+			75	-	+
		27	-	-			76	-	+
		28	-	+			77	-	+
		29	-	-			78	-	+
		30	-	+			79	-	+
		31	-	+			80	-	-
		32	-	+			81	-	+
		33	-	+			82	-	-
		34	-	-			83	-	+
		35	-	-			84	-	+
		36	-	+			85	-	+
		37	-	+			86	+	+
İzmir	1 günlük	38	-	-	Bolu	20 günlük	87	+	-
		39	-	-			88	-	-
		40	-	-			89	+	+
		41	-	-			90	-	+
		42	-	-			91	-	+
		43	-	-			92	-	-
	40 günlük	44	-	-		93	-	-	
		45	-	-		94	-	+	
		46	-	-		95	-	-	
		47	-	-		96	-	-	
		48	-	-					
		49	-	-					

+: pozitif, - : negatif

5. TARTIŞMA

Infectious laryngotracheitis (ILT), başta tavuklar olmak üzere sülün, tavus kuşu ve ördeklerde gelişme geriliği, yumurta veriminde azalma ve ölümlere neden olan, akut seyirli viral bir solunum yolu infeksiyonudur. Hastalık etkeninin, Herpesviridae familyasına ait, Alphaherpesvirinae alt familyasından Gallid herpesvirus 1 olduğu bildirilmiştir (7, 21, 22, 28, 36, 57).

ILT infeksiyonunun damlacık infeksiyonu şeklinde solunum yoluyla bulaştığı, vertikal yolla ise bulaşmanın olmadığı saptanmıştır (1, 7, 22). Bununla birlikte kontamine ekipman ve altlığın kullanımı ile mekanik yolla bulaşma olabileceği de vurgulanmıştır (7).

Ülkemizde ILT hakkında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ertürk ve ark. (17), 1933-1974 yılları arasında inceledikleri 531 kanatlı hayvandan, 5' inde ILT saptadıklarını bildirmişlerdir. Baysal ve ark. (8), Konya yöresinde 1983-1986 yılları arasında alınan 1161 serum örneğinden yalnızca birinde agar jel diffüzyon testi ile pozitiflik saptamışlardır. Babila ve ark. (3), Trakya yöresindeki bir kümeste bulunan tavuklarda AGP ile sero pozitiflik saptadıklarını bildirmişler ve bu çalışma sonucunda ILT' nin henüz sorun yaratacak düzeyde olmadığını vurgulamışlardır. Eröksüz ve ark. (17), patoloji laboratuvarlarına getirilen bir dövüş horozunda ILT olgusunu histolojik ve serolojik olarak tanımlamışlardır. Gülçatı ve ark. (27), Elazığ yöresinde bir bahçe tavuğu sürüsünde şekillenen salgın nedeniyle ölen 9 tavuktan aldıkları trakea örneklerini PCR ile incelemişler ve örneklerin tümünde (% 100) ILTV DNA' sını saptamışlar, 9 örneğin 8 (% 88.8)' inden ILTV izole edildiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmaların aksine gerek Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğünün (74), gerekse OIE (72)' nin web sayfalarında hastalığın ülkemizdeki durumu ile ilgili veri bulunmamaktadır. Ülkemizde kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde son 50 yılda görülen büyüme ve yetiştiriciliğin yapıldığı bölgelerdeki kanatlı populasyonlarında meydana gelen yoğunlaşmaya bağlı olarak yetiştiricilerden alınan bilgi ışığında hastalıktan şüpheli olgularda bir artış olduğu gözlenmektedir.

Bu araştırmada yukarıda sunulan bilgiler doğrultusunda, Bandırma, İzmir, Afyon ve Bolu yörelerinde yetiştirilen 11 ticari işletmedeki 52' si yumurtacı, 44' ü broyler olmak üzere toplam 96 tavuğa ait trakeal svap örneklerinden spesifik ILTV DNA' sının varlığı PCR ile, aynı tavuklardan alınan kan serumu örneklerinden spesifik ILTV antikorlarının varlığı ELISA ile incelenerek, hastalığın ülkemizdeki durumu hakkında bilgi elde edilmesi amaçlandı. Araştırmanın sonucunda, 96 tavuğun 14 (% 14,58)' ünde PCR ile ILTV DNA' sının, 40 (% 41,7)' unda ILTV spesifik antikorların saptanmış olması hastalığın artık sorun oluşturacak düzeylere ulaştığını göstermektedir.

Linares ve ark. (44), Kaliforniya' daki salgının kaynağının belirli sürelerde yumurtacılar uygulanan canlı aşı olabileceğini bildirmişlerdir. Wunderwald ve ark. (66), İsviçre' de damızlık süs tavuklarındaki salgının, bu ülkede ILTV aşısının yasak olması nedeniyle, infeksiyon kaynağının aşi suğu olmayacağını, büyük olasılıkla % 33.2 oranında sero-pozitiflik gösteren süs ve bahçe tavuklarının kaynak olabileceğini belirtmişlerdir.

Bu araştırmada İzmir' de yetiştirilen iki broyler sürüsü dışındaki dokuz sürüde ya PCR ile virus DNA' sı ya da ELISA ile spesifik antikorların saptanması incelenen yörelerde infeksiyonun belli bir oranda bulunduğunu ortaya koymuştur. Olası infeksiyon kaynakları araştırıldığında, ülkemizde ILTV aşısının ithali ve kullanımı olmadığından aşıdan kaynaklanan bulaşma olasılığının olamayacağı düşünölmektedir. Ancak bunun yanında, kaçak aşi kullanımının olabileceği ya da aşılı sürülerin yurda girişlerinin önlenmesine yönelik kontrollerde aksamalar olabileceği göz önüne alınırsa, yine de aşıdan kaynaklanan bir bulaşma riskinin varlığı göz ardı edilmemelidir.

Avrupa farmakopesinde (75), kanatlı aşılarınının birçok viral hastalık etkeninin yanısıra ILTV yönünden de serum nötralizasyon, ELISA ve fluoresans boyama yöntemleri ile test edilmesi ve ILTV' den ari olması gerektiği bildirilmektedir. Vögtlin ve ark. (63) da kanatlı sektöründe kullanılan aşıların ILTV ile kontamine olmasının hastalığın yayılmasında bir faktör olacağı görüşüne dayanarak, canlı ve inaktif aşılarda ILTV kontaminasyonunu saptamak amacıyla PCR tekniği geliştirmişlerdir. Ülkemizde kanatlı yetiştiriciliğinde kullanılan aşılardaki ILTV kontaminasyonun saptanmasına yönelik bir rapor bulunmamasına karşın, hastalığın yayılmasında bir risk oluşturabileceği düşünölmektedir.

ILTV' nin latent formunun trigeminal ganglionda bulunması ve hayvanların immun durumlarına bağlı olarak hastalığın tekrar ortaya çıkabilmesi nedeniyle, infekte sürülerin re-infeksiyon kaynağı olduğu kabul edilmektedir (22, 36). Hughes ve ark. (40), salgınların özellikle daha önceden infeksiyonun çıktığı kümeslerde ya da bu kümeslere yakın yerlere taşınan sürülerde görüldüğünü saptamışlardır. Araştırmacılar aynı zamanda yumurtlamaya başlamanın da taşıyıcı hayvanlarda ILTV' nin yayılımı üstünde önemli bir etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Ülkemizde, büyük ölçekli yetiştirmelerde yumurta üretiminin sürekli genç sürüler ile takviye edilmesi nedeniyle, yaşlı hayvanlar gençlerle birarada tutulmaktadır ve bu durum birçok infeksiyonun çıkmasında önemli rol oynamaktadır. ILTV infeksiyonunun yayılımında en önemli kaynaklardan biri de iyileşmiş ancak etkeni latent olarak taşıyan erişkin hayvanlar olacağından, bu araştırmada özellikle Afyon bölgesi olmak üzere bütün yumurtacı sürülerde hastalığın saptanmasının bir nedeninin de bu yetiştirme şekli olabileceği düşünülmektedir.

ILT aşısı uygulanan ülkelerde bile, yaşam süreleri kısa olduğu için broyler sürülerde aşılama tercih edilmemektedir. Bu araştırmada örneklerin alındığı broyler işletmelerinde “tüm hayvanların aynı anda işletmeye girdiği ve çıktığı” yetiştirme şekline uyulduğu için, farklı yaşlardaki hayvanlar bir arada bulunmamaktaydı. Bu nedenle pozitif hayvanların bulunduğu broyler sürülerinde bulaşmanın daha çok kontamine yem, malzeme ya da personel aracılığıyla olabileceği ağırlık kazanmaktadır.

ILTV' nin solunum yoluyla bulaşmasından sonraki 6-12 gün içerisinde klinik semptomların şekillendiği ve 10-14 gün sonra hayvanların kendiliğinden düzeldiği bildirilmiştir (5, 6, 15). Klinik bulgular infeksiyonun şiddetine bağlı olarak değişmekte olup, hastalığın hafif formunda sadece solunum baskılanmakta, şiddetli infeksiyonlarda ise asfeksi sonucu ölümlere varan sonuçlar gözlenebilmektedir (1, 6, 22, 65, 71). Linares ve ark. (44) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, tavuklarda ILT salgınında karakteristik bulguların aksine yalnızca trakeada mukus ve konjunktivit görüldüğü bildirilmiştir. Burns (11), 2001-2002 yıllarında Kaliforniya' da bulunan broyler sürülerinde ILTV' nin hafif formunu saptamıştır. Humberd ve ark. (41), solunum yolu hastalığı bulunan 24 nonspesifik trakeit olgulu tavuğun yalnızca 7' sinde ILTV DNA' sı saptadıklarını bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında, örneklerin alındığı bir günlük sürünün dışındaki tüm sürülerde çok düşük düzeyde solunum problemleri olduğu, sadece Bandırma yöresindeki 10-11 haftalık yumurtacı sürüde solunum baskılanması ve

gelişmede gerileme problemleri kaydedilmiştir. Bu nedenle Bandırma yöresindeki 10-11 haftalık yumurtacı sürü dışındaki sürülerde DNA' ları saptanan ILTV' lerin hafif enzootik forma neden olan suşlar olabileceği düşünülmüştür. Bu araştırmanın verileri, tavuk yetiştiriciliği yapılan yerlerde solunum problemi olan hayvanların ILT yönünden de incelenmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

ILT' nin tanısı amacıyla histopatolojik yöntemler, virus izolasyonu ve serolojik testler kullanılmakta olup, son yıllarda tanıda DNA prob-hibridizasyonu ve PCR gibi moleküler tanı yöntemlerine önem verilmeye başlanmıştır (1, 2, 37, 48, 50, 65, 71).

ILT' nin tanısında PCR kullanımının artmasını takiben, araştırmacılar tüm ILTV suşlarını saptayabilecek primer dizilimleri üzerinde çalışmalarını yoğunlaştırmıştır (2, 12, 13, 29). Alexander ve ark. (2), Ont 1598 suşunun SA-2 genine spesifik primerler dizilimlerinin farklı coğrafik bölgelerden izole edilen suşları saptayabildiğini ve bunun yanında salgınların erken tanısına yönelik PCR çalışmalarında da kullanılabilirliğini bildirmişlerdir. Vögtlin ve ark. (63), aşılardaki ILTV kontaminasyonu saptamak amacıyla yüksek korumalı bir bölgede bulunan p32 genine spesifik primerler kullanmışlardır. Ülkemizde ILT' nin PCR ile tanısıyla ilgili yalnızca bir çalışma (27) bulunmakta ve sekanslama ile ilgili herhangi bir araştırma bulunmadığından, bu çalışmada farklı ILTV suşlarını gözden kaçırmamak amacıyla Vögtlin ve ark. (63)' nin kullandıkları primer dizilimleri kullanılmıştır.

ILT' nin serolojik tanısı üzerine yapılan çalışmalar, ELISA' nın hastalığın erken dönemlerini saptamada yetersiz kaldığını, gerek doğal infeksiyonlarda gerekse deneysel infeksiyonlarda, infekte hayvanlarda antikor titrelerinin ELISA ile en erken 2 hafta sonra (ortalama 2-6 hafta) saptanabildiğini ortaya çıkarmıştır (16, 50, 51, 53). Bu çalışmada PCR ile ILTV DNA' sı saptanan 14 tavuğun 8 (% 57,1)' i sero-negatif olarak saptandı ve bu durum tavukların henüz hastalığın erken döneminde olabilecekleri için ELISA ile antikorların saptanamamış olduğu şeklinde yorumlandı.

Yapılan deneysel çalışmalar, ILTV' nin hastalığın erken dönemlerinde trakeada bol miktarda bulunduğunu, ancak yaklaşık 6. günden itibaren trigeminal ganglionlara yerleşmeye başladığını, bu durumun etkenin izolasyonu açısından sorun yaratabileceğini vurgulamaktadır. Bu çalışmada PCR ile ILTV DNA' sı saptanmayan 82 tavuğun 34 (% 41.46)' ünde spesifik antikorların saptanması, bu sürülerde hastalığın akut döneminin geçmiş olabileceğinin bir göstergesi olarak düşünülmüştür.

Bu araştırmada, üçü yumurtacı ikisi de broyler sürülerden olmak üzere, toplam beş sürüde hem PCR hem de ELISA ile pozitif hayvanların saptanması sürü içinde hastalığın yayılmakta olduğuna işaret etmektedir.

Sürü bazında yapılacak değerlendirmede incelenmiş olan 11 sürüden 10'unda ILTV saptanmıştır.

Bu tez çalışmasında, PCR ve ELISA yöntemleri kullanılarak Türkiye' de ILTV' nin varlığı farklı bölgelerde saptanmıştır. Bu bulguların ışığında, hastalığın kaynağının belirlenmesine yönelik çalışmaların yanısıra latent infekte sürülerin saptanması amacıyla, serolojik taramaları takiben pozitif saptanan hayvanların trigeminal ganglionlarından virus izolasyonu ya da PCR ile ILTV DNA' sının saptanmasına yönelik çalışmaların da hastalıkla mücadele programı içerisinde yer alması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Abbas, F., Anderson, Jr., J.R. (1996), omparison of diagnostic tests for Infectious Laryngotracheitis. *Avian Diseases*, **40**, 290-295.
2. Alexander, H.S., Key, D.W., Nagy, E. (1998), Analysis of Infectious Laryngotracheitis Virus Isolates from Ontario and New Brunswick by the Polymerase Chain Reaction. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **62**, 68-71.
3. Babila, A., Ası, Y., Akçadağ, B., Gürel, A. (1988), İstanbul ve Trakya Bölgesi Kümes Hayvanlarında Inf. Bronchitis (IB), Inf. Şaryngotracheitis (ILT), Bursal Disease (IBD), Egg Drop Sendrom (EDS-76), Avian Encephalomyelitis (AE) ve Adenovirus Enfeksiyonlarının Epizootiolojik Araştırılması ve İzolasyon Çalışmaları. *Pendik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **19**, 66-77.
4. Bauer, B., Lohr, J.E., Kaleta, E.F. (1999), Comparison of commercial ELISA test kits from Australia and the USA with the serum neutralization test in cell cultures for the detection of antibodies to the infectious laryngotracheitis virus of chickens. *Avian Pathology*, **28**, 65-72.
5. Bagust, T.J. (1986), Laryngotracheitis (Gallid-1): Herpesvirus Infection in the chicken 4. Latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus. *Avian Pathology*, **15**, 581-595.
6. Bagust, T.J., Johnson, M.A. (1995), Avian infecitous laryngotracheitis: virus-host interactions in relation to prospects for eradication. *Avian Pathology*, **24**, 373-391.
7. Bagust, T.J., Guy, J.S., Laryngotracheitis. İçinde Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald, L.R., Saif, Y.M., editör. *Diseases of Poultry, Tenth edition*. Ames, Iowa, USA, Iowa State University Press; 1997.
8. Baysal, T., Bozkıran M. (1989), Konya Bölgesi Kümes Hayvanlarında Infectious Bronchitis (IB), Infectious Laryngotracheitis (ILT), Infectious Bursal Disease (IBD), Egg-Drop-Syndrom-76 (EDS-76), Avian Encephalomyelitis (AE) ve Adenovirus Enfeskiyonlarının Epizootiolojik Araştırılması ve İzolasyon Çalışmaları. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, **6**, 4, 67-78.
9. Beltrao, N., Furian, T.Q., Souza, G.F., Macagnan, M., Fallavena, L.C.B., Canal, C.W. (2003), Laryngotracheitis: reproducibility of the disease and comparison of diagnostic methods. *Brazilian Journal of Microbiology*, **34**, 72-73.

10. Butcher, G.D., Jacob, J.P., Mather, F.B. University of Florida IFAS Extension. İçinde Butcher, G.D. editör. *Common Poultry Diseases*, University of Florida: 2003
11. Burns, K.E., The Poultry Informed Professional. İçinde Hofacre, C., editör. *The Poultry Informed Professional, Issue 71*. Georgia, USA, University of Georgia Department of Avian Medicine, 2003.
12. Callison, S.A., Riblet, S.M., Oldoni, I., Sun, S., Zavala, G., Williams, S., Resurrection, R.S., Spackman, E., Garcia, M. (2007), Development and validation of a real-time Taqman PCR assay for the detection and quantitation of infectious laryngotracheitis virus in poultr. *Journal of Virological Methods*, **139**, 31-38.
13. Chang, P.C., Lee, Y.L., Shien, J.H., Shieh, H.K. (1997), Rapid differentiation of vaccine strains and field isolates of infectious laryngotracheitis virus by restriction fragment length polymorphism of PCR products. *Journal of Virological Methods*, **66**, 179-186.
14. Chang, P.C., Shieh, H.K., Shien, J.H., Kang, S.W. (2000), A homopolymer stretch composed of variable numbers of cytidine residues in the terminal repeats of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Diseases*, **44**, 125-131.
15. Chang, P.C., Chen, K.T., Shien, J.H., Shieh, H.K. (2002): Expression of infectious laryngotracheitis virus glycoproteins in escherichia coli and their application in enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Diseases*, **46**, 570-580.
16. Davison, S., Smith, G., Eckroade, R.J. (1988), Laryngotracheitis in chickens: The length of the preinfectious and infectious periods. *Avian Diseases*, **33**, 18-23.
17. Ertürk, E., Pamukçu, A.M. (1974), 1993-1974 yılları arasında Ankara ve yöresinde kanatlı hayvanlarda raslanan hastalık ve tümör olayları. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **21**, 13-20.
18. Eröksüz, H., Özer, H., Metin, N., Muz, A. (1994), Bir döğüş horozunda infectious laryngotracheitis olgusu. *Firat Üniversitesi Bilim Dergisi*, **8**, 89-95.
19. Fahey, K.J., York, J.J. (1990), The role of mucosal antibody in immunity to infectious laryngotracheitis virus in chickens. *Journal of General Virology*, **71**, 2401-2405.
20. Fuchs, W., Ziemann, K., Teifke, J.P., Werner, O., Mettenleiter, T.C. (2000), The non-essential UL50 gene of avian infectious laryngotracheitis virus encodes a functional dUTPase which is not a virulence factor. *Journal of Virology*, **81**, 627-638.

21. Fuchs, W., Wiesner, D., Veits, J., Teifke, J.P., Mettenleiter, T.C. (2005), In vitro and in vivo relevance of infectious laryngotracheitis virus gJ proteins that are expressed from spliced and nonspliced mRNAs. *Journal of Virology*, **79**, 705-716.
22. Fuchs, W., Veits, J., Helferich, D., Granzow, H., Teifke, J.P., Mettenleiter, T.C. (2007), Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis. *Veterinary Research*, **38**, 261-279.
23. Fulton, R.M., Schrader, D.L., Will, M. (2000), Effect of route of vaccination on the prevention of infectious laryngotracheitis in commercial egg-laying chickens. *Avian Diseases*, **44**, 8-16.
24. Garcia, M., Riblet, S.M. (2001), Characterization of infectious laryngotracheitis virus isolates: Demonstration of viral subpopulations within vaccine preparations. *Avian Diseases*, **45**, 558-566.
25. Gillingham, S. (2003), Infectious Laryngotracheitis. *Zootecnica International, March*, 48-54.
26. Goodwin, M.A., Smeltzer, M.A., Brown, J., Resurrection, R.S., Dickson, T.G. (1991), Comparison of histopathology to the direct immunofluorescent antibody test for the diagnosis of infectious laryngotracheitis in chickens. *Avian Diseases*, **35**, 389-391.
27. Gulcati, I., Eroksuz, Y., Bulut, H. (2007), Outbreak of clinical infectious laryngotracheitis in Turkey. *Veterinary Record*, **160**, 554-555.
28. Guy, J.S., Barnes, H.J., Smith, L.G. (1992), Rapid diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure. *Avian Pathology*, **21**, 77-86.
29. Han, M.G., Kim, S.J. (2001), Analysis of Korean strains of infectious laryngotracheitis virus by nucleotide sequences and restriction fragment length polymorphism. *Veterinary Microbiology*, **83**, 321-331.
30. Han, M.G., Kweon, C.H., Mo, I.P., Kim, S.J. (2002), Pathogenicity and vaccine efficacy of a thymidine kinase gene deleted infectious laryngotracheitis virus expressing the green fluorescent protein gene. *Arch Virol*, **147**, 1017-131.
31. Hanson, L.E., Laryngotracheitis. İçinde Hofstad, M.S., Barnes, H.J., Calnek, B.W., Reid, W.M., Yoder, H.W., editör. *Diseases of Poultry, Eight edition*. Ames, Iowa, USA, Iowa State University Press; 1984.

32. Hayashi, S., Odagiri, Y., Kotani, T., Horiuchi, T. (1985), Pathological changes of tracheal mucosa in chickens infected with infectious laryngotracheitis virus. *Avian Diseases*, **29**, 943-950.
33. Hayles, L.B., Macdonald, K.R., Newby, W.C., Wood, C.W., Gilchrist, E.W., MacNeill A.C. (1976), Epizootiology of Infectious Laryngotracheitis in British Columbia 1971-1973. *Canada Veterinary Journal*, **17**, 101-108.
34. van der Heide, L., Chute, H.L., O'Meara, D.C. (1966), A comparative investigation of the course of an experimental infection with infectious laryngotracheitis in chickens. 38th Northeast Conference on Avian Diseases, Newark, Delaware, 149-153.
35. Hengen, P.N. (1994), Methods and reagents – Recovering DNA from agarose gels. *Trends in Biochemical Science*, **19**, 388-389.
36. Hidalgo H. (2003), Infectious Laryngotracheitis: A Review. *Brazilian Journal of Poultry Science*, **5-3**, 157-168.
37. Hitchner, S.B., Fabrieant, J., Bagust, T.J. (1976), A fluorescent-antibody study of the pathogenesis of Infectious Laryngotracheitis. *Avian Diseases* **21**, 185-194.
38. Hughes, C.S., Jones, R.C., Gaskell, R.M., Jordan, F.T.W., Bradbury, J.M. (1987), Demonstration in live chickens of the carrier state in infectious laryngotracheitis. *Research in Veterinary Science*, **42**, 407-410.
39. Hughes, C.S., Gaskell, R.M., Jones, R.C., Bradbury J.M., Jordan, F.T.W. (1989), Effects of certain stress factors on the re-excretion of infectious laryngotracheitis virus from latently infected carrier birds. *Research in Veterinary Science*, **46**, 274-276.
40. Hughes, C.S., Gaskell, R.M., Bradbury J.M., Jordan, F.T.W., Jordan, R.C. (1991), Survey of field outbreaks of avian infectious laryngotracheitis in England and Wales. *The Veterinary Record* **21**, 258-260.
41. Humberd, J., Garcia, M., Riblet, S.M., Resurreccion, R.S., Brown, T.P. (2002), Detection of Infectious Laryngotracheitis Virus in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues by Nested Polymerase Chain Reaction. *Avian Diseases*, **46**, 64-74.
42. Kingsley, D.H., Keeler, Jr., C. (1999), Infectious Laryngotracheitis Virus, an Alpha Herpesvirus That Does Not Interact with Cell Surface Heparan Sulfate. *Virology*, **256**, 213-219.

43. Keeler, Jr., C.L., Kingsley, D.H., Burton, C.R.A. (1991), Identification of the Thymidine Kinase Gene of Infectious Laryngotracheitis Virus. *Avian Diseases*, **35**, 920-929.
44. Linares, J.A., Bickford, A.A., Cooper, G.L., Charlton, B.R., Woolcock, P.R. (1994), An Outbreak of Infectious Laryngotracheitis in California Broilers. *Avian Diseases*, **38**, 188-192.
45. Lüscho, D., Werner, O., Mettenleiter, T.C., Fuchs, W. (2001), Protection of chickens from lethal avian influenza A virus infection by live-virus vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing the hemagglutinin (H5) gene. *Vaccine*, **19**, 4249-4259.
46. Mirande, A. (1994), A brief review – infectious laryngotracheitis. *Zootecnica International*, July, 64-69.
47. Mutalib, A. (1992), Studies on transmissibility of a tissue-culture-modified laryngotracheitis virus. *Journal of Veterinary Diagnostics Investigation*, **4**, 412-415.
48. Nagy, E. (1992), Detection of Infectious Laryngotracheitis Virus Infected Cells with Cloned DNA Probes. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **56**, 34-40.
49. Ohkubo, Y., Shibata, K., Mimura, T., Takashima, I. (1988), Labeled Avidin-Biotin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Antibody to Infectious Laryngotracheitis Virus in Chickens. *Avian Diseases*, **32**, 24-31.
50. Pang, Y., Wang, H., Girshick, T., Xie, Z., Khan, M.I. (2002), Development and Application of a Multiplex Polymerase Chain Reaction for Avian Respiratory Agents. *Avian Diseases*, **46**, 691-699.
51. Poulsen, D.J., Thureen, D.R., Keeler, Jr., C.L. (1997), Comparison of Disease Susceptibility and Resistance in Three Lines of Chickens Experimentally Infected with Infectious Laryngotracheitis Virus. *Journal Series of the Delaware Agricultural Experiment Station*, **1622**, (17-21).
52. Purcell, D.A. (1971), Histopathology of Infectious Laryngotracheitis in Fowl infected by aerosol. *Journal of Comparative Pathology*, **81**, 421-431.
53. Robertson, G.M., (1976), The effect of Infectious Laryngotracheitis Virus on the Bursa of Fabricius of Young Chickens. *Journal of Comparative Pathology*, **86**, 423-434.
54. Russel, R.G., (1983), Respiratory Tract Lesions from Infectious Laryngotracheitis Virus of Low Virulence. *Veterinar Pathology*, **20**, 360-369.

55. Russel, R.G., Turner, A.J. (1983), Characterization of Infectious Laryngotracheitis Viruses, Antigenic Comparison by Kinetics of Neutralization and Immunization Studies. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, **47**, 163-171.
56. Sofer, G. (2003), Virus Inactivation in the 1990s and into the 21st Century. *BioPharm International*, 44-71.
57. Thureen, D.R., Keeler, Jr., C.L. (2006), Psittacid Herpesvirus 1 and Infectious Laryngotracheitis Virus: Comparative Genom Sequence Analysis of Two Avian Alphaherpesviruses. *Journal of Virology*, **80**:16, 7863-7872.
58. Timurkaan, N., Yilmaz, F., Bulut, H., Özer, H., Bolat, Y. (2003), Pathological and Immunohistochemical Findings in Broilers Inoculated with a Low Virulent Strain of Infectious Laryngotracheitis Virus. *Journal of Veterinary Science*, **4**, 175-180.
59. Xie, H., Newberry, L., Clark, F.D., Huff, W.E., Huff, G.R., Balog, J.M., Rath, N.C. (2002), Changes in Serum Ovotransferrin Levels in Chickens with Experimentally Induced Inflammation and Disease. *Avian Diseases*, **46**, 122-131.
60. Vanderkop, M., (1990), Infectious laryngotracheitis in a flock of layers. *Canadian Veterinary Journal*, **31**, 780.
61. Veits, J., Lüscho, D., Kindermann, K., Werner, O., Teifke, J.P., Mettenleiter T.C., Fuchs, W. (2003), Deletion of the non-essential UL0 gene of infectious laryngotracheitis (ILT) virus leads to attenuation in chickens, and UL0 mutants expressing influenza virus haemagglutinin (H7) protect against ILT and fowl plague. *Journal of General Virology*, **84**, 3343-3352.
62. Veits, J., Mettenleiter, T.C., Fuchs, W. (2003), Five unique open reading frames of infectious laryngotracheitis virus are expressed during infection but are dispensable for virus replication in cell culture. *Journal of General Virology*, **84**, 1415-1425.
63. Vöglin, A., Bruckner, L., Ottiger, H-P. (1999), Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of vaccine contamination by infectious laryngotracheitis virus. *Vaccine*, **17**, 2501-2506.
64. Williams, R.A., Bennet, M., Bradbury, J.M., Gaskell, R.M., Jones, R.C., Jordan, F.T.W. (1992), Demonstration of sites of latency of infectious laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology*, **73**, 2415-2420.
65. Williams, R.A., Savage, C.E., Jones, R.C. (1994), A comparison of direct electron microscopy, virus isolation and a DNA amplification method for the detection of

- avian infectious laryngotracheitis virus in field material. *Avian Pathology*, **23**, 709-720.
66. Wunderland, C., Hoop, R.K. (2002), Serological monitoring of 40 Swiss fancy breed poultry flocks. *Avian Pathology*, **31**, 157-162.
67. Yılmaz, F., Timurkaan, N., Bulut, H. (2004), Detection of infectious laryngotracheitis virus in trigeminal ganglia by avidin-biotin complex method in chickens: Short communication. *Acta Veterinaria Hungarica*, **52**, 167-171.
68. York, J.J., Fahey, K.J. (1988), Diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody ELISA. *Avian Pathology*, 173-182.
69. Ziemann, K., Mettenleiter, T.C., Fuchs, W. (1998), Gene Arrangement within the Unique Long Genome Region of Infectious Laryngotracheitis Virus Is Distinct from That of Other Alphaherpesviruses. *Journal of Virology*, 847-852.
70. Zellen, G.K., Weber, L.J., Martin, S.W. (1984): Infectious Laryngotracheitis in the Niagara Peninsula: A Case Control Study. *Can Vet J*, **25**, 75-77.
71. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th edition, 2004. Chapter 2.7.7. Avian Infectious Laryngotracheitis.
72. Oficina Internationale Epizootica (2007, Nisan), *HANDISTATUS II*. Erişim 12.06.2007, http://www.oie.int/hs2/sit_mald_freq_pl.asp?c_cont=4&c_mald=85
73. Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü (2007), *OIE Hastalık Raporları*: Erişim 15.06.2007, ftp://ftp.kkgm.gov.tr/AB/Hayv-Sagl/OIE_HASTALIK_RAPORLARI/.
74. Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü (2007), *Kasaplık canlı tavuk, etleri ve yumurtalarının ithalatında kontrol belgesi alınabilmesi için gerekli şartlar hakkında tebliğ*. Erişim 09.07.2007, <http://www.kkgm.gov.tr/teblig/2000-3.html>.
75. European Pharmacopoeia, 5th Edition (Haziran, 2004), İçinde 2.6.24 *Avian viral vaccines: tests for extraneous agents in seed lots*, Council of Europe, Strasbourg. *European Treaty Series No. 50*, 2, 177-180.

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

TELİF HAKKI İZİNİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Demir	Soyadı	Özdemir
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	11.09.1978
Uyruğu	TC	TC Kim No	13571593802
Email	demirozdemir@hotmail.com	Tel	0 532 333 72 29

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü. Sağlık Bilimleri	
Yük.Lis.	İ.Ü. Veteriner Fakültesi	2001
Lisans		
Lise	Sabri Çalışkan Lisesi	1995

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	İhracat Ürün Müdürü	Bayer Türk Hayvan Sağlığı	2004 -
2.	Ruhsatlandırma Sorumlusu	İbrahim Etem Ulagay Hayvan Sağlığı	2003 - 2004
3.	Ürün Müdürü	Polimed İlaç ve Tavukçuluk LTD. ŞTİ	2000 - 2003

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		217 TEOFL
Rusça	Zayıf	Zayıf	Orta		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	54.040	54.517	54.993
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Windows	Çok iyi
Office Araçları	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Fotoğraf çekmek, balık tutmak, yelken, felsefe.

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız