

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YUMURTACI TAVUKLARDA INFECTIOUS BURSAL  
DISEASE'E (IBD) KARŞI UYGULANAN AŞILAMA  
PROGRAMLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

**Ahmet BİLDİR**

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Sibel GÜR**

**Tez No:2008-022**

**2008 - AFYONKARAHİSAR**

**KABUL ve ONAY**

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Viroloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
**Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.  
Tez Savunması Tarihi: 25.04.2008



Yrd. Doç. Dr. Sibel GÜR  
ÜYE

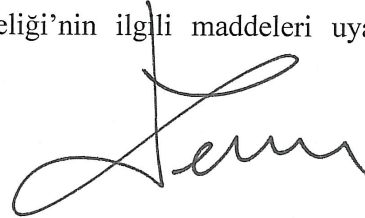


Yrd. Doç. Dr. Alper SEVİMLİ  
ÜYE



Yrd. Doç. Dr. Esra ŞEKER  
ÜYE

Viroloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı öğrencisi Ahmet BİLDİR'in  
"Yumurtacı Tavuklarda Infectious Bursal Disease'e (IBD) Karşı Uygulanan  
Aşılama Programlarının Karşılaştırılması" başlıklı tezi 05/05/2008 günü saat.11.. 'de  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca  
değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Yavuz DEMİR  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Enfeksiyöz Bursal Hastalık (IBD) enfeksiyonu, Birnaviridae familyasına bağlı Avibirnavirus tarafından meydana getirilen ve beyaz-sulu ishal, iştahsızlık, tüylerde karışıklık, titreme, depresyon ve ölüm ile karakterize bir enfeksiyon olup, tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir. Konakçı spektrumunda başlıca tavuklar bulunmaktadır.

Enfeksiyonun Türkiye’de varlığı 1978’den beri bilinmektedir ve salgın olgularında önemli ölçüde ekonomik kayba yol açmaktadır. Enfeksiyon ile mücadelede kullanılan en önemli yöntem aşı uygulamasıdır.

Bu çalışmada, ticari sürülerde IBD için uygulanan farklı aşılama programlarına bağlı olarak şekillenen antikor titre değişimi ile enfeksiyonun klinik olarak görüldüğü sürülerde aşılama programlarında değişik yapılmasının enfeksiyonun önlenmesindeki etkisi incelenmiştir.

Bu araştırmanın gerçekleşmesinde büyük katkısı olan danışman hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Sibel GÜR’e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca mesleki anlamda beni yetiştiren, her konuda olduğu gibi tez kapsamında kullandığım ELISA kitinin finansmanında da benden yardımlarını esirgemeyen Kartallar Tarım Ürünleri Ve Tavukçuluk San. Tic. Ltd. Şti.’ne ve yine bu şirkette görev yapan ve tezimin önemli bölümünü oluşturan serolojik testlerin uygulanması konusunda, bana yardımcı olan Sayın Uzman Veteriner Hekim Gülay ÖZKAYNAK’a saygı ve şükran duygularımı koruyacağım.

Numune toplama konusunda bana işletmelerini açan, Afyonkarahisar tavukçuluk sektöründen; Akıncı Tavukçuluk, İşlek Gıda, Haydar KAYA, Mahmut KARCI ve İlhan BİÇİCİ’ye teşekkürü bir borç bilmekteyim.

Tezimin hazırlanması esnasında manevi desteklerini hiç eksik etmeyen ve varlıkları ile bana destek olan başta sevgili eşim Elvan Demirel BİLDİR, annem Münevver BİLDİR ve babam Mustafa BİLDİR’e teşekkür ediyorum ve bu çalışmayı sevgili aileme ithaf ediyorum.

Veteriner Hekim  
Ahmet BİLDİR

**İÇİNDEKİLER**

Kabul ve Onay Sayfası	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve kısaltmalar	vi
Grafikler	vii
Resimler	viii
Özet	ix
Summary	x
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>1</b>
1.1. Tanım	1
1.2. Tarihçe	1
1.3. Etiyoloji	3
1.4. Epizootiyoloji	5
1.5. Patogenez	7
1.6. Semptomlar	9
1.6.1. Otopsi Bulguları	10
1.7. Teşhis	11
1.7.1. Laboratuvar teşhisi	11
1.7.1.1. Direkt Teşhis	11
1.7.1.2. İndirekt Teşhis	12
1.7.2. Ayırıcı Teşhis	13
1.8. Sağaltım	14
1.9. Koruma ve Kontrol	14
1.9.1. Deventer Formülü İle Optimal Aşılama Zamanının Saptanması	16
1.9.2. Aşılama Etkinliğini İnterfere Eden Faktörler	20
1.9.2.1. Aşı İle İlgili Faktörler	20
1.9.2.2. Aşının Kanatlıya Uygulanması	21
1.9.2.3. Kanatlıya Bağlı Endojen Faktörler	22
1.10. Amaç	24

<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>25</b>
2.1. Materyal ve Metot	25
2.1.1. Materyal	25
2.1.1.1. Hayvan materyali ve örnekleme	25
2.1.2. Metot	26
2.1.2.1. ELISA testi	26
<b>3. BULGULAR</b>	<b>27</b>
3.1. ELISA testi	27
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>34</b>
KAYNAKLAR	41

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

AAF:	Allanto-Amniyotik Sıvı
AC-ELISA:	Antigen-Capture Enzyme Linked Immunosorbent Assay
AGID:	Agar Gel Immunodifuzyon
AGP:	Agar Gel Precipitation
BGM-70:	Baby Grivet Monkey-70
CAM:	Koriyoallantoik Membran
CAV:	Chicken Anemia Virus
CEF:	Chicken Embryo Fibroblast
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ETY:	Embriyolu Tavuk Yumurtası
IBD:	Infectious Bursal Disease
IBDV:	Infectious Bursal Disease Virus
Ig:	İmmunglobulin
kD:	Kilodalton
MDA:	Mother Delivered Antibody
MDV:	Marek Disease Virus
Nm:	Nanometre
OD:	Optical Density
OIE:	Office International des Epizooties
PCR:	Polimeraz Chain Reaction
RE:	Restriksiyon Endonukleaz
RNA:	Ribonükleik asit
RT/PCR-RFLP:	Reverse Transcription/Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism
RT-PCR:	Reverz Transkripsiyon-Polimeraz Chain Reaction
SN:	Serum Nötralizasyon
SPF:	Specific Pathogen Free
VNT:	Virus Nötralizasyon Testi
VP:	Viral Protein
vvIBDV:	Very Viral Infectious Bursal Disease Virus

**GRAFİKLER**

<b>Grafik 1:</b> 1. Sürü / Hy-Line Brown	27
<b>Grafik 2:</b> 2. Sürü / Hy-Line White	31
<b>Grafik 3:</b> 3. Sürü / Nick Brown	31
<b>Grafik 4:</b> 4. Sürü / Lohmann Brown	32
<b>Grafik 5:</b> 5. Sürü / Bowans White	32
<b>Grafik 6:</b> 6. Sürü / Lohmann LSL	33

## RESİMLER

<b>Resim 1:</b> Sağlıklı (Solda) ve hastalığa yakalanmış piliçler. (1. Sürü)	29
<b>Resim 2:</b> Beyaz ve sulu ishal. (1. Sürü)	29
<b>Resim 3:</b> Bacak ve göğüs kaslarında hemoraji odakları. (1. Sürü)	30
<b>Resim 4:</b> Rengi normale göre açılmış böbrekler ve büyümüş Bursa Fabricius. (1. Sürü)	30



## ÖZET

Infectious Bursal Disease (IBD) tavukların en önemli viral enfeksiyonlarından biridir ve kontrol programının esasını özellikle erken dönemlerde rutin uygulanan aşılama oluşturur. Bu çalışmada, Afyonkarahisar ilinde Hy-line Brown, Hy-line W-36, Nick Brown, Lohmann Brown, Lohmann Lsl ve Bowans White ırklarının yetiştirildiği 6 adet ticari yumurtacı tavuk çiftliğinde yetiştirilen hayvanlarda IBD antikor değişimi izlendi. Bu amaçla, 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 ve 70 günlerde kan örnekleri alındı ve her grupta 10 civciv örneklendi. Ek olarak, sürü 1 çıkan salgın nedeniyle 2 kez daha örneklendi ve toplam olarak 680 kan örneği elde edildi. Serum örnekleri, IBD spesifik antikor varlığı ve titre değerlerinin belirlenmesi için indirekt IBD ELISA test ile kontrol edildi.

Çalışılan sürülerde iki farklı aşılama yöntemi kullanıldı; birinci grupta, ilk aşılama için inaktif aşı seçildi, ikinci uygulama 11-14. günlerde canlı aşı kullanılarak yapıldı ve 2 kez daha canlı rapel uygulaması yapıldı. Normal şartlar altında bu program önerilmektedir. İkinci grupta, 3 çiftlikte aşılama 6-8. günlerde yapılan canlı aşı ile başlandı ve 7 ile 11. günlerde inaktif uygulamayla devam edildi ve 14-22. günlerde 2 canlı aşı yapılması ile bitirildi.

Aşı programı, yönetim şartları ve antikor titre değişim grafikleri incelendiğinde, salgın riski olan çiftliklerde ikinci uygulama açık bir şekilde daha etkili bulunmuştur. Bu çalışmanın bir diğer bulgusu da, manipülatif uygulamaların antikor artışını negatif etkilediğidir.

**Anahtar Kelimeler:** Antikor, Aşılama, ELISA, Infectious Bursal Disease, Virus.

## SUMMARY

Infectious Bursal Disease (IBD) was one of the important viral infection in chickens and control programme has mainly bound to routine vaccination especially in early life. In this study, IBD antibody titer changes were observed in 6 commercial layer herds that rearing Hy-line Brown, Hy-line W-36, Nick Brown, Lohmann Brown, Lohmann Lsl and Bowans White, in Afyonkarahisar province. For this purpose, blood samples were obtained in 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 and 70 days, and 10 chickens were sampled in every group. In addition, herd 1 was sampled two more times due to epidemic. As totally, 680 blood samples were obtained. An indirect IBDV ELISA test was preferred to control of the serum samples for IBDV specific antibody presence and titer values.

Two different vaccination styles were applied in studied farms; in the first group, an inactivated vaccine was chosen for the first vaccination, a second application was performed in 11-14 days using a live vaccine and live rapel applications were used two more times. In normal conditions, this programme has been proposed. In the second group, vaccination was started with live vaccines in 3 farms in the 6-8 days, and continued with an inactivated application in 7 to 11 days, and finished with two more live vaccinations during 14 to 22 days.

In the evaluation of the vaccination program, management conditions and the graphic of antibody titer changes, it is obvious that the second application has been detected more effective in the farms that have a risk for epidemic. As another finding of this study, manipulative performances have been affecting negatively of the antibody increase.

**Key Words:** Antibody, ELISA, Infectious Bursal Disease, Vaccination, Virus.

**TEZ METNİ**

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

### 1.1. Tanım

İnfeksiyöz Bursal Hastalık (Infectious Bursal Disease-IBD), her yaştaki tavukları etkilemekle birlikte, özellikle yeni doğanlar için tehlikeli kabul edilebilecek çok bulaşıcı viral bir enfeksiyondur. Hastalık ilk kez Amerika'daki Gumboro bölgesinde görülmesi sebebiyle "Gumboro Hastalığı" olarak da adlandırılmıştır (1). Etken birçok organ sistemini etkilemekle birlikte, en önemli bozukluklar lenfoid organlarda şekillenmektedir. Bursa Fabricius'taki değişiklikler ise tipiktir.

Enfeksiyon nedeniyle oluşan ekonomik kayıplar temel olarak iki faktöre bağlıdır; birincisi 3 haftalık ve daha büyük yaştaki hayvanlarda görülen akut enfeksiyon ve ölümler, ikincisi de daha erken yaşta enfekte olan kanatlılarda görülen immunsupresyondur (1). Virusun olgunlaşmamış B lenfositlerine affinitesi vardır, ölmeyen hayvanlarda immunsupresyon bir süre daha devam etmektedir ve bu nedenle sekonder enfeksiyonlara duyarlılık artmakta ve aşılama sonucunda yetersiz immun yanıt şekillenmektedir (2). Genç civcivler yetişkinlere göre çok daha duyarlı olduklarından korunmaları önceliklidir, her ne kadar maternal antikolar yaşamın ilk günlerinde koruyuculuk sağlarsa da, immunize edilmeleri büyük önem taşımaktadır. IBD virusu bir zoonoz olmadığı için halk sağlığı konusunda sorun teşkil etmemektedir (1).

### 1.2. Tarihçe

Infectious Bursal Disease (IBD) dünyada ilk kez Amerika'nın Delaware eyaletini Gumboro bölgesinde 1962 yılında (3) tespit edilmiş ancak enfeksiyonun 1957'den beri var olduğu belirlenmiştir. Hastalığın diğer adı ise "Gumboro"dur. İki-üç haftalık civciv ve piliçlerde bilinen semptomlar ile geçici immunsupresyon tespit edilmiştir.

Enfekte olan kanatlıların böbreklerinin de yoğun olarak etkilenmesi nedeniyle, araştırmacı hastalığın 'Kanatlı Nefrozisi' olarak isimlendirilmesini önermiştir.

IBD için ilk aşı çalışmaları ise 1968'de yapılmış, saha izolatlarının SPF yumurtalarda pasajlanması ile elde edilen aşı sahada yaygın olarak kullanılmıştır (4).

Daha sonra 1980'lerde hastalığın karakter değiştirdiği gözlenmiş, yaşamının ilk haftalarında enfekte olan piliçlerde bursanın atrofiye olduğu ve sublinik immunsupresyon varlığı belirlenmiş, deri ile birlikte gastrointestinal ve solunum sisteminin de etkilendiği görülmüştür (5). Sonraki yıllarda bursal atrofinin daha hızlı Őekillendiđi, immunsupresyon, ağırlık kaybı ve ishal gibi semptomların daha Şiddetli olduğu ve enfeksiyondan sonra maternal immunitenin hızla kaybolduğu yeni varyant suşlar ortaya çıkmıştır. Leghorn ırkı tavuklarda %100 morbidite ve %90 mortalitenin meydana geldiği salgınlar görülmüştür (5). Patogenez ile ilgili çalışmalarda, kloakal bursada spesifik patognomonik lezyonlara yol ağtığı için enfeksiyonun adının 'İnfeksiyöz Bursal Hastalık' olması önerilmiştir (6).

Enfeksiyon 1960'lı yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'nin (ABD) birçok bölgesini etkilemiştir (4) ve 1962 ile 1971 yılları arasında Avrupa Kıtası'na da ulaşarak (7), yayılmaya devam etmiştir. Enfeksiyonun varlığı Güney ve Batı Afrika, Hindistan, Uzak Doğu ve Avustralya'da bildirilmiştir (8, 9). Office International des Epizooties'in 1995 yılında yaptığı bir araştırmada (10), incelenen 65 ülkenin %95'inde enfeksiyonun varlığı ortaya konulmuştur. Bu güne kadar tespit edilen iki serotip minimum kros koruma sağlamaktadır ve sadece tip 1 patojeniktir. Amerika, Batı Avrupa ve Asya'nın bazı bölgelerinde 1990'lardan itibaren tip 1'in çok virulent suşları ortaya çıkmıştır ve bu suşlarda mortalite %50'nin üstüne çıkabilmektedir.

IBD virusunun varlığı Türkiye'de ilk kez 1978'de bir broyler sürüsünde belirlenmiş, etken hem serolojik hem de virolojik olarak tespit edilmiştir (11). Sonraki çalışmalarda başka bölgelerde de virus izolasyonu gerçekteşirilmiştir (12), aşısız sürülerde yapılan serosurvey çalışmalarında, enfeksiyonun Konya ve çevresinde % 31.3 (13), İstanbul bölgesinde % 78.2 (14), Ankara ve çevresinde

% 63.5 (15) oranında varlığı belirlenmiştir. Türkiye'de izole edilen çok virulent IBDV'lerin karşılaştırmalı analizini gerçekleştiren Türe ve Çöven (16), izolatların antijenik olarak benzer olduğunu göstermişlerdir. IBD, Türkiye'de tavuk yetiştiriciliğinin en önemli problemlerinden biri olma özelliğini korumaktadır.

### 1.3. Etiyoloji

IBD virusu (IBDV), Avibirnavirus genusunun Birnaviridae familyasında yer alır. Bu grupta iki önemli virus bulunmaktadır; tavukların IBDV'si ve balıkların Infectious pancreatic necrosis virusudur (17). Moleküler çalışmadan önce virus, Picornaviridae (18, 19) ve Reoviridae familyaları içinde sınıflandırılmıştır (20).

Birnavirus virionları, zarsız hegzagonal yapıda ve 60 nm çapındadır, ikozahedral simetriye sahiptir. Genom linear çift iplikçikli RNA'dan oluşmaktadır. İki segmentten oluşan genomun (A ve B), A segmenti 3,2 kbp uzunluğunda olup; VP2, VP3, VP4 ve VP5 viral proteinlerine dönüştürülen poliproteini kodlamaktadır (21-23). Segment B ise 2,8 kbp olup RNA polimeraz olan VP1'i kodlamaktadır (24, 25). Etkenin; VP1-5 olarak adlandırılan 5 adet viral proteini bulunmaktadır (26, 27).

Serotip 1 içerisinde yer alan izolatların yapısal proteinlerine bakılarak ayırmak mümkün değildir. VP2 ve VP3 IBDV'nin major proteinleridir, virus proteinlerinin sırasıyla %51 ve %40'ını oluşturur. VP1 (%3) ve VP4 (%6) minor proteinlerdir. VP1 viral RNA polimeraz, VP4 ise viral proteazdır. (23, 28).

VP1 segment B de yer alan tek protein olup, virusun encapsidasyonunda anahtar rolü oynar. Diğer 4 yapısal protein A segmentinde bulunur. VP2 ana antijenik determinantı kodlar, nötralizan antikörlerin bağlandığı bölgeyi oluşturur ve dolayısıyla tip spesifitesini belirler (29). VP3 nötralizan olmayan antikörleri tanıdığı grup spesifik antijendir ve her iki serotipi tanır (30,31). VP4 yapısal olmayan polipeptittir. VP5'in görevi kesin olarak belirlenmemekle birlikte, virus salınımı ve yayılmasında düzenleyici rol oynadıkları düşünülmektedir (32).

Becht ve ark.(30), VP2'ye karşı şekillenen monoklonal antikorların virusun iki serotipinin ayırt edilmesini sağladığı, VP3'e karşı hazırlanan monoklonal antikorların ise her iki serotipten de grup spesifik bir antijeni tanıdığını ve dolayısıyla serotipleri ayıramadığını bildirmiştir. Synder ve ark. (33), virusun her iki serotipini de nötralize eden bir monoklonal antikor geliştirmişler ve VP2 üzerinde çok sayıda epitopun varlığını bildirmişlerdir. Yapılan bir deneysel çalışmada (34), Tip 1 içinde bulunan 8 adet ticari aşı suşu, 5 adet saha suşu ve tip 2'de yer alan 2 saha suşu, çapraz-nötralizasyon testine tabi tutulmuş, alışılan 13 adet tip 1 suşu arasından 6 alt-tip saptanmış, bunlardan biri bütün varyant izolatları kapsamıştır.

Kuzey İrlanda ve Avrupa'da elde edilen izolatlarda serotip-1'in suşları arasında %30 (35), Serotip-2'nin 2 suşu arasında ise % 33 oranında antijenik benzerlik olduğu belirlenmiştir (36). Serotip ayrımı virus nötralizasyon test (VNT) ile yapılabilmekte ancak Floresan antikor ve ELISA ile mümkün olmamıştır (37, 38). Serotip-2 bu güne kadar hindilerden (39) ve tavuklardan izole edilmiştir (40, 41).

Türkiye'de elde edilen IBDV izolatları arasında (Marmara: G3, G12, G41; Ege: G34, G35 ve İç Anadolu: ETL3) SDS-PAGE testi kullanılarak yapılan çalışmada herhangi bir farklılık belirlenmemiştir (42).

Patojenitesi yüksek olan tip 1 gurubunda varlığı belirlenmiş olan varyant suşlar nedeniyle aşı suşları her zaman tam koruma sağlayamayabilmektedir (43).

Virusun üretilmesinde tavuk orijinli embriyonal hücre kültürleri (tercihen chicken embriyonal fibroblast, CEF), Vero ve BGM-70 (Baby Grivet Monkey-70) yanında, hindi ve ördek embriyo hücrelerinde, tavşan hücrelerinden elde edilen memeli hücre hatlarında (RK-13) da üretilebilir (1). Tavuk embriyonal kültürlerde virusun çoğalma siklusu 10-36 saattir (44, 45). Vero ve BGM-70 hatlarında ise 48 saate varan bir çoğalma siklusu bildirilmiştir (46, 47). Virusun BGM-70 veya CEF kültürlerinde yapılan pasajlarında, 6. pasajdan sonra patojenite kaybı olduğu ancak, CEF hücre kültürlerinde ise bu durum meydana gelmemektedir (48).

Virus izolasyonu ve üretilmesinde SPF (specific pathogen free) tavuklar kullanılmaktadır. Yapılan bir diğer araştırmada (34), MA-104, Vero ve BGM-70 hatlarında her iki tipi üretmişler, ancak BGM-70 hattının daha duyarlı olduğunu saptamışlardır.

IBDV çevre koşullarına karşı oldukça dayanıklıdır, pH 2'de ve 56°C'de 5 saat tutulduğunda hala canlılığını koruduğu, ancak pH 1'de inaktive olduğu saptanmıştır (49). Etken zarsız olduğundan eter ve kloroform testine dirençlidir. Virus, % 0,5'lik fenol ve % 0,125'lik thimerosal ile 1 saat 30°C'de tutulduğunda enfektivitesinin etkilenmediği ancak %0,5'lik formol ile 6 saat süreyle yapılan muamelede önemli ölçüde enfektivite azalması gözlenmiştir. Sodyumhidroksitli bileşikler virusu inaktive edebilir (50). Langraf ve arkadaşlarının (51) yaptıkları bir çalışmada, 10dk süreyle uygulanan %0,5'lik kloraminin virusu öldürdüğü tespit edilmiştir.

#### 1.4. Epizootiyoloji

Enfeksiyon oral yolla bulaşır, enfekte hayvanlarla direkt temas veya kontamine materyallerle indirekt olarak da bulaşır. Virusun sindirim sistemine girişı ana bulaşma yolu olmakla birlikte, konjunktiva ve üst solunum sistemi de önemli bulaşma yollarındandır. Deneysel olarak damar içi yolla da bulaşma geliştirilebilir. Kümes materyalleri yanında bakıcılar, yabani kuşlar, kemirgenler gibi faktörler de viral taşınmada önemli faktörlerdir (1). Pages-Mante ve ark. (52) enfekte kanatlıları tüketen köpeklerin, 48 saat kadar virus saçtuklarını belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada, salgından sonraki 8. haftada kümesten alınan yem kurdunda (*Alphitobius diaperinus*) virus tespit edilebilmiştir (53). Yine enfekte tavuk çiftliklerinde ölü olarak bulunan 23 fareden 6'sında IBDV antikorları tespit edilmiştir (54), bu çalışma göstermektedir ki, klinik enfeksiyon geçirsin veya geçirmesinler virus replikasyonu bu hayvanlarda gelişmektedir. Virusun saçılım süresi tam olarak bilinmediğinden farelerin epidemiyolojik önemleri tam olarak değerlendirilememektedir ancak, enfekte kümeslerin dezenfeksiyonu yapılırken kemirgen mücadelesinin de tam olarak yapılması gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. IBDV'nin yumurta ile bulaşması ile



ilgili bir bildirim bulunmamaktadır. Etkenin ısıya ve dezenfektanlara karşı dayanıklılığı iki salgın arasındaki sürede canlılığını koruyabilmesi için yeterlidir (1).

Howie ve Thorsen (55) yaptıkları çalışmalarda; *Aedes vexans* türü sivrisineklerden elde edilen ve "743 suşu" olarak adlandırdıkları IBD virusu ile, Becht soyundan bir IBDV'nü karşılaştırmışlardır. Söz konusu çalışmada, viruslar hücre kültürlerine adaptasyon, büyüme eğrileri, antijenik ilişkileri ve fizyo-kimyasal karakterleri yönünden incelenmiş ve sonuç olarak her iki virusunda aynı soydan geldiği saptanmıştır.

IBDV, özellikle serotip-1, ilk tespitinden sonra dünyada oldukça geniş bir alana yayılmıştır. Entansif tavuk yetiştiriciliği yapılan birçok bölgede yüksek insidens ile seyretmektedir. Rutin uygulama olarak yapılan aşılama programları hayvanları seropozitif hale gelmekte, maternal antikor varlığı da belli bir koruma sağlamaktadır. Sirkülasyondaki suşların tipleri de büyük önem taşımaktadır. Yüksek virulent varyant suşların (vvIBDV) görüldüğü bölgelerde, enfeksiyon yüksek mortaliteyle seyrederek önemli ekonomik kayba yol açtığı bildirilmiştir (56).

Her iki serotip de evcil tavuklar yanında, evcil hindi (57) ve ördekleri (35) de enfekte edebilir ancak sadece civciv ve piliçlerde klinik tablo oluşumuna neden olur. Tip 1'in hedef konak hücre gurubu daha sınırlıdır, özellikle B lenfositlerinin replikasyon alanlarını tercih eder, serotip 2 ise bu konuda daha az spesifiktir ve hiçbir izolatu patojenik ya da immunsupresif olarak bildirilmemiştir.

Tavuk ve hindilerde tip 2 ile ilgili yapılan çalışmalarda, virus inokule edilen tavuklarda klinik, makroskopik ve mikroskopik olarak her hangi bir bozukluk gelişmediği (37, 38), ancak enfeksiyona karşı antikor yanıt oluştuğu belirlenmiştir.

Altı haftalığa kadar olan evcil tavuklar enfeksiyona daha duyarlıdır, özellikle üç haftalıktan küçük hayvanlarda immunsupresyonun etlikleri daha şiddetlidir (58, 59).

IBDV saha şartlarında oldukça dirençli yapısı nedeniyle kümes ve işletme çevrelerinde uzun süre kalabilmektedir. Enfekte kümeslerde kafes, suluk, yem ve dışkıda 52 ila 122 gün kadar canlılığını sürdürebilmektedir (49).

### **1.5. Patogenez**

İnkubasyon periodu genellikle 2-3 gün olan virus, oral bulaşmanın ardından gastrointestinal organların lenfoid hücrelerinde replike olur. Deneysel çalışmalarda inoklasyondan sonraki 13. saatte birçok folikülde virus tespit edilebilir. Viremi sonrasında diğer hedef organlara da yerleşir (60). Etken daha sonra portal sistemle karaciğere ulaşır. Kupfer hücrelerinde replikasyonun ardından kan yoluyla Bursa Fabricious'a ulaşır (61). Buradaki replikasyondan sonra ardından ikinci bir viremi evresiyle böbrekler, dalak, timus ve diğer lenfoid organlara ulaşan virusun ana hedef hücreleri Ig M salgılayan B lenfosit hücreleridir. Patogenez başlıca immun supresyona, virusun suşuna, hayvanın yaşına ve sekonder patojenler tarafından oluşturulan enfeksiyonların varlığına bağlıdır. B lenfositler tarafından diğer etkenlere karşı gerçekleştirilen antikor üretimi azalmasına karşın, olgun B lenfositler tarafından IBDV'ye karşı yüksek titrede antikor üretimi gerçekleştirilir (62).

Enfeksiyonun 2. gününde Bursanın foliküler korteks hücrelerinde büyük ölçüde depleksiyon şekillenir ve yaklaşık bir hafta sonra foliküler yapı görünmez hale gelir. Histolojik olarak konnektif doku ve sistik yapıda kuagülasyon nekrozları tespit edilebilir dördüncü günde şişkin hemorajik ve jelatinöz eksudatla kaplıdır (63). Bursa akut enfeksiyonda beş kat büyüyebilir (62), onuncu günde ise orijinal büyüklüğünün sekizde birine düşerek atrofiye olur. Nekropside gri renkte olduğu görülen Bursa Fabricious'ta, diğer lenfoid dokularda da olduğu gibi B-lenfositleri tespit edilemez. Bursa Fabricius'ta, özellikle de replikasyon bölgesinde önemli miktarda T hücre infiltrasyonu saptanmıştır (64, 65). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, T hücrelerinin de enfeksiyondan etkilendiği, T supresör hücrelerinin aktivasyonunda veya mitojenik sitümilasyonlara cevapta inhibasyon meydana geldiği bildirilmiştir (66). Nekropside büyüyen böbreklerde urat birikimleri gözlenebilir. Bazen proventriküluste peteşiler, dalakta şişkinlik ve enfarktüs alanları gözlenir. Varyant viruslar, infectious

proventriculitis olarak bilinen sendroma da yol açabilirler, proventriculus ve timus fragile yapıdadır hatta manüplasyonlar sırasında parçalanabilir (5).

Aktif olarak bölünen yüzey immunglobulinleri lize olur fakat monosit-makrofaj hattındaki hücreler sürekli enfektendirler ve virus üretirler. Bu yol virusun yayılımında hayati rol oynar. Klinik bozuklukların ve ölümün nedeni tam olarak bilinmemekle beraber, sadece lezyonların şiddeti ve bursal hasara bağlı değildir. Enfeksiyondan sonra ölü bulunan bazı hayvanlarda çok az bursal lezyonlar bulunmuştur. Öte yandan aşırı bursal hasar görülen hayvanlar enfeksiyonu atlatabilmektedirler. Makrofajlar tümör nekrozis faktör veya interleukin-6 gibi sitokinlerin salınımını arttırarak bu patolojide spesifik bir rol oynarlar. Tavuklarda makrofajların, interferonla aktive olduğu bilinmektedir, bu durum canlı piliçlerde ve Chicken Embryo Hücre kültürlerinin invitro olarak artan interferon salgısıyla gelişebilmektedir. Enfeksiyondan sonra Bursa Fabricious'un lenfoid hücrelerinin yıkımı hem apoptosis hem de nekrozis ile meydana gelebilir. Bursektomize edilen civcivlerde IBDV enfeksiyonunun gelişmediği tespit edilmiştir (67).

Enfeksiyon ilk günlerde şekillendiğinde, immunsupresyon daha şiddetli olur. Her ne kadar immunsupresyon direkt olarak B lenfositleri yoluyla olsa da hücrel bağışıklığında etkilendiği gösterilmiştir (68). Söz konusu immunsupresyon, sekonder enfeksiyonlara duyarlılığı arttırmakta ve aşılmalarda gelişecek antikor yanıtın seviyesinin normalden düşük olmasına neden olabilmektedir (59,64 69). İmmunsupresyon gelişen hayvanlarda IBV ve E. coli enfeksiyonuna bağlı gelişen solunum yolu problemleri sıklıkla görülür ve mortalite ile ekonomik kayıpların artmasına yol açar. En şiddetli ve en uzun süreli immunsupresyon enfekte olan bir günlük civcivlerde gözlenir (58, 70).

## 1.6. Semptomlar

Virulent suşlarla meydana gelen salgınlarda görülen klinik bulgular konvansiyonel tip ile meydana gelenler ile oldukça benzerdir ve şiddetli klinik belirtiler ile yüksek mortaliteye neden olur. İnkubasyon periyodu yaklaşık 4 gün kadardır. Bulgular duyarlı sürüde ani şekillenen şiddetli depresyon ile başlar (Resim 1), hayvanlar hareket etmede isteksizdirler (3). İştahsızlık, tüylerde karışıklık, titreme ve şiddetli sulu-beyaz ishal (Resim 2) görülür. Dehidrasyon vardır, son dönemlerde vücut ısısı düşer yaş duyarlılık aralığı artış gösterir, broylerlerin tüm gurupları etkilenir. Mortalite eğrisi yaklaşık olarak üç gün içinde hızla yükselir ve ardından hızlı bir iyileşme periyodu (5-7 gün) gözlenir.

Enfeksiyonun prognozunu belirleyen faktörler; yaş, ırk, etkenin virulensi ve yavruların sahip olduğu maternal antikor titresidir. Virulensi düşük suşlar daha uzun süren salgınlara yol açar, subklinik forma dönüşür, maternal antikorların varlığında 3 haftadan küçük hayvanlarda tespiti güç olabilir (1,71).

Dünyada gelişen salgınlarda temel olan belirlenmiş üç farklı formdan söz edilmektedir (2).

-Konvansiyonel veya klasik form: IBDV'nin klasik virulent suşlarıyla gelişen enfeksiyonlardır. Genellikle orta şiddetle seyreder, subklinik olarak görülme olasılığı da vardır.

-Subklinik immunsupresif form: Düşük patojenitedeki suşlar tarafından da oluşturulmaktadır. Bu varyant suşlar, klasik suşlara karşı şekillenen antikorlar ile tam nötralize olmamaktadır.

-Akut form: Ağırlıklı olarak Avrupa ve Asya'nın değişik bölgelerinde görülen yüksek virulent varyant (vvIBDV) suşlar tarafından meydana getirilir, mortalite %90'lara ulaşabilir (56, 72). Bu form aşılı sürülerde de görülebilir ve hücre kültüründe daha zor üretilebilirler (73, 74).

### 1.6.1. Otopsi Bulguları

Enfeksiyondan etkilenen hayvanların otopsislerinde ilk incelenecek organ Bursa Fabricius'dur (75). Hastalığın 3. gününden itibaren Bursa, ödem ve hiperemi nedeniyle ölçü ve ağırlık olarak büyüme gösterir (Resim 4), 4. günden sonra normal ağırlığının iki katına ulaşır, 5. günde Bursa normal ağırlığına döner ancak atrofi devam eder ve 8. günde orijinal ağırlığının 1/3'üne düşer. Enfeksiyondan sonraki 2-3. günlerde serozal yüzeyleri kaplayan jeletinöz, sarımsı transudat tespit edilebilir. Enfekte bursalarda genellikle nekrotik odaklar ve peteşiyel ve ekimotik kanamalar tespit edilir (76).

Diğer ana otopsi bulguları şunlardır; genel dehidrasyon bulguları, Resim 3'te de görüldüğü gibi bacaklarda ve pektoral kaslarda ekimoz ve peteşiler (77), bağırsaklarda fazla miktarda mukus bulunur. Dalak hafifçe büyümüştür, yüzeyinde düzensiz dağılmış küçük gri odaklar bulunur. Bazen bezli ve kaslı midenin birleşim yerinde mukozada kanamalar gözlenebilir. Varyant suşlarda meydana gelen salgınlarda timus ağırlığı daha fazla azalır, sekal tonsiller, dalak ve kemik iliğinde daha şiddetli lezyonlar belirlenebilir. Fakat Bursal lezyonlar diğerleriyle benzerdir (78). Kanatlılarda, enfeksiyonun son dönemlerinde ve hastalıktan ölen hayvanlarda böbreklerdeki değişiklik dikkat çekicidir (Resim 4). Bu lezyonlar şiddetli dehidrasyonun varlığını gösterir (2).

IBD'de mikroskopik lezyonlar temel olarak lenfoid dokularda (kloakal bursa, dalak, timus, harderian bezi ve sekal tonsiller) görülür (79, 80). Kloakal bursadaki değişiklikler daha şiddetlidir. Enfeksiyonun 1. gününden itibaren bursal foliküllerin medullar alanında lenfositlerin dejenerasyonu ve nekrozu tespit edilir. Lenfositler daha sonra heterofil, piknotik debris ve hiperplastik retiküloendotelial hücrelerle yer değiştirir (81).

Harderian bezleri önemli ölçüde etkilenir ve plazma hücreleri yoğun bir şekilde infiltridir, 1-7 günlük yavrularda enfekte civcivlerde plazma hücrelerinin popülasyonu, enfekte olmayanlardan 5-10 kat daha azdır. Böbrekteki histopatolojik

lezyonlar nonspesifiktir ve büyük ihtimalle şiddetli dehidrasyona bağlı olarak şekillenir. Karaciğerde hafif perivasküler infiltrasyon gözlenir (82).

## **1.7. Teşhis**

Genellikle klinik semptomlara ve otopside patognomik bulgulara dayanarak teşhise gidilebilir, ancak ayırıcı teşhis mutlaka yapılmalıdır. Ancak bu yöntem saha şartlarında, sıklıkla yeterli olmaz ve laboratuvar doğrulamasına ihtiyaç duyulur.

### **1.7.1. Laboratuvar teşhisi**

#### **1.7.1.1. Direkt Teşhis**

Direk teşhiste virus izolasyonu hedeflenir, bu amaçla kullanılacak bir çok hedef olmasına rağmen, en uygun ve en çok kullanılan doku Bursa Fabricius'tur. Doku homojenatları in-vivo ve in-vitro ekim için kullanılmaktadır. Duyarlılık açısından en elverişli kültür ortamı Embriyolu Tavuk yumurtalarının Chorio Allantoik Membranıdır, 9-11 günlük embriyolu yumurtalar tercih edilir. Deneme hayvanları da kullanılabilir.

Devamlı hücre hatlarından Chicken Embryo Fibroblast (CEF), Baby Grivet Monkey-70 (BGM-70), Vero hücreleri yaygın olarak kullanılır (46, 47). İlk pasaj sonunda üreme tespit edilemezse iki kör pasaj daha uygulanır (1,76).

Üretilen izolatlar daha sonra direk olarak antijen tespitinde kullanılan; Virus Nötralizasyon (VNT) (77), Direkt Immun Floresan Antikor Test (DIFAT), Direkt Immun Peroksidaz Test (DIPT) (83-85), ELISA (80, 86-88). Agar Jel Immun Difüzyon (89, 90) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) (91, 92) gibi test metodlarından biri kullanılabilir.

Virusun saptanması için monoklonal antikorların kullanılması testin hassaslığını artırır. Antigen-capture ELISA, spesifik ve duyarlı olmasının yanında, hızlı bir test olduğu için rutinde tercih edilir, monoklonal antikorların kullanılması durumunda, izolatin antijenik karakterizasyonu da yapılabilir (76, 74, 87).

Tip 1 ve 2'ye ait suşlar biotin (93) ve digoxigenin (91) ile işaretli deoksiribonukleik asit (DNA) problemleri kullanılarak ayırt edilebilir (93, 94).

Reverz transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) kullanılarak genomun stabil bölgeleri amplifiye edilmek suretiyle viral RNA tespit edilebilmektedir (95). En çok VP2 bölgesinin amplifikasyonu tercih edilir (96). Komple dizilimin belirlenmesi (96, 97) ve aminopeptidlerin analizi yoluyla virus tiplendirilebilir (98-100).

Serotip 1 virus suşlarını sekansları büyük benzerlik gösterdikleri için, varyant suşlar ile vvIBDV suşların ayrımı güçtür (2), ancak RT/PCR-RFLP ile sekans analizi ile ayrımları yapılabilir (101).

### **1.7.1.2. İndirekt Teşhis**

IBDV spesifik antikorların kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesinde en çok kullanılan testler; Agar Jel Immun Difüzyon (89), ELISA (102) ve Virus Nötralizasyon Testidir (VNT) (103). Ancak güvenilirliği ve kolay uygulanabilir olması nedeni ile ELISA tercih edilmektedir. (104, 105).

Bu testler kullanılarak doğal enfeksiyon sonucu şekillenen antikorlar ile aşı antikorları ayırt edilememektedir. Ancak saha şartlarında antikor varlığının ve titresinin saptanması aşılamanın başarısının gözlenmesi (104) ve SPF sürülerin enfeksiyondan ariliklerinin ortaya konulması açısından büyük önem taşır. Pratikte antikor taramaları, genç hayvanlarda maternal antikor titresinin belirlenmesi ve bu titrelerin çeşitli formulasyonlarla değerlendirilip aşılama prosedürünün şekli ve

zamanlamasının saptanması amacıyla dünyanın her yerinde yoğun olarak kullanılmaktadır (106).

### 1.7.2. Ayırıcı Teşhis

Klinik bulgulara bakıldığında, IBD ile karıştırılabilecek başlıca hastalıklar; kanatlı koksidiyozu (1), susuzluk, hemorajik sendrom ve infeksiyöz bronşitisin nefropatojenik formlarıdır (107). Koksidiyoz'da dışkıda kan görülmesi, İnfeksiyöz bronşitis virusunun nefrotik suşlarının nefrozise neden olması, Hemorajik Sendrom'da bezli ve kaslı mide arasındaki kanamalar, susuzlukta görülen böbrek harabiyeti ve ürat kristallerinin birikimi IBDV ile benzerlik gösterse de, tüm bu hastalıklarda Bursa Fabricius'un etkilenmesi söz konusu değildir, nekropsi bulgularına bakılarak ayrımları kolayca yapılabilir (1).

Ancak Bursa'yı etkileyen diğer faktörler de göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin mikotoksikosis bursal atrofiye (108), aflatoksinler de ek olarak Bursa ve Timus'da dejenerasyona yol açar. Otim ve arkadaşlarının tavuklarda yaptıkları bir çalışmada (109), hayvanların bir kısmına IBDV, bir kısmına da aflatoksin verilmiş, ardından Newcastle enfeksiyonu için aşı yapılarak oluşan antikor seviyeleri incelenmiştir, sonuç olarak aflatoksin uygulanan grupta daha yüksek immunsupresyona bağlı olarak daha zayıf yanıt geliştiği belirlenmiştir. Ek olarak IBD, immunsupresif etkileri nedeniyle Chicken Anemia Virus (CAV), Marek ve Avian Reovirus enfeksiyonları ile de karışabilmektedir (66).

Zearalenon'nun yüksek dozlarda kullanımında bursal ağırlığı azalttığı gösterilmiştir, ayrıca diğer bir çok hayvan türünde olduğu gibi, kortikosteroid kullanımı apoptosise ve lenfosit üretimde azalmaya yol açar. Aynı durum kötü beslenen ve stres faktörleri altında yaşanan hayvanlarda da söz konusudur ve bursanın normalden daha küçük olduğu saptanabilir (110, 111).



## 1.8. Sağaltım

IBDV infeksiyonunun tedavisinde etkene yönelik olarak rutinde kullanılabilecek spesifik bir antiviral tedavi söz konusu değildir (3, 112).

## 1.9. Koruma ve Kontrol

IBDV'nin çevresel şartlara yüksek direnci ve geniş yayılımı nedeniyle, hijyenik tedbirler hayati olmasına rağmen, genellikle yetersiz kalmaktadır (49). Hastalığın ekonomik sonuçlarının ciddiliği düşünöldüğünde uygun aşılama programlarının yeterli şekilde uygulanması büyük önem taşımaktadır. Aşılama yapılırken uyulması gereken temel kriterler;enfeksiyonun yaygınlığı, suşun virulensi, civcivlerde maternal antikorların varlığı, düzeyi ve heterojenitesi, kullanılacak aşının cinsi (mild, intermediate, hot), aşılama yöntemi, hayvanın yaşı ve yetiştirme şeklidir. IBDV'ye karşı atenüe canlı aşılar ve yağ-emölsiyonlu inaktif aşılar kullanılmaktadır (2). Sahada kullanılan temel canlı aşı tipleri mild, intermediate ve hot aşılar olarak sınıflandırılırlar.

-Mild Suşlar: Önemli ölçüde attenüe edilmiş aşılardır. Bunlar homolog maternal antikorlarla interfere olabildiklerinden bu antikorlar azaldığı zaman uygulanırlar.

-Intermediate Aşılar: Attenüasyon oranları mild suşlara göre nisbeten daha azdır, daha yüksek maternal antikor seviyesinde interfere olurlar ( $\leq 6 \text{ Log}_2$ ). Daha çok broyler ve piliçlerde kullanılırlar (113). Yüksek risk grubundaki kümeslerde birden fazla (2-3) aşılama yapılmaktadır (104).

-Hot Aşılar: Attenüasyon oranları çok daha düşüktür, şiddetli enfeksiyonlarının şekillendiği bölgelerde, yüksek maternal antikora sahip sürülerde kullanılırlar. Ancak, bu suşlarla yapılan aşılama sonrasında, immunsupresyon şekillenebilir (2).

Enfeksiyonla mücadelede en iyi koruma nötralizan antikorların oluşumuna bağlıdır. Doğru aşı seçimi (114) en önemli paradokstur. İdeal aşı belirlenirken; etkinliği ile yan etkileri konusunda dengeli olması, klinik semptom ve immunsupresyon oluşturmaması ile yüksek maternal antikorlara sahip kanatlılarda dahi uzun süren bağışıklık oluşturabilmesi istenir (115).

Tatmin edici bir koruma, canlı ve inaktif aşuların kullanımını ile sağlanabilir. Klasik canlı aşular daha güçlü bağışıklık oluştururlar fakat patojenik olabilmeleri ve virulens artışı gibi sorunlara yol açabilirler. İnaktive aşular pahalı olmalarına rağmen hipervirulent suşların ortaya çıkmadığı durumlarda başarılıdırlar. Özellikle virulent suşların varlığında hayvanları pasif olarak koruma ve canlı aşılama gereklidir. Aşılama programının başlangıcında maternal antikorların yarılanma ömürlerinin bilinmesi hayati önem taşır. Optimal aşı zamanının belirlenmesi için serolojik taramalar çoğunlukla gereklilik arz etmektedir (2).

İnaktif aşular ticari yumurtacılar, damızlıklarda ve enfeksiyonun çok yoğun olduğu bölgelerdeki broylerlerde uygulanmaktadır (116). Bu aşular deri altı veya kas içi yolla, damızlıklarda 16-20. haftalarda ve ticari yumurtacı ve broylerlerde 1-10 günlük yaş aralığında uygulanırlar.

Canlı aşularla aşılanan damızlıkların, inaktif bir aşı ile aşılmasını takiben oluşan yüksek düzeyde ve uniform antikorların maternal yolla civcivlere geçmesi ile civcivler yaklaşık 1 ay kadar korunabilirler (117), fakat civcivler, daha sonra yüksek patojeniteye sahip diğer suşlarla daha sonra gelişecek enfeksiyonlara duyarlıdırlar. (118, 119).

IBDV'nin VP2 proteinini eksprese eden birçok aşı deneysel olarak geliştirilmiş ve bu aşuların etkinliği laboratuvar testleriyle kanıtlanmıştır. Bu aşuların avantajları, rezidüel patojenitenin, maternal antikorlardan etkilenmenin ve mutasyon riskinin olmamasının yanında, in ovo olarak uygulanma şeklinin bulunması ve infekte ve aşılı hayvanların ayırt edilmelerine olanak sağlamalarıdır (120).

Subunit IBDV proteinleri, mayalarda (29) veya Baculovirus (121) sistemlerinde eksprese edilir, bu teknolojinin avantajı, aşı sadece VP2 temelli olduğu için sahada aşıya bağlı (Anti-Vp2) ve enfeksiyona bağlı (Anti-VP2 ve VP3) antikorlarının ayrılabilmesidir.

Canlı aşuların bir diğer avantajı, çevreye salınmaları ve saha viruslarıyla yarışmalarıdır, ancak birçok intermediate aşular varyant suşlarda yetersiz kalırlar.

Daha fazla attenuue edilmiş hot aşular mortalitenin düşüşünü sağlasalar bile immunsupresyona yol açmaları nedeniyle tehlikelidirler (116, 122).

Aşılama konusundaki temel sorun yeni suşların ortaya çıkışı ve pasif immunitenin aşıyı interfere etmesidir. Gelecekte, Fowl Pox virus veya Fowl Adenoviruslarda olduğu gibi Rekombinanat viral aşular ile güçlü aktif immun yanıt oluşturan aşuların geliştirilmesi mümkündür.

Kullanılmaya başlanan diğer bir aşı türünde immun kompleks aşılardır, antikor ile antijenin birleştirilerek kuluçka dönemindeki yumurtalara 18. günde in-ovo olarak uygulanır. Bu aşının işleyiş prensipleri net olarak açıklanamamakla birlikte, aşı virusunun makrofajlara yerleştiği ve kandaki antikor seviyesinin düşmesiyle maternal antikorlar tarafından nötralize olmadan aktive olduğu düşünülmektedir. Aşılanan yumurtalardan çıkan broyler civcivler tüm yetiştirme dönemleri boyunca IBDV'ye karşı bağışık kalmaktadır (123, 124).

Son yıllarda, virion yerine, nukleik asidin aşı materyali olarak kullanıldığı DNA aşularının koruyucu etkinliği üzerine çalışmalar yapılmaktadır (125).

### **1.9.1. Deventer Formülü İle Optimal Aşılama Zamanının Saptanması**

Gumboro aşuları dünya çapında kullanılmaktadır fakat hepsinin ortak problemleri ‘aşılama için doğru zamanın (yaşın) belirlenmesi’dir. Maternal antikor (MDA)

düzeyi çok yüksek olan civcivlere canlı IBD aşısı uygulandığında, bu antikorlarla aşı nötralize edilecek ve sonuç olarak aşı koruma sağlamayaz. Ayrıca kümesi erken dönem enfeksiyonlara karşı korunmasız bırakmamak maksadıyla, aşılama için çok uzun süre beklemek uygun değildir.

Test yapmaksızın bir civcivin annesinden ne kadar miktarda antikor aldığını tam olarak bilmek mümkün olmamaktadır. Teorik olarak, yağ-bazlı inaktif Gumboro aşısı ile aşılanan tavukların yavrularında, sadece canlı aşılarla aşılınmış tavukların yavrularına oranla MDA çok daha yüksek olacaktır. Yine de uygulamada, anacın yaşamı süresinde bir (sub-klinik) enfeksiyon oluşmuşsa antikor titresi yükselecektir. Özellikle inaktif bir aşı ile tekrar aşılınmayan hayvanların yavruları, aşılınmaya normalden daha fazla ihtiyaç duyacaklardır.

Gumboro virusu çevrede bulunduğunda, mümkün olduğunca kısa sürecek aşılama yapılması gerekmektedir. Bu gibi durumlarda optimal aşılama zamanının saptanmasına yardımcı olmak ve aşılama günün saptanmasının kolaylaştırmak için bir yöntem geliştirilmiştir. Bu amaçla göz önünde bulundurulması gereken noktalar şunlardır; çok erken bir yaşta MDA seviyelerini ölçülür ve civcivlerde MDA seviyelerinde düzenli bir düşüş ( $\log_2$  skalası) olduğundan, MDA seviyelerinin aşılamanın yapılabilmesi için ne zaman yeteri kadar düştüğü tahmin edilebilir.

Sahada optimal aşılama zamanının saptanması için birçok fomül kullanılmıştır. İlk formüllerden biri, 80'lerin sonunda Dr. Ben Kouwenhoven (Kanatlı Sağlığı Enstitüsü, Doorn Holland, günümüzde Hayvan Sağlığı Servisi, Deventer, Hollanda ile birleşmiştir) tarafından geliştirilmiştir. Bu formül 'intermediate aşıların' kullanımı için geliştirilmiş ve o zamanlarda Gumboro ile mücadelede etkili olmuştur. Sahadaki durum sürekli değiştiğinden, bu formül Hollanda'da bulunan Hayvan Sağlığı Servisi (GD)'nin 'deventer formülü' ile değiştirilmiştir ve dünyada 1990'dan beri kullanılmaktadır.

IBD'ye karşı en iyi aşılama zamanının saptanmasında formül için gerekli olan en önemli noktalar aşağıda sıralanmıştır:

a. Kumesi temsil edecek örnek miktarının sağlanması için kümes başına minimum 18 örnek alınmalıdır. On sekiz örnekten daha az sayıda örneklere dayalı yapılan saptamalar daha az güvenilirdir. Kümes başına sadece 10-15 örnek alarak tasarruf etmeye çalışmak yanlış bir ekonomidir. Eğer 2 farklı kümeste bulunan yavrular tek bir damızlık kümeden geliyorsa bu kümeslerden sadece birinin örneklenmesi yeterlidir.

b. Örnekleme için yüksek kalitede tavuklar seçilmelidir. Örnekler bu hayvanlar kümesinin tamamını temsil edemeyeceği için kötü kalitede, hasta veya stresli tavuklardan seçilmemelidir. Eğer bu durumlar karşılanmazsa, optimal aşılama zamanı güvenli bir biçimde saptanamaz.

Deventer Formülünün Teorik Temeli:

a. Maternal antikor (MDA) seviyelerinin düşüşü, tavuğun türüne (kullanım amacı) bağlıdır. Bu düşüş, metabolizma ve büyüme oranı ile ilişkilidir. Ölçülen 'yarılanma ömrü', 'altın standart' olan Virus nötralizasyon testi ile broylerler için 3-3.5. gün, damızlıklar için 4.5. gün ve yumurtacılar için 5.5. gün olarak bulunmuştur.

b. Maternal antikor titreleri hayatın ilk 4 günü boyunca hemen hemen aynı kalır (yumurta sarısının emilimi, metabolizma ve büyüme ile düşen titreleri telafi eder), 4 günlük yaştan itibaren titre her yarılanma ömrü zamanı başına 1 log<sub>2</sub> basamak düşer. Deventer formülü, 4 günden küçük civcivlerin serumlarıyla yapılan tayinlerde bu durumu telafi edecek şekilde düzenlenmiştir. Örneğin, hesaplamalar 2 günlük civcivlerin kan serumlarından yapılıyor ise ve aşılama için uygun antikor seviyelerine düşüş 13 gün olarak bulunuyor ve hayvanların yaşları nedeni ile 2 ekstra gün bu sayıya eklenir. (bu örnek için örnek alımından 15 gün sonra aşılama yapılmalıdır). Aynı titre 4 günlük civcivlerde bulunur ise o zaman ekstra gün eklemeye gerek yoktur (örnek alımından 13 gün sonra aşılama).

Özet olarak; günlük civcivlerden yapılan örneklemelelere 4 gün; 1 günlük civcivlerden yapılan örneklemelelere 3 gün; 2 günlük civcivlerden yapılan örneklemelelere 2 gün; 3 günlük civcivlerin kanından yapılan örneklemelelere 1 gün eklenir. Eğer yüksek titre sonuçları bekleniyorsa daha ileri bir yaşta kan örnekleri alınması tavsiye edilir.

c. Eski formüllerde tüm tayinler kan örneklerinin ortalama titrelerine dayanmaktaydı. Üiform titrelere sahip bir kümeste bu durum sorun yaratmamaktadır. Gerecekte, titreler genellikle uniform değildir. Bu farklılık, civcivlerin değişik kümeslerden veya inaktif aşularla aşılammış kümeslerden getirilmesi nedeni ile de oluşabilir.

Deventer Formülünde, tayinlerin temeli kümeden alınan kan örneklerinin ortalama titrelerine dayanmaz, kümesin belirli bir kısmının başarılı olarak aşılanaileceği titre düzeyleri temel alınır.

Saha deneyimlerine göre, Deventer Formülünde, yeterli bulunan %75'lik oran kullanılır. Genel kural, aşılamanın en son cevap verene kadar geciktirilmemesidir. Bu durum kümesi çok uzun süre risk altında bırakacaktır. Ayrıca, en son yanıt verecek tavuğa kadar beklemek gerekli değildir, çünkü kümesteki aşılamaadan sonra aşı birkaç gün boyunca etrafa yayılacaktır. Bu da ilk aşılama esnasında aşüyı almayan tavukların (yüksek MDA'ları nedeniyle) pasif olarak aşılanaacağı anlamına gelir (aşının doğru uygulanmasıyla kümesin %75'inin başarılı bir şekilde aşılanağı kabul edilmelidir). Gumboro aşu virusunun kümes içi yayılımı konusunda, kafeslere oranla kalın altlıkların kullanıldığı kümeslerde hayvanlar arasında daha kolay yayıldığını unutmamak gerekmektedir.

d. Aşular MDA'yı kırma titrelerine göre farklılıklar gösterirler. 'Intermediate plus' aşular intermediate aşulara oranla daha yüksek seviyelerdeki maternal kaynaklı antikoru aşabilirler. Formülde aşının MDA'yı kırma titresi kullanılır. LZ 228E, gibi 'intermediate plus' aşular için prosedür ve Dr. B. Kouwenhoven tarafından belirlenen kırma titresi 500'dür. Intermediate aşu D78 için kırma titresi yaklaşık 125'dir. Eğer

diğer aşılar veya ELISA'lar kullanılırsa, aşının ve ELISA kitinin kırma titreleri üretici firmadan temin edilmelidir.

Deventer Formülü şu şekildedir:

$$\text{Aşılama Yaşı} ; \{ (\log_2 \text{ saptanan titre } \% - \log_2 \text{ MDA kırma titresi}) \times t_ - \} \\ + \text{örnekleme yaşı} + \text{düzeltme faktörü (0-4)}$$

Formülde:

Saptanan Titre % ; Kümesin belirli bir yüzdesini temsil eden hayvanlara ait saptanan ELISA titre değeridir.

MDA Kırma Titresi ; Kullanılan aşının MDA'yı kırma (ELISA) titresidir.

t ; Örnek alınan tavukların türüne göre antikorların yarılanma ömrüdür (ELISA).

Örnekleme Yaşı ; Kanatlıların örnekleme dönemindeki yaşıdır.

Düzeltme faktörü 0-4 ; Örnekleme 0-4 günlük iken yapılmış ise eklenen ekstra gündür (126).

### **1.9.2.Aşılama Etkinliğini İnterfere Eden Faktörler**

Ticari kanatlı işletmelerinde aşılama ile gerçekleştirilen immunizasyonu interfere eden faktörler üç farklı gruba ayrılabilir.

#### **1.9.2.1. Aşı İle İlgili Faktörler**

-Titre ve Stabilitate: Canlı virus aşılarının yeterli titreye ve bu titrenin yeterli stabiliteye sahip olması gerekmektedir. Canlı virus aşılarının stabilizasyonun başarısı; liyofilizasyon ve saklama koşullarına bağlıdır. Aşıların son kullanım tarihleri sıkı bir şekilde kontrol edilmeli veya tekrar titre edilmelidir (127).

Solunum sistemi aşılarında, titre aşı reaksiyonu seviyesini etkilemekte, genel olarak bu reaksiyon, korumanın seviyesi olarak değerlendirilmektedir (128).

-Serotip ve Biotip: Ticari aşıların birçok varyasyonu olduğu bilinmektedir. işletmede kullanılacak olan aşının seçimi, kullanılacak aşının etkinliği, çevre koşulları ve hayvan özellikleri bir değerlendirme yapılarak uygulanmalıdır.

- İnaktivasyon ve Adjuvant: İnaktif aşıların inaktivasyon ve adjuvantı, canlı aşıların liyofilizasyonu ve titresi kadar önemlidir. Emülsiyonun tipi ve kalitesi, yağ adjuvantlı aşıların oluşturacağı serolojik cevabı etkilemektedir (127).

### **1.9.2.2. Aşının Kanatlıya Uygulanması İle İlgili Faktörler**

- Uygulama Yolu: Aşının uygulanma şekli, aşının başarısını direkt olarak etkilemektedir. Örnek vermek gerekirse, Newcastle Hastalığına karşı yapılan canlı aşılamada aerosol yolla yapılan aşılamadan diğer yöntemlere göre çok daha iyi bir koruma sağladığı net olarak belirlenmiştir (129).

- Uniformite: Aşıda bulunan antijenin, sürüye uniform olarak dağıtılması gerekmektedir. İçme suyu ve aerosol aşılama yolları gibi kitle aşılama yolları, aşının hayvanlara teker teker uygulandığı bireysel yollara göre daha az uniform bir aşılama sağlamakta ve aşığı uygulayan kişinin çok dikkatli olması gerekmektedir. Bireysel aşılamalarda, uniform bir aşılamaya engel olan faktörler doğru ayarlanmamış enjektörler, bozuk damlalıklar olabilir. Deneyim ve periodik olarak aşığı uygulayanların kontrol edilmesi, olası problemleri önler ve uniformiteyi artırır (127).

- Birliktelik: Canlı aşıların olası kombinasyonlarında, özellikle aşılar, aynı hedef dokulara hitap eden viruslar içeriyorlarsa, her aşının oluşturacağı cevaba etki edebilir (128). Unutulmamalıdır ki; ticari tavukçuluk işletmelerinde verilen bir virustaki amaç, maksimum korumadan ziyade maksimum verimliliklidir. Bu bağlamda



uzlaşma esas nokta olarak ele alınmadır. Bu noktadan yola çıkmış olan Avian Pox ve Avian Encephalomyelitis, Marek Hastalığı ve Avian Pox hastalığına karşı kullanılan aşı kombinasyonları sahada kullanılmaktadır.

- Aşılama Programları: Enfeksiyon hastalıklarına karşı kanatlıların immunizasyonu nadir olarak tek bir inokulasyona bağlıdır. Tek uygulama ile immunizasyonun sağlandığı hastalıklarda, etkinlik aşının hayvandaki persistensin uzunluğuna bağlıdır. Aşılama programlarının önemi, "anemnestik cevap" olarak adlandırılan immunolojik olguya bağlıdır. Bu daha önceden karşılaştıkları antijenlere karşı, lenfoid dokuların tanımlama ve cevap oluşturma yetisidir. Bu cevap, genellikle kanatlının etkenle ilk karşılaşmasında oluşandan daha büyük ve hızlı olmaktadır (127).

Damızlık kanatlılarda, Enfeksiyöz Bursal Hastalığına karşı hiper-immunizasyona sağlamak için canlı bir aşı ile öncü aşılama yapılmalı, ardından adjuvant içinde bir inaktif aşı uygulanmalıdır (119).

-Sulandırıcılar: Canlı virus aşıları için kullanılan diluentler, hayvanların yeterli titrede aşığı alabilmesi açısından önemlidir. Canlı virus aşılarının kanatlılara verilmesindeki başlıca problemlerden birtanesi, içme sularının klorlanmasıdır (127).

### **1.9.2.3. Kanatlıya Bağlı Endojen Faktörler**

- Önceki Maruz Kalma: Yeterli miktardaki öncül uyarımın öneminden daha önce bahsedilmiştir. Bu uyarımla çok kısa bir süre içinde tekrar karşılaşma avantajlı olmayabilir. Şu an yapılan çalışmalar göstermektedir ki, bazı aşılar kümise 14 günden önce tekrar edilmemelidir.

- Pasif Koruma: Kanatlılarda kanda dolaşan fakat kanatlının kendisi tarafından oluşturulmamış antikolar, verilen antijene karşı oluşturulan cevabı etkilemektedir. Bu olgu iki şekilde oluşabilir. Birincisi hiper-immun antiserum uygulamasıyla pasif

immunité oluşturmadır fakat bu yol kanatlı sektöründe yaygın değildir. Pasif immunitenin ikinci ve daha yaygın oluşma yolu ise damızlıklardan yavrularına yumurta sarısıyla antikörlerin geçmesidir. Yavrular ilk 1-3 gün, anneleriyle aynı konsantrasyonda antikör taşırlar ve test yöntemlerine göre değişmekle birlikte, bu miktar 14-30. günlerde tespit edilemez seviyeye düşer. Bu sebeple hiç şüphe yoktur ki ilk hafta yapılan aşılamayı, söz konusu antikörler etkilemektedir. Bu etkinin tipini ve derecesini tahmin etmek mümkün değildir (127). Aerosol aşılama yoluyla, İnfeksiyöz Bronşite karşı 1. gün yapılan aşılama, 15-20. günlerde yapılan aşılama kadar iyi sonuç vermektedir (130) Araştırmalarda yukarıda bahsi geçen durumda, hardierian bezlerinin rolünün büyük olduğunu düşündürmektedir.

IBD'de ise, maternal antikörler enfeksiyondan ve saha virusunun olumsuz etkilerinden korumada büyük rol oynamasına karşı canlı aşılarla immunizasyona karşı olumsuz bir rol oynamaktadır.

Broylerlerde, anaçların aşılanması yoluyla maternal antikörlerin yavrulara geçişini sağlamak ve yavrular erken dönem bulaşmalardan korunmak rutin uygulanan bir yöntemdir (131).

Henry ve Williams (132), tarafından yapılan geniş çaplı bir araştırmada; anaçları yağ adjuvanlı inaktif aşıyla aşılanmış olan broylerlerde, canlı aşı kullanımının verimliliği negatif etkilediği tespit edilmiştir.

- İmmüsupresyon: Hastalıklara karşı direnci düşürdüğü bilinen çeşitli stres faktörlerinin, aşılamaya karşı oluşacak olan cevabı da etkileyeceği düşünülebilir. Çeşitli olumsuz çevre koşullarının, aşılamadan elde edilecek cevabı etkilediği bilinmektedir. İmmunolojik sistemle ilgili olan ve immüsupresyon oluşturan başlıca 3 enfeksiyöz ajan; IBDV, Tavuk Anemisi Virusunu ve Marek Hastalığı virusudur. Marek hastalığı virusu, duyarlı civcivlere erken bulaşma olduğunda ciddi immüsupresyon problemlerine yol açmaktadır.

1980 yılında Sao Paulo'da yapılan geniş ölçekli bir çalışmada, laboratuvar ve sahada bulunan yaklaşık 40 sürüden örnekleme yapılmıştır. Serolojik inceleme yapılan bütün sürülerde, IBD seropozitif olarak belirlenmiştir. Örnek alım yaşlarının 45. günden sonra olduğu düşünüldüğünde, tespit edilen antikorların maternal antikor olmadığı aşıkardır ve o dönemde IBD'ye karşı aşılama yaygın olarak kullanılmamaktadır. Broilerler başta olmak üzere, tüm ticari tavuklarda IBDV yaygınlığı çok yüksektir (127). Söz konusu virus, Bursa Fabricioustan ve Timus'tan köken alan lenfositlerde, belirgin deplasyon oluşturma kapasitesine sahiptir. Bu olgu, yaşamlarının ilk üç haftasında enfekte olan civcivlerde çok daha belirgin bir haldedir (133).

IBD aşılarının bazı şuşlarının, genç hayvanlara uygulandığında belirgin bir immunsupresyon oluşturduğu görülmüştür (106) Birçok kanatlı sürüsü, IBDV ile karşılaşmaktadır fakat bunların tamamında immunsupresyon oluşmamaktadır. Bu problemin ortaya çıktığı sürüler, virusla erken karşılaşan ve maternal antikor titresi düşük olan sürülerdir. Mussket ve ark. (106), yaptıkları çalışmada, IBDV'den etkilenmiş hayvanlarda; Bursa Fabricious Ağırlığı/Vücut Ağırlığı oranı 1gr/Kg'dan daha az olduğu tespit edilmiştir.

Zayıf antikor cevabının bir sebebi ise mikotoksinlerdir. Yemlerinde 0,625 ppm düzeyinde Aflatoksin bulunan hayvanlarda, Bursa Fabricious ağırlığında ciddi bir azalma ve antikor üretiminde ciddi bir gecikme görülmüştür (134).

### **1.10. Amaç**

IBD enfeksiyonu ile mücadelenin esasını inaktif ve canlı aşılar kullanılarak yapılan aşılama programı uygulaması oluşturmaktadır. Bu çalışmada, ticari sürülerde yaygın olarak aşılama uygulandığı için maternal antikor miktarları yanında, farklı aşılama prosedürlerine bağlı olarak gelişen antikor titre değişimi ile salgınların geliştiği sürülerde farklı aşılama programlarının uygulanmasının enfeksiyonun önlenmesindeki etkisini incelemek amaçlanmıştır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal ve Metot

#### 2.1.1. Materyal

##### 2.1.1.1. Hayvan materyali ve örnekleme

Çalışmada Afyonkarahisar ilinde bulunan, yumurtacı tavuk yetiştirilen 6 adet çiftlikten örnekleme yapıldı. Bu örnekleme yapılırken, Türkiye’de kullanılan ticari ırkların büyük bir kısmı test grubuna dahil edildi. Örnekleme yapılan ırklar; Hy-line Brown, Hy-line W-36, Nick Brown, Lohmann Brown, Lohmann Lsl ve Bowans White’dir. Bu ırkların çiftlik girişleri 10.03.2006 ile 27.09.2006 tarihleri arasındadır.

Sürülerin üçünde ilk aşılama inaktif ile başlanmış (sürü 2, 3, 5) ve canlı aşılama ile devam edilmiştir. üçünde ise (1, 4, 6) canlı tip ile uygulama başlamış, 1 doz inaktif ve 2 doz canlı aşı ile program sonlandırılmıştır. Tüm sürülerde aynı tip aşı kullanılmış, inaktif aşılama ense bölgesine deri altına enjeksiyon (0.5cc), canlı aşılama ise içme sularına karıştırılarak oral yoldan uygulanmıştır (2 satte tüketeceği su ile).

Kullanılan toplam 6 sürüden, 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 ve 70 günlerde örnekleme yapıldı. Her örneklemede, kümeste daha önce belirlenmiş 10’ar adet civcivden kan serum örnekleri alındı. Enfeksiyonun klinik bulgularının gözlemlendiği bir adet sürüde (Sürü 1), enfeksiyonun başladığı 33. günde de örnek alındı ve titre artışının saptanabilmesi için bu sürüden ayrıca 80. günde örnekleme yapıldı. Toplam 680 kan örneği elde edildi.

## 2.1.2. Metot

### 2.1.2.1. ELISA testi

IBD spesifik antikorların varlık ve titrelerinin belirlenmesi amacıyla geliştirilen ticari indirekt IBD kit (Synbiotics, USA) kullanıldı.

Civcivlerden elde edilen serum örnekleri ile kontrol serumlar dilution buffer ile 1:50 oranında boş bir pleytte sulandırıldı. Pozitif kontrol serum pleytlerin A1-A3, negatif kontrol serum B1-B3 gözlerine, test edilecek serumlar ise test protokolüne uygun olarak sulandırma pleytlerinin diğer gözlerinde sulandırıldı. Daha sonra inaktif IBD antijen kaplı olan test pleytlerinin tüm gözlerine 50µl dilution buffer konuldu ve sulandırma pleytlerindeki sulandırmalardan 50'şer mikrolitre multikanal pipetlerle alınarak test pleytlerine aktarıldı. Pleytler antijen-antikor bağlanmasının gerçekleşebilmesi için 30dk inkubasyona bırakıldı. Tüm inkubasyon aşamaları oda ısısında yapıldı.

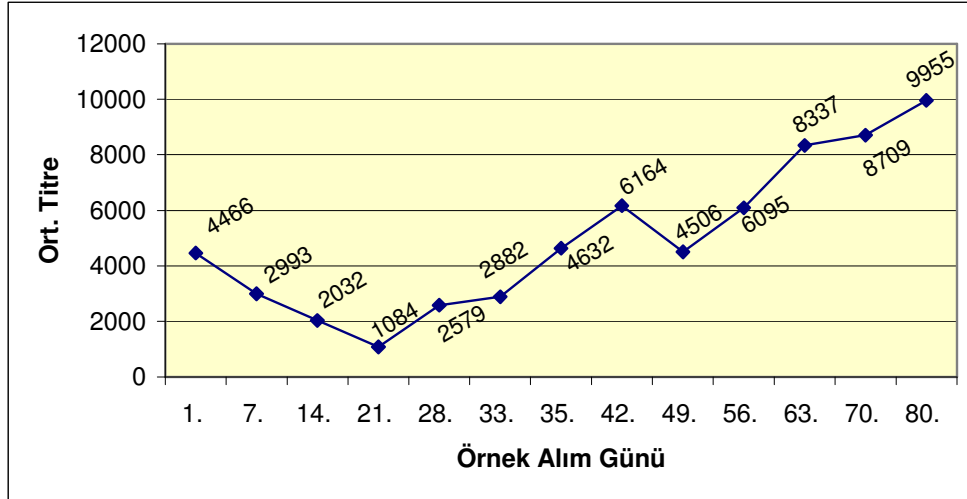
Süre sonunda konsantre wash solution distile su ile 1:20 oranında sulandırılarak hazırlanan yıkama solusyonu ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Tüm gözlere dilution buffer ile 1:100 oranında sulandırılmış peroksidaz konjugat [purifiye edilmiş keçi anti-chicken Ig G (H+I)] 100'er µl konuldu ve tekrar 30dk inkubasyona bırakıldı. Toplam 3 kez yapılan ikinci yıkama işleminin ardından 100µl substrat (ABTS-Hydrogen Peroxide Substrate Solution) tüm gözlere ilave edildi ve 15 dk sonrasında distile su ile 1:5 sulandırması hazırlanan stop solusyon eşit miktarda eklenerek reaksiyonun durması sağlandı. Test pleytleri ELISA okuyucuda 405nm'de okundu ve elde edilen Optical Density (OD) verileri test protokolünde önerilen şekilde hesaplanarak antikor titre değerleri elde edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. ELISA Testi

Çalışmada kullanılan 1. sürüde 6. gün canlı IBD, 7. gün inaktif aşı yapılmıştır. Daha sonra 14. ve 21. günlerde de yine canlı rapel uygulaması yapılmıştır. Sürüde 33. günde hastalık bulgularına rastlandı. Toplam 6 gün süren enfeksiyon sonunda %4.5 mortalite oluşumu gözlemlendi, 28. ve 33. günler arası antikor artışı düşük, 33. ve 35. günler arası antikor artışının yüksek olduğu tespit edildi. Hayvanların sahip olduğu antikor seviyesi, 49. günde, 42. günde sahip olduklarından düşük olduğu tespit edildi.

**Grafik 1:** 1. Sürü / Hy-Line Brown



33. günde civcivlerin kendi arkalarını gagalamaları ve normalin üzerinde günlük ölümün artmasıyla fark edilen hastalık esnasında, yapılan dış bakıda hayvanlarının arka tüylerinin kirlenmiş olduğu, iştahın normale göre azaldığı, beyaz ve sulu ishalin bulunduğu (Resim 2), tüylerin kabarmış olduğu ve hayvanların genel olarak aşırı depresif olduğu (Resim 1) tespit edilmiştir. Bu kısımda verilen resimler sürü 1'de çıkan salgında etkilenen hayvanlar olup, henüz ölmüş olan bireylerin otopsileri yapılmış ve resimlenmişlerdir.

Laboratuarda yapılan otopsi dış bakısında, ölen hayvanların genel olarak dehidratik olduğu, bacak ve göğüs kaslarında noktasal, yer yer de yaygın hemoraji odaklarının olduğu (Resim 3) gözlemlendi. Böbreklerinin renklerinin normale göre çok daha açık renkli olduğu (Resim 4), proventriculus ve ventriculus geçmişinde kanamaların olduğu ve Bursa Fabricius'un normale göre çok büyük olduğu tespit edilmiştir.

Bursa Fabriciuslarda yapılan incelemede; bursal yüzeyin ödemli, kısmen peteşilere ve hemorojilere sahip olduğu ve yüzeyinin sarı renge yakın bir transudat ile kaplı olduğu gözlemlendi.

**Resim 1:** Sağlıklı (Solda) ve hastalığa yakalanmış piliçler. (1. Sürü)



**Resim 2:** Beyaz ve sulu ishal. (1. Sürü)

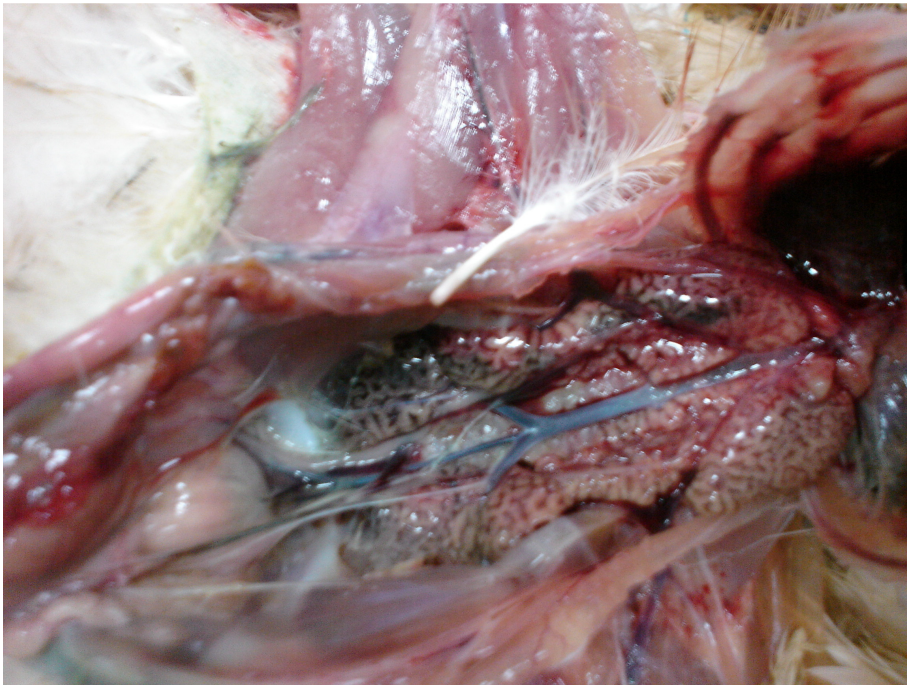


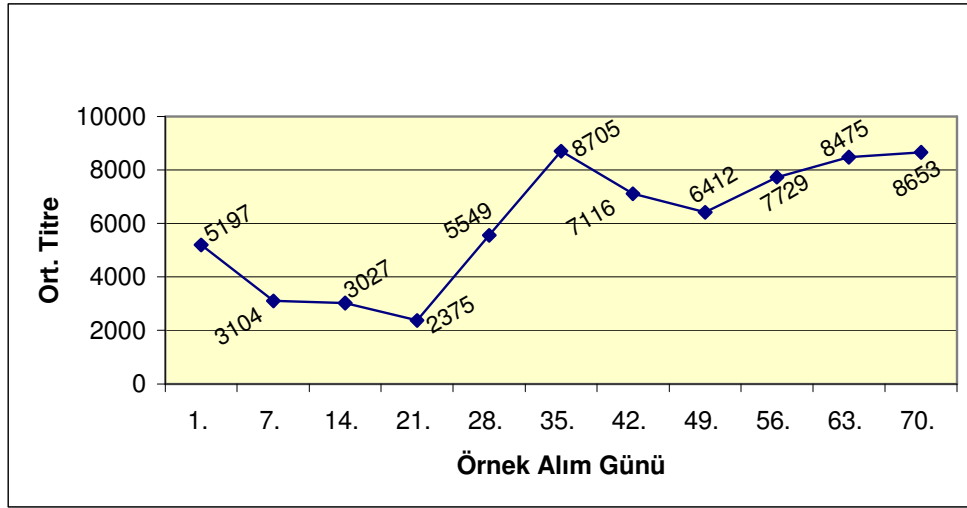


**Resim 3:** Bacak ve göğüs kaslarında hemoraji odakları. (1. Sürü)

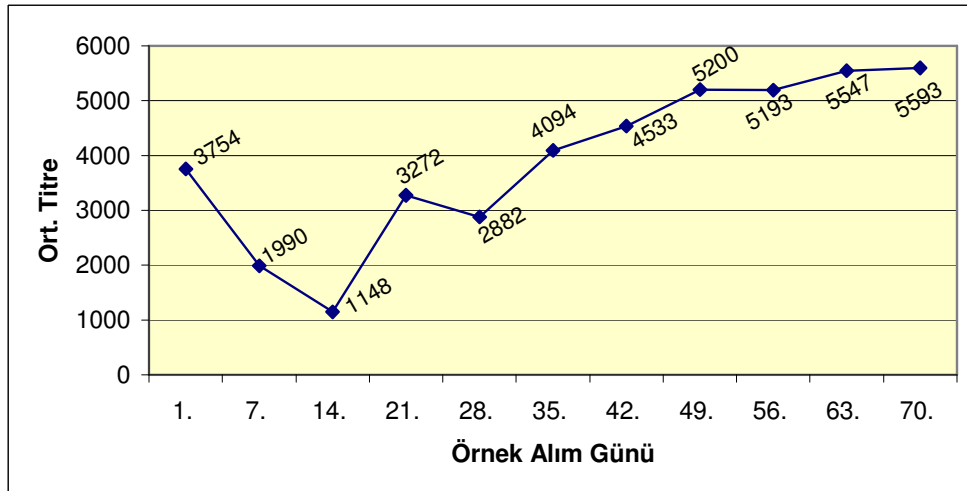


**Resim 4:** Rengi normale göre açık böbrekler ve büyümüş Bursa Fabricius. (1. Sürü)

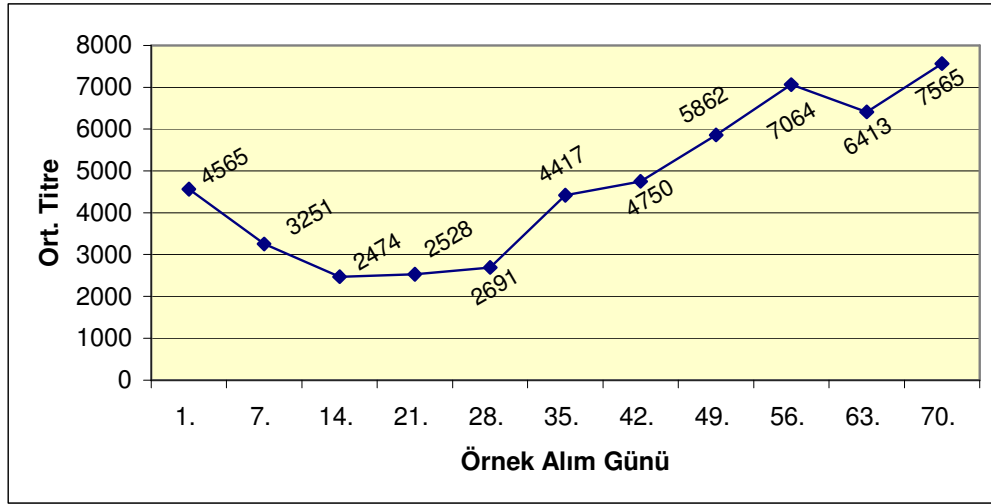


**Grafik 2:** 2. Sürü / Hy-Line White

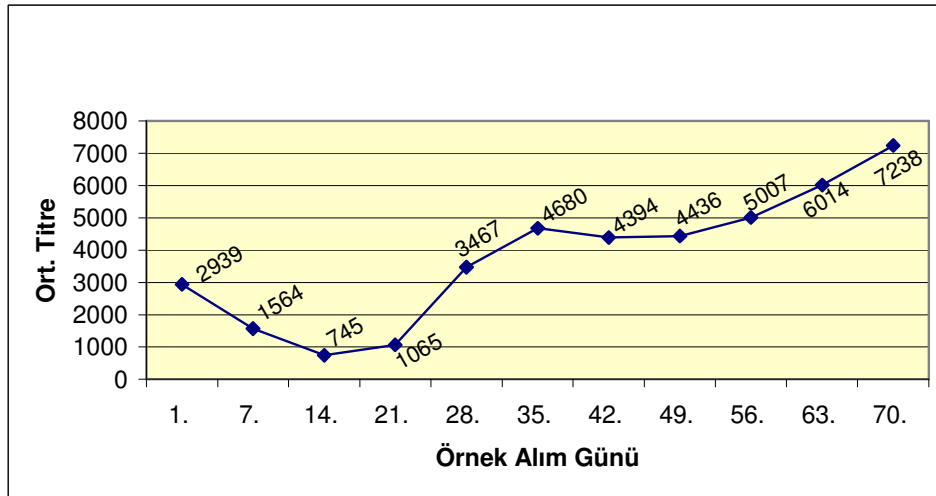
Çalışmada kullanılan 2. sürüde; 7. gün inaktif IBD, 14. gün canlı IBD, yapılmıştır. Daha sonra 21. ve 28. günlerde de yine canlı rapel uygulaması yapılmıştır. Sürüde 37. günde hastalık bulgularına rastlandı. Toplam 8 gün süren enfeksiyon sonunda %8.5 Mortalite oluşumu gözlemlendi. Tam olarak 35. günde pik seviyesine ulaşan antikor titresininin 42. ve 49. günlere doğru düşüş gösterdiği, 56. gün ve ardından da artış gösterdiği tespit edilmiştir.

**Grafik 3:** 3. Sürü / Nick Brown

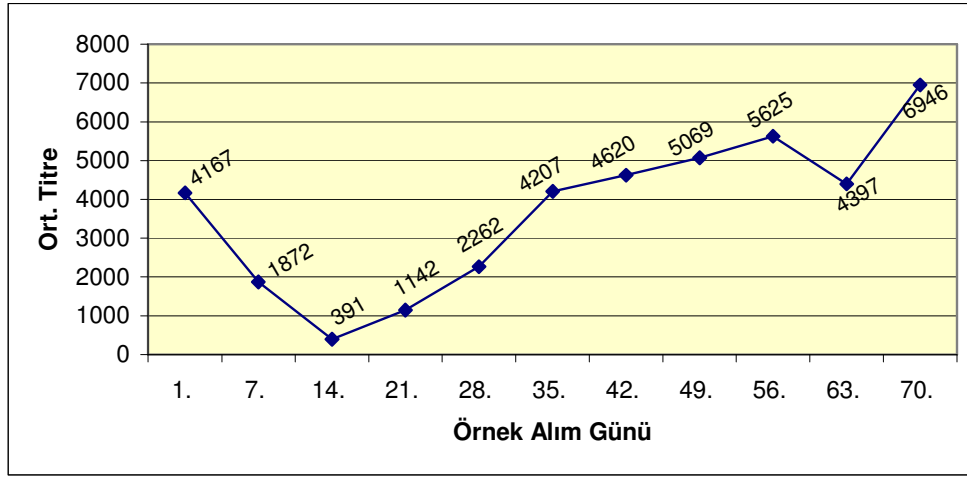
Çalışmada kullanılan 3. sürüde; 8. gün inaktif IBD, 13. gün canlı IBD, yapılmıştır. Daha sonra 20. günde de yine canlı rapel uygulaması ile devam edilmiştir, 28. gün tespit edilen ortalama titrenin, 21. günden, ayrıca 56. gün tespit edilen ortalama titrenin 49. gün tespit edilenden düşük olduğu tespit edilmiştir.

**Grafik 4:** 4. Sürü / Lohmann Brown

Çalışmada kullanılan 4. sürüde; 7. gün canlı IBD, 10. gün inaktif aşı uygulanmıştır. Daha sonra 15. ve 22. günde de yine canlı rapel uygulaması yapılmıştır. 63. gün elde edilen ortalama titrenin, 56. günden düşük olduğu ve ortalama titrenin 70. günde tekrar yükseldiği gözlenmiştir.

**Grafik 5:** 5. Sürü / Bowans White

Çalışmada kullanılan 5. sürüde; 7. gün inaktif IBD, 11. gün canlı aşı uygulanmıştır. Daha sonra 18. ve 26. günde de yine canlı rapel uygulaması yapılmıştır.

**Grafik 6:** 6. Sürü / Lohmann LSL

Araştırmada kullanılan 6. sürüde; 8. gün canlı IBD, 11. gün inaktif aşı, daha sonra 15. ve 21. günde de yine canlı rapel uygulaması yapılmıştır. Ondördüncü günden 56. güne kadar düzenli bir şekilde artış gösteren ortalama IBD titresinin, 63. günde şiddetli bir düşüş gösterdiği ve 70. günde tekrar yükseldiği tespit edilmiştir.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

İlk defa ABD'nin Gumboro bölgesinde saptanan Enfeksiyöz Bursal Hastalık (IBD) (3), 1962 yılından bu yana dünyanın birçok yerinde salgınlara neden olarak büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Düzenli ve kontrollü uygulanan aşılama programlarına rağmen özellikle son yıllarda ABD'de, Avrupa'da, Ortadoğu'da, Afrika'da ve Türkiye'de şiddetli Gumboro salgınları ortaya çıktığı bildirilmektedir (10).

IBDV, Türkiye'de ilk olarak Kandil tarafından 1978 yılında Çukurova bölgesinde bir broyler sürüsünden izole edilmiş ve serolojik olarak da virusa karşı şekillenen antikorların varlığı ortaya konulmuştur (11).

Ülkemizde 1983-1992 yılları arasında görülen IBD infeksiyonlarında ölüm oranı %2-5 arasında iken, 1993 yılından sonra %50, hatta bazı ticari yumurtacılar da %80'lere varan mortalitelerin oluştuğu bildirilmiştir (135).

IBDV çevresel koşullara oldukça dirençli bir virus olduğundan, hastalık çıkan kümeslerin temizliğinde ve dezenfeksiyonunda uygun olmayan kimyasalların seçilmesi, kümes hijyeninin düşük olması, uygulanan aşı programı ve seçilen yanlış tip aşılar, hastalığın sonradan aynı çiftliğe yerleştirilen sürülerde daha erken ve güçlü bir şekilde ortaya çıkmasına yol açmaktadır (49, 50).

Bu tez çalışmasında; Afyonkarahisar ilinde bulunan yumurtacı tavuk yetiştirilen 6 adet çiftlikten 0, 7, 14,21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 ve 70 günlerde kan örneği alınarak IBDV'ye karşı oluşan antikor miktarları tespit edildi. Bu sürülerden 1 ve 2 numaralı sürüde, klinik olarak IBD tespit edildi.

Çalışma süresince hastalık tespit edilen sürülerde ölen hayvanların genel olarak dehidratik ve aşırı depresif olduğu (Resim 1), sulu beyaz renkli ishalin (Resim 2) ve bacak ve göğüs kaslarında noktasal hemoroji odaklarının bulunduğu (Resim 3)

gözlendi. Böbreklerinin renklerinin normale göre çok açık renkli olduğu (Resim 4), proventriculus ve ventriculus geçişinde kanamaların olduğu ve Bursa Fabricius'un normale göre çok büyük olduğu tespit edilmiştir.

Bursa Fabriciuslarda yapılan incelemede; kesit yüzeyinin ödemli, kısmen peteşilere ve hemorojilere sahip olduğu ve yüzeyinin sarı renge yakın bir transudat ile kaplı olduğu gözlenmiştir.

Çalışmada kullanılan 1. sürüde; 33. günde hastalık bulgularına rastlanmıştır. Bu sebepten dolayı rutin kan alım günlerini dışında 33. gün ve 80. günde de bu sürüden kan alımı gerçekleştirilmiştir. Altı gün süren enfeksiyon sonunda %4.5 mortalite oluşumu gözlenmiştir. Tespit edilen antikor miktarının, 33. gün ile 35. günler arasında hızlı bir artış gösterdiği tespit edilmiş, bu artışın ise etkene karşı daha önce yapılan aşılama çalışmalarının sonucu oluşan hücresel ve humoral bağışıklığın bir sonucu olarak geliştiği düşünülmüştür.

Bununla birlikte 49. günde tespit edilen antikor miktarı, normalin dışında olarak 42. gün tespit edilen titreden daha düşüktür. Bu düşüklüğün sebebinin ise sürüye 46. gün uygulanan Salmonella Gallinarum baktirini (Ense bölgesi, deri altı enjeksiyon, 0,2cc) uygulaması esnasında ortaya çıkan stres faktörünün yol açtığı düşünülmektedir. Daha sonra 49. günün ardından 56. gün ve sonrasında antikor titresi düzenli bir şekilde artmış ve 70. günde çalışmadaki diğer sürülerin 70. gün antikor değerlerinin tamamından daha yüksek bir seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir. Bu duruma sebep olan faktörün ise, hastalık etkenine karşı yapılan aşılama sonrası ardından (primer immun yanıt) etkenle karşılaşan immun sistemin, normal aşılama sonrası sonucunda üreteceği antikorlardan çok daha fazla antikor üretmesi olduğu düşünülmüştür (sekonder immun yanıt).

Kullanılan 2. sürüde; 37. günde hastalık bulgularına rastlanmıştır. Yaklaşık olarak 8 gün süren hastalık sonucunda %8.5 mortalite oluşumu gözlenmiştir. Hastalığın başlamasından 2 gün önce, 35. gün de alınan kan örneklerinde çok yüksek antikor titresinin tespit edilip buna rağmen %8.5 gibi ciddi bir oranda mortalite

oluşması ile 35. günde alınan 10 örneğin bireysel değerleri incelendiğinde, titre değerlerin oldukça homojen olduğunun görülmesi gibi veriler birlikte değerlendirildiğinde, sürüye bir şekilde bulaşmış olan suşun varyant olabileceği, en önemli olasılık olarak ortaya çıkmaktadır.

Üçüncü sürüde klinik olarak hastalığa rastlanmamıştır. Bununla birlikte, 28. gün elde edilen antikor titresinin olması gereken aksine 21. gün elde edilene göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durumun iki sebebe bağlı olabileceği düşünülmüştür. Birincisi, söz konusu yaş aralığında hayvanlar IBD etkenine maruz kalıp, bir kısım antikorlarını etkeni nötralize etmek için kaybetmiş olabileceği ve ardından sekonder immun yanıtla antikor miktarında artış oluşturabileceğidir. İkincisi ise; tespit edilememiş stres faktörlerinin hayvanların immun sistemini etkileyip kandaki antikor miktarının azalmasına sebep olabileceği olasılığıdır. Ancak, her iki olasılığı destekleyecek bir klinik semptom veya stres faktörü tespit edilememiştir.

Ayrıca 56. gün tespit edilen antikor titresinin, 49. gün tespit edilen titreden normalin aksine düşük olmasının sebebinin, hayvanlara 53. gün uygulanan İnfeksiöz Koriza (Göğüs bölgesi, kas içi enjeksiyon, 0,5cc) ve Salmonella Gallinarum bakterinlerinin ve uygulamasının oluşturduğu stres olabileceği düşünülmektedir.

Araştırılan 4. sürüde 63. günde tespit edilen antikor titresinin 56. günde tespit edilen antikor titresinden düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun sebebinin, sürüye 58. gün uygulanan Salmonella Gallinarum bakterininin yol açtığı stres olabileceği ön görülmektedir.

Örneklenen 5 numaralı sürüde yine klinik olarak hastalığa rastlanmamış olmasına rağmen, 42. günde alınan kan örneklerinde tespit edilen antikor titresi, 35. günde tespit edilen antikor titresinden daha düşük olduğu belirlenmiş, fakat titrenin 49. günde de az bir artış gösterdiği saptanmıştır. Bu duruma o dönemin (Temmuz ayı) çevre sıcaklığının fazlalığının oluşturduğu stresin yol açmış olabileceği düşünülmüştür.

Altıncı sürüde 63. günde alınan kan örneklerinde tespit edilen antikor titresini 56. günde tespit edilen antikor miktarından düşüktür. Sürünün 60. gün iki çiftliğe ayrılması ve insan manipülasyonu faktörünün hayvanların ürküp strese girmesine neden olduğu sonucuna varılmıştır.

IBD enfeksiyonunun kontrolünde en kullanışlı yöntem aşılama değildir ancak maternal immunitenin değişkenliği, işletmelerin yönetim şartları ve operasyonel faktörlerin farklılık göstermesi nedeniyle, “uluslararası bir aşılama programı” önerilememektedir (1). Çevresel koşulların kontrol altında tutulabildiği ve yüksek maternal antikor titresinin sağlanabildiği broyler sürülerde IBD için aşılama ihtiyacı duyulmayabilir. Fakat ortalama kesim yaşı çok daha yüksek olan yumurtacı sürülerde aşılama zorunlu bir ihtiyaç olarak ortaya çıkmaktadır. Bu durumda pratik anlamda en önemli problem aşılama zamanının belirlenmesidir. Yüksek maternal antikorlar normal olarak civcivleri ilk 1 ila 3 hafta arasında korumaktadır ancak bireyler arasında olası titre farklılıkları, sürüde senkronizasyon konusunda sorun yaratabilmektedir. Bu sorunun en uygun çözümü, antikor taraması yapılarak titrenin belirlenmesidir ancak bu uygulama pratikte her zaman kullanılamayabilmektedir.

Bu çalışmada, ticari yumurtacı işletmelerde aşı uygulama zamanlarına bağlı olarak, farklı zamanlarda guruplardan kan örnekleri alınmış, antikor titrelerinin değişimini incelenmiş ve sürülerde yapılan uygulamalar ile işletme şartlarına bağlı faktörlerin titre değişimini ne ölçüde etkilediği araştırılmıştır. Sonuç olarak, çalışılan tüm sürülerde maternal antikorların civcivleri ilk bir hafta süresince koruduğu ancak 6-8. günlere doğru bu titrenin hızla düştüğü görülmektedir. İlk doz aşı uygulamasının da bu günlerde yapılması, doğru bir zamanlama seçildiğini göstermektedir. Çalışılan 6 sürünün üçünde aşılama inaktif, üçünde ise canlı aşı ile başlanmıştır. Rutin prosedüre uygun olarak aşılama inaktif aşı ile başlamaktadır, bunun amacı antikor seviyesini kritik dönem olan yaklaşık 25-40. günlerde pik seviyeye ulaştırmaktır, bu uygulama 3 sürüde yapılmıştır (Sürü 2, 3 ve 5).



Normal şartlarda, inaktif aşılama ile elde edilen humoral koruma beklentilere cevap vermektedir, ancak çevrede virusun bulunduğu ve bulaşma riskinin çok fazla olduğu işletmelerde daha yüksek titre oluşumu istenmekte ve bu nedenle hücrel olarak da immun sistemi uyarmak gerektiğinden canlı aşı ile uygulama gerekliliği doğmaktadır. Çalışılan diğer 3 sürüde ise aşılama canlı aşılarla başlamıştır. Bu üç çiftlikte (Sürü 1, 4 ve 6) yapılan birönceki yetiştirme döneminde IBD enfeksiyonuna rastlanmıştır. Etkenin çevresel şartlarda dayanıklılığı da göz önüne alındığında bu uygulama mantıklı görülmektedir.

Ancak canlı aşı ile başlanan uygulamaya rağmen 1 numaralı sürüde 33. günde enfeksiyon görülmüştür. Bu çiftlikte bir yetiştirme dönemi önce, inaktif aşı ile başlanan aşılama programına rağmen enfeksiyona rastlanmış ve %23 mortalite bildirilmiştir. Çalışılan dönemde bu program değiştirilerek canlı aşı ile aşlamaya başlanılmış ve bu dönemdeki mortalite sadece %4.5 olarak gerçekleşmiştir. Enfeksiyonun ortaya çıkması her ne kadar başarısızlık gibi görünmesine rağmen, mortalite oranları değerlendirildiğinde belli bir düzelme olduğu kanısına varılmıştır. Aynı çiftlikte, bir sonraki yetiştirme döneminde enfeksiyon görülmemesi, bu aşılama sisteminin problemin çözümünde etkili olduğunu göstermektedir.

Çalışılan tüm sürülerin dördünde (Sürü 3, 4, 5 ve 6) titre azalışının 14. güne kadar devam ettiği, yaklaşık 14. günde tüm sürülerde canlı aşı uygulandığı, 1 ve 2 numaralı sürüler hariç tümünde titre artışı geliştiği görülmektedir. Bir ve iki numaralı sürülerde ise bu azalışın 3. haftaya kadar devam ettiği belirlenmiş, muhtemel nedenin ise bu çiftliklerde kısa süre önce enfeksiyon görüldüğünden bu durum çevredeki virus yüküne bağlı olarak viral challenge oluşumu olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir..

Daha sonra tüm sürülerde sürü bazında değişmekle birlikte, ortalama 15 ile 26. günler arasında iki doz canlı rapel uygulaması yapılmış ve buna bağlı olarak tüm sürülerde hızlı ve düzenli titre artışları belirlenmiştir. Tek istisna olarak 6. sürüde 60. günde önemli bir azalma saptanmış ve bunun sürünün iki eşit parçaya bölünebilmesi için yapılan manipülasyon zamanına uygun olduğu saptanmıştır. Yine yukarıda

belirtildiği gibi, sürülerde diğer enfeksiyonlar için yapılan aşı uygulamalarının zamanları ile (49 ile 58. günler arası) IBD antikor titre değişimi incelendiğinde, aralarında çok açık bir paralellik olduğu gözlenmektedir.

IBD için optimal aşılama zamanının belirlenmesinde, araştırmalar ağırlıklı olarak broyler sürülerde yapılmıştır (136). IBD için sahada şartlarında uygulanmak üzere önerilen net bir aşılama programı bulunmamaktadır, çünkü maternal antikor seviyeleri ve yetiştirme şartlarına bağlı yarılanma ömürleri farklılık göstermektedir. Irksal özellikler etkili olmakla birlikte, damızlık, ticari yumurtacı ve ticari broyler ırklarında maternal antikorların yarılanma ömürleri farklı değerlendirilir, bu durumun büyük ölçüde yetiştirmeye bağlı olduğu düşünülmektedir. Aşı virusun maternal antikorlar tarafından interfere edilmesi ile (118, 137) aşıya cevabın gecikmesine veya humoral yanıtın önlenmesine yol açabilmektedir, bu ise sahada karşılaşılan en büyük problemlerden biridir. Sürülere ait maternal antikor seviyesi, üretim amacı ve buna bağlı yarılanma ömrü, örnek alım yaşı, hayvanların antikor uniformitesi ve uygulanacak aşının tipi gibi faktörlerin Deventer formülüne göre hesaplanması ile optimal aşı zamanının belirlenmesi ve saptanacak programa uygun aşılama prosedürünün uygulanması en etkili koruma yöntemi olarak önerilmektedir.

Stres faktörleri ile immun yanıt arasında negatif bir bağıntı olduğu bilinmektedir. Çalışılan sürülerde aşılama amaçlı yapılan bu manipulasyonların hemen sonrasında korkuya bağlı antikor titre düşüşü kısa bir süre için net olarak gözlenmektedir. Korku merkezi beyinde Limbik sistemdeki Amigdala'da lokalizedir. İnsanlarda amigdalanın uyarımı korku duyusunu harekete geçirir (138), 20'den fazla hayvan türünde yapılan çalışmalarda benzer veriler elde edilmiştir ve amigdala'da lezyon oluşumu durumlarında korku duyusunun bloke olduğu saptanmıştır (139). Korku olgusunu takiben immun yanıtı güçlü bir şekilde baskılayan kortizon salınımı gerçekleşir (140, 141).

Stres ve immun yanıt arasındaki bağıntı bilinen bir olgudur. Elverişsiz çevresel faktörler, yetersiz beslenme, hastalıklar önemli stres faktörleri olmakla birlikte özellikle insan manipulasyonlarına bağlı korku da önemli bir yere sahiptir, kortizon

salınımına yol açtığından immun sistem baskılanmakta, aşılama ve aşılama izleyen dönemde antikor titre artışı genellikle beklenen seviyenin altında kalmaktadır. Kanatlılarda konu ile ilgili net bildirim bulunmamakla birlikte, bir çok türde korkuya bağlı gelişim geriliği (142), verim azalması, reproduktif problemler (142-144), immun yanıtta azalma (145-147) bildirilmiştir. Her ne kadar bu konuda IBD için spesifik bir bildirim bulunmamasına rağmen, evcil kanatlılarda strese bağlı olumsuzluklar bilinmektedir (148) ve stres ile immun yanıt arasındaki korelasyon bu çalışmada da net olarak gözlenmiştir.

Ticari tüm sürülerde, özellikle yumurtacı işletmelerde yoğun olarak ve aşı prosedürlerine dikkatle uyularak aşı uygulaması yapılmaktadır. Ancak, aşı ve dezenfeksiyon gibi, kontrol amacıyla en fazla kullanılan bu yöntemlerin uygulanıyor olmasına rağmen, zaman zaman salgınlar ortaya çıkabilmektedir. Bazı işletmelerde belirlenebilir bir sebep de bulunmayabilmektedir. Bu durumda, işletme koşulları ile çevresel etkenler gözden geçirilmeli, ayrıca köpekler ve rodentler gibi bulaşmada daha az önemli olan faktörler de düşünülmelidir.

Sonuç olarak bu çalışmada, sahada farklı uygulanan aşılama prosedürlerine bağlı olarak antikor titre değişimleri incelenmiş, şekillenen salgınların uygulamaya konulacak değişik aşılama stratejileriyle önlenilebileceği ve ekonomik kayıpların önemli ölçüde azaltılabileceği belirlenmiştir. Ayrıca manipülatif müdahalelerin antikor titre artışı üzerinde olumsuz etkileri olduğu net olarak saptanmıştır.

**KAYNAKLAR**

1. Lukert P.D., Saif, Y.M. (2003) Infectious bursal disease. In: Ed.: Calnek, B. W., Barnes. H. J., Beard, C. W., McDougald, L. R., Saif, Y. M. (Eds) *Diseases of Poultry. 11th ed. Iowa State University Press., Ames. Iowa, USA.* s: 161-180.
2. Van Den Berg T.P. (2000) Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol* **29**, 175-194.
3. Cosgrove A.S. (1962) An apparently new disease of chickens-Avian Nephrosis. *Avian Dis* **6**, 385-389.
4. Lasher H.N., Davis. V.S. (1997) History of infectious bursal disease in the USA. The first two decades. *Avian Dis* **41**, 11-19.
5. Giambrone J.J. (2001) World Poultry Especial, October, *Elsevier International, Business Information*
6. Hitchner S.B. (1970) Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs. *Poult Sci* **49**, 511-516.
7. Faragher J.T. (1972) Infectious bursal disease of chicken. *Vet Bull* **42**, 361-369.
8. Jones B.A.H. (1986) Infectious bursal disease serology in New Zealand poultry flocks. *New Zeal Vet J* **34**; 36.
9. Lasher H.N., Shane. S.M. (1994) Infectious bursal disease. *World Poultry Sci* **50**, 133-166.
10. Etteradossi N. (1995) Progress in the diagnosis and prophylaxis of infectious bursal disease in poultry. *OIE, Paris, France* 75-82,

11. Kandil M. (1978) Hastalıklı piliçlerin bursa Fabriciiilerinde bir enfeksiyöz bursitis virüsünün izolasyonu ve bazı özellikleri üzerinde araştırmalar. *Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi. Yüksek Lisans Tezi.*
12. Ergün A. (1989) Tavukların bazı viral hastalıklarının epizootiyolojik taramasında kullanılmak üzere antijen ve antiserum hazırlanması. *Etlik Vet Mikrob Derg* **6**, 35-54.
13. Baysal T., Bozkır M. (1989) Konya Bölgesi kümes hayvanlarında IBD, ILT, EDS, IB, AE, ve adenovirus enfeksiyonlarının epizootiyolojik araştırması ve izolasyon çalışmaları. *Etlik Vet Mikrob Derg* **6**, 23-30.
14. Babila A., Ası Y., Akçadağ B., Gürel A. (1988) İstanbul ve Trakya Bölgesi kümes hayvanlarında IB, ILT, IBD, EDS, AE ve adenovirus enfeksiyonlarının epizootiyolojik araştırması ve izolasyon çalışmaları. *Pendik Hay Hast Araşt Enst Derg* **19**, 6-77.
15. Sayım Y., Akman A., Girgin H. (1988) Ankara Bölgesi kümes hayvanlarında IB, ILT, EDS, IB, AE, ve adenovirus enfeksiyonlarının epizootiyolojik araştırması ve izolasyon çalışmaları. *Etlik Vet Mikrob Derg* **6**, 83-94.
16. Türe O., Çöven F. (1999) SDS-PAGE ve western immunoblotting teknikleri kullanarak Türkiye'de izole edilen çok virulent enfeksiyöz bursal hastalığı viruslarının karşılaştırma analizi. *Turk J Vet Anim Sci* **23**, 83-92.
17. Leong J. C., Brown D., Dobos P., et al. (2000) In Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. M. H. V. Van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner (eds.). *Academic Press, San Diego*, 481-490.

18. Cho Y., Edgar S. A. (1969) Characterization of the infectious bursal agent. *Poult Sci* **48**, 2102-2109.
19. Lunger P.D., Maddux T.C. (1972) Fine-structure studies of the avian infectious bursal agent. I. In vivo viral morphogenesis. *Avian Dis* **16**, 874-893.
20. Kusters J., Becht H., Rudolph, R. (1972) Properties of the infectious bursal agent of chicken (IBA). *Med Microbiol Immunol* **157**, 291-298.
21. Müller H., Becht H. (1982) Biosynthesis of virus-specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. *J Virol* **44**, 384-392.
22. Azad A.A., Barret S.A., Fahey K.J. (1985) The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus. *Virology* **143**, 35-44.
23. Hudson P.J., McKern N.M., Power B.E., Azad. A. (1986) Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res* **14**, 5001-5012.
24. Müller. H., Nitschke, R. (1987) The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. *Virology* **159**, 174-177.
25. Spies U., Muller PL, Becht H. (1987) Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Res* **8**, 127-140.
26. Becht H. (1980) Infectious bursal disease virus. *Curr Top Microbial Immunol* **90**, 107-121.

27. Dobos P. (1979) Peptide map comparison of the proteins of infectious bursal disease virus. *J Virol* **32**,1046-1050.
28. Nagy E., Duncan P., Krell P., Dobos P. (1987) Mapping of the large RNA genome segment of infectious pancreatic necrosis virus by hibrid arrested translation. *Virology* **158**, 211-217.
29. Fahey K.J., Erny K., Crooks J. (1989) A conformational immunogen on VP2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens. *J Gen Virol* **70**, 1473-1481.
30. Becht H., Müller H., Müller H.K. (1988) Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol* **69**, 631-640.
31. Öppling. V., Müler. H., Becht., H. (1991) Heterogeneity of the antigenic site responsible for the induction of neutralizing antibodies in infectious bursal disease virus. *Arch Virol* **119**, 211-223.
32. Mundt E., Kollner B., Kretzschmar D. (1997) VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for virus replication in cell culture. *J of Virol* **71**, 5647-5651.
33. Synder D.B., Lana D. P., Cho B.R., Marquardt, W. W. (1988a) Group and strain-specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies. *Avian Dis* **32**, 527-534.
34. Jackwood D.J., Saif Y.M. (1987) Antigenic diversity of infectious bursal disease virus. *Avian Dis* **31**, 766-770.
35. McFerran J.B., McNulty M.S., McCillop E., et al. (1980) Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks, demonstration of a second serotype. *Avian Pathol* **9**, 395-404.

36. McNulty M.S. Saif Y.M. (1988) Antigenic relationship of non-serotype 1 turkey infectious bursal disease viruses. *Avian Dis* **32**, 374-375.
37. İsmail N.M, Saif Y.M., Moorhead P.D. (1988) Lack of pathogenicity of five serotype 2 infectious bursal disease viruses in chickens. *Avian Dis*, **32**: 757-759.
38. Jackwood D.J., Saif Y.M., Moorehead P. (1985) Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens. *Avian Dis* **29**, 1184-1194.
39. Jackwood D.J., Saif Y.M., Hughes J.H. (1982) Characteristics and serologic studies of two serotypes of infectious bursal disease virus in turkeys. *Avian Dis* **26**, 871-882.
40. İsmail N.M., Saif Y.M., Wigle W.L., Havensteln G. B., Jackson C. (1990) Infectious bursal disease virus variant from commercial leghorn pullets. *Avian Dis* **34**, 141-145.
41. Jackwood D.J., Saif Y.M. (1983) Prevalence of antibodies to infectious bursal disease virus serotypes I and II in 75 Ohio chicken flocks. *Avian Dis* **27**, 850-854.
42. Türe O. (1999) Türkiye'de izole edilen infeksiyöz bursal hastalığı viruslarının nükleik asitlerinin SDS-PAGP] tekniği ile incelenmesi. *Turk J Vet Anini Sci* **23**, 101-105.
43. Rosenberger J.K., Cloud S.S. (1986) Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. *J Am Vet Med Assoc* **189**: 357.
44. Jackwood D.J., Saif Y.M., Hughes J.H. (1984) Nucleic acid and structural proteins of infectious bursal disease virus isolates belonging to serotypes I and II. *Avian Dis* **28**, 990-1006.



45. Lukert P.D., Davis R.B. (1974) Infectious bursal disease virus: growth and characterization in cell cultures. *Avian Dis* **18**, 243-250.
46. Jackwood D.J., Saif Y.M., Hughes J.H. (1987) Replication of infectious bursal disease virus in continuous cell lines. *Avian Dis* **31**, 370-375.
47. Kibenge F.S. B., Dhillon A.S., Russell R.G. (1988) Growth of serotypes I and II and variant strains of infectious bursal disease virus in vero cells. *Avian Dis* **32**, 298-303.
49. Benton W.J., Cover M.S., Rosenberger J.K, Lake R. S. (1967) Physicochemical properties of the infectious bursal disease agent (IBA). *Avian Dis* **11**, 430-438.
48. Hassan M.K., Saif Y.M. (1996) Influence of the host system on the pathogenicity, immunogenicity, and antigenicity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis* **40**, 553-561.
50. Shirai L., Seki R., Kamimura R., Mitsubayashi S. (1994) Effects of invert soap with 0.05% sodium hydroxide on infectious bursal disease virus. *Avian Dis* **38**, 240-243.
51. Landgraf H.E., Vielitz E., Kirsch R. (1967) Occurrence of an infectious disease affecting the bursa of Fabricius (Gumboro disease). *Dtsch Tieraerztl Wochenschr* **74**, 6-10.
52. Pages-Mante A., Torrents D., Maldonado J., Saubi N. (2004) Dogs as potential carriers of infectious bursal disease virus. *Avian Pathology* **33**, 205-209.
53. Snedeker C., Wills F.K., Moulthrop, I.M. (1967) Some studies on the infectious bursal disease agent. *Avian Dis* **11**, 519-528.

54. Okoye J.O.A., Uche U.E. (1986) Serological evidence of infectious bursal disease virus infection in wild rats. *Acta Vet Brno* **55**, 207-209.
55. Howie R. I., Thorsen J., (1981) Identification of a strain of infectious bursal disease virus isolated from mosquitoes. *Can J Comp Med* 45(3), 315-320.
56. Chettle N.J., Stuart J.C, Wyeth P.J. (1989) Outbreaks of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *Vet Rec* **125**: 271-272.
57. Barnes H.J., Wheeler J., Reed D. (1982) Serological evidence of infectious bursal disease virus infection in Iowa turkeys. *Avian Dis* **26**, 560-565.
58. Allan W.H., Faragher J.T., Cullen G.A. (1972) Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunized against Newcastle disease. *Vet Rec* **90**, 511-512.
59. Faragher J.T., Allan W.H., Wyeth C.J. (1974) Immunosuppressive effect of infectious bursal disease agent on vaccination against Newcastle disease. *Vet Rec* **95**, 385-388.
60. Müller R., Weiss, I.K., Reinacher M., Weiss E. (1979) Immunofluorescent studies of early virus propagation after oral infection with infectious bursal disease virus (IBDV). *Zentralbl Veterinaermed Med [B]* **26**,345-352.
61. McFerran, J.B., McNulty M.S. (1993) Virus Infections in Birds, *Elsevier Science Publishers*.
62. Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.C., Studdert M.J. (1999) *Veterinary Virology, Third Edition, Academic Press, San Diego*.
63. Rosenberger J.K. (1998) A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, *4th ed, American Ass of Avian Path*.

64. Kim I.J., Gagic M., Sharma J. M. (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.
65. Sharma J.M., Kim L., Rautenschlein S., Yeh H. (2000) Infections bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev Comp Immunol*, **24**, 223-235.
66. Sharma J.M. (2003) Immunity and Immunosuppressive Diseases of Poultry, Convention notes American Association of Veterinary Medicine. World Veterinary Poultry Association.
67. Hiraga M., Nunoya T., Otaki Y., Tajima M., Saito T., Nakamura L. (1994) Pathogenesis of highly virulent infectious bursal disease virus infection in intact and bursectomized chickens. *Vet Med Sci* **56**, 1057-1063.
68. Sharma J.M., Dohms J.E., Metz A.L. (1989) Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and the effect of those viruses on humoral and cellular immune competence of specific pathogen free on chickens. *Avian Dis* **33**:112-124.
69. Giambrone J.J., Eidson C.S., Page R.K., Fletcher O.J., Barger B.O., Kleven S.H. (1976) Effect of early infectious bursal disease agent on response of chicken to Newcastle disease and Marek's disease vaccination. *Avian Dis* **20**, 534-544.
70. Sharma J.M., Karaca K., Pertile, T. (1994) Virus-induced immunosuppression in chickens. *Poultry Sci* **73**, 1082-1086.
71. Akan, M. (2002) İnfeksiyöz Bursal Hastalık. In: *Kanathı Hayvan Hastalıkları*. Eds: İzgür, M., Akan, M. Medisan Yayınevi, Ankara, s.: 169-184.

72. Van Den Berg T.P., Gonze M., Meulemans G. (1991) Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterisation of a highly virulent strain. *Avian Pathol* **20**, 133-143.
73. Cao Y.C., Yeung W.S., Law M., Bi Y.Z., Leung F.C, Lim, B. L. (1998) Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains. *Avian Dis* **42**: 340-51.
74. Etteradossi N., Arnauld C., Toquin D., Riv Allan G. (1998) Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch Virol* **143**, 1627-1636.
75. Burkhardt E., Müller H. (1987) Susceptibility of chicken blood lymphoblasts and monocytes to IBDV. *Arch Virol* **94**, 297-303.
76. Rosenberger J.K. (1989) Infectious bursal disease. In Purchase H.G., Arp L.H., Dommermuth C.H., Pearson J. E. (Eds.). A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens 3rd Ed. p.: 165-166. *Kennett Square: American Association of Avian Pathologists*.
77. Skeeles J.K., Lukert P.D., Fletcher O.J., Leonard, J.D. (1979) Immunization studies with a cell-culture-adapted infectious bursal disease virus. *Avian Dis* **23**, 456-465.
78. Tanimura N., Tsukamoto K., Nakamura K., Narita M., Maeda, M. (1995) Association between pathogenicity of infectious bursal disease virus and viral antigen distribution detected by immunochemistry. *Avian Dis* **39**, 9-20.
79. Inoue M., Fukuda M., Miyano, K. (1994) Thymic lesions in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis* **38**, 839-846.

80. Tsukamoto K., Tanimura N., Hihara H., Shirai J., Imai K., Nakamura K., Maeda M. (1992) Isolation of virulent infectious bursal disease virus from field outbreaks with high mortality in Japan. *J Vet Med Sci* **54**, 153-155.
81. Helmboldt C.F., Garner E. (1964) Experimentally induced Gumboro disease (IBA). *Avian Dis* **8**, 561-575.
82. Dohms J.K., Lee K.P., Rosenberger J.K (1981) Plasma Cell Changes in the Gland of Harder Following Infectious Bursal Disease Virus Infection of the Chicken. *Avian Dis* **25**, 683-695.
83. Winterfield R.W., Adly A.M., Bickford A. (1972) Infectivity and distribution of infectious bursal disease virus in the chicken. Persistence of the virus and lesions. *Avian Dis* **16**: 622-632.
84. Allan G.M., McNulty M.S., Connor T.J., McCracken R.M., McFerran J.B. (1984) Rapid diagnosis of infectious bursal disease infection by immunofluorescence on clinical material. *Avian Patho* **13**, 419-427.
85. Cruz-Coy J.S., Giambrone J.J., Hoerr F.J. (1993) Immunohistochemical detection of IBDV in formalin-fixed, paraffin-embedded chicken tissues using monoclonal antibody. *Avian Dis* **37**, 577-581.
86. Kwang M.L, Lu Y.S., Lee L.H., et al. (1987) Detection of infectious bursal disease viral antigen prepared from the cloacal bursa by ELISA. *J Chin Soc Vet Set* **13**, 265-269.
86. Kwang M.L, Lu Y.S., Lee L.H., et al. (1987) Detection of infectious bursal disease viral antigen prepared from the cloacal bursa by ELISA. *J Chin Soc Vet Set* **13**, 265-269.

87. Synder D.B., Lana D.P., Savage P.K., Yancey F.S., Mengel S.A., Marquardt W.W. (1988b) Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. *Avian Dis* **32**, 535-539.
88. Etteradossi N., Arnauld C., Tekaia F., et al. (1999) Antigenic and genetic relationships between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate. *Avian Pathol* **28**, 36-46.
89. Cullen G.A., Wyeth P.J. (1975) Quantitation of antibodies to infectious bursal disease. *Vet Rec* **97**, 315.
90. Synder D.B., Yancey F.S., Savage P.K. (1992) A monoclonal antibody-based agar gel precipitin test for antigenic assesment of infectious bursal disease viruses. *Avian Pathol* **21**, 153-157.
91. Liu H.J., Giambrone J.L., Hoerr F.J. (2000) In situ hybridization, immunohistochemistry, and in situ reverse transcription-polymerase chain reaction for detection of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* **44**, 161-169.
92. Wu C.C., Lin T.L., Zhang H.G., Davis V.S., Boyle J.A. (1992) Molecular Detection of Infectious Bursal Disease Virus by Polymerase Chain Reaction. *Avian Dis* **36**, 221-226.
93. Jackwood D.J. (1990) Development and characterization of nucleic acid probs to infectious bursal disease viruses. *Vet Microbiol* **24**, 253-260.
94. Davis V.S., Boyle J.A. (1990) Random cDNA probes to infectious bursal disease virus. *Avian Dis* **34**, 329-335.
95. Lee L.H., Yu S.L., Shieh H.K. (1992) Detection of infectious bursal disease virus infection using the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* **40**, 243-254.

96. Lin Z., Kato A., Otaki Y., Nakamura T., Sasmaz E., Ueda S. (1993) Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis* **37**, 315-323.
97. Zierenberg K., Nieper H., Van Den Berg T.P., Ezeokoli C.D., Vob M., Müller P.I. (2000) The VP2 variable region of African and German isolates of infectious bursal disease virus: comparison with very virulent, "classical" virulent, and attenuated tissue culture-adapted strains. *Arch Virol* **145**, 113-125.
98. Sellers H.S., Villegas P.N., Seal B.S., Jackwood D.J. (1999) Antigenic and molecular characterization of three infectious bursal disease virus field isolates. *Avian Dis* **43**, 198-206.
99. Banda A., Villegas P., El-Attrache J., Estevez C. (2001) Molecular characterization of seven field isolates of infectious bursal disease virus obtained from commercial broiler chickens. *Avian Dis* **45**, 620-630.
100. Jackwood D.J., Nielsen C.K. (1997) Detection of infectious bursal disease viruses in commercially reared chickens using the reverse transcriptase/polymerase chain reaction endonuclease assay. *Avian Dis* **41**: 137-143.
101. Jackwood D.J. (1998) *Molecular identification of infectious bursal disease virus strains. Vineland, Update., No. 62.*
102. Marquardt W.W., Johnson R.B., Odenwald W.F., Schlotthober B.A. (1980) An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis* **24**, 375-385.
103. Weisman J., Hitchner S.B. (1978) Virus neutralization versus agar-gel precipitin tests for detecting serological response to infectious bursal disease virus. *Avian Dis* **22**, 598-603.

104. De Wit J. J. (1999) Gumboro disease: optimising vaccination. *Int Poult Prod* **7**, 19-21.
105. Jackwood D.J., Sommer S. E. (1999) Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States. *Avian Dis* **43**, 310-314.
106. Muskett J.C, Hopkins I.G., Edwards K.R., Thornton D.H. (1979) Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains. Efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. *Vet Rec* **104**, 332-334.
107. Winterfield R.W., Hitchner S.B. (1962) Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am J Vet Res* **23**, 1273-1279.
108. Jordan F., Pattison M. (2002) Poultry Diseases, 5 th ed. W.B. Saunders Company, London, p: 13- 42.
109. Otim M., Muka G.M., Henrik C., Magne B. (2005) Aflatoxicosis, infectious bursal disease and immune response to Newcastle disease vaccination in rural chickens. *Avian Path* **34**, 319-323
110. Ridell C. (1996) Avian Histopathology, 2nd ed., American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania
111. Farner D.S., King J.R., Parkes K.C.(1983) AvianBiology, *Acedemic Pres, New York*, **7**, 128-148,.
112. Parkhurst R.T. (1964) On-the-farm studies of Gumboro disease in broilers. *Avian Dis* **8**, 584-596.



113. Mazareigos L.A., Lukert P.D., Brown J. (1990) Pathogenicity and Immunosuppressive Properties of Infectious Bursal Disease “Intermediate” Strains. *Avian Dis* **34**: 203-208.
114. Thornton D.H. (1977) Specifications for infectious bursal disease vaccines. *Bul. Of. In. Epiz* **88**, 199-212.
115. McFerran J.B. (1993) Infectious bursal disease. In: McFerran, J. B., McNulty (Eds) Virus infections of birds. *Elsevier Science, Amsterdam, B. V.* p.: 213-228.
116. Guittet M., Le Coq H., Picault J.P., Etteradossi N., Bennejean G. (1992) Safety of infectious bursal disease vaccines: assesment of an acceptability threshold. *Dev Biol Standard* **79**, 147-152.
117. Wyeth P.L., Chettle N.J., Mohepat, A.R. (1992) Use of an inactivated infectious bursal disease oil emulsion vaccine in commercial layer chicks. *Vet Rec* **130**: 30-32.
118. Van Den Berg T.P., Meulemans G. (1991) Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. *Avian Pathol* **20**, 409-421.
119. Wyeth P.L., Cullen G.A. (1979) The use of an inactivated infectious bursal disease oil emulsion vaccine in commercial broiler parent chickens. *Vet Rec* **104**, 188-193.
120. Heine H.G., Boyle D.B. (1993) Infectious bursal disease virus structural proteins VP2 expressed by a fowlpox virus recombinant confers protection against disease in chickens. *Arch Virol* **131**, 277-292.
121. Vakharia, V.N., Synder D B., He J., et al (1993) Infectious bursal disease virus structural proteins expressed in a baculovirus recombinant confer protection in chickens. *J Gen Virol* **74**, 1201-1206.

122. Moraes H.L. S., Salle C.T.P., Padilha A.P., et al (2004) Infectious bursal disease: evaluation of pathogenicity of commercial vaccines from Brazil in specific pathogen free chickens. *Braz J of Poultry Sci* **6**, 243-247.
123. Whitfill C.E., Haddad E.E., Ricks C.A., et al (1995) Determination of optimum formulation of novel infectious bursal disease virus vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV. *Avian Dis* **39**, 687-699.
124. Haddad E.E., Whitfill C.E., Avakian A.P., et al (1997) Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. *Avian Dis* **41**: 882-889.
125. Chang H.C, Lin T.L., Wu C.C. (2003) DNA vaccination with plasmids containing various fragments of large segment genome of infectious bursal disease virus. *Vaccine* **21**, 507-513.
126. De Wit J.J. (2003) Gumboro Disease – the optimal time for vaccination. *Int Poult Prod* **11**, 19-23.
127. McMullin P. (1985) Factors which interfere with vaccine efficacy, Proceedings of the 1st Sta. *Catarina Poultry Symposium*, s:10-20
128. Beard C.W., Brugh M. (1975) Immunity to Newcastle Disease. *Am J Vet Res* **36(4)**, 509-512.
129. Beard C.W., Easterday B.C. (1967) The influence of the route of administration of Newcastle disease virus on host response. *J Infect Dis* **117**, 55-61.
130. Davelaar F.G., Kouwenhoven B. (1977) Influence of maternal antibodies on vaccination of chicks of different ages against infectious bronchitis. *Avian Path* **6**, 41-50.

131. Wyeth P.L., Obrien J.D.P., Cullen G.A. (1981) Improved performance of progeny of broiler parent chickens vaccinated with infectious bursal disease oil-emulsion vaccine. *Avian Dis* **25**, 228-241.
132. Henry C.W., Williams W.P.(1980) The detrimental effect of vaccinating parentally immune broilers with a modified live virus vaccine for infectious bursal disease. *Avian Dis* **24**, 1021-1026.
133. Sivanandan S., Maheswaran S.K. (1980) Immune profile of infectious bursal disease. *Avian Dis* **24**, 715-742.
134. Thaxton J.P., Tung H.T., Hamilton P.B. (1974) Immunosuppression in chickens by Aflatoxin. *Poult Sci* **53**, 721-725.
135. ANON (1993,1994) Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Tavuk Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı Kayıtları, *İstanbul*
136. Block H., Meyer-Block K., Rebeski et al. (2007) A field study on the significance of vaccination against infectious bursal disease virus (IBDV) at the optimal time point in broiler flocks with maternally derived IBDV antibodies. *Avian Pathology* **36**, 401 – 409.
137. Tsukamoto K, Tanimura N., Mase M., Imai K. (1995) Comparison of virus replication efficiency in lymphoid tissues among three infectious bursal disease virus strains. *Avian Dis* **39**, 844-852.
138. Gloor P., Oliver A., Quesney L.F. (1981) The role of the amygdala in the expression of psychic phenomenon in the temporal lobe seizures. In the amygdaloid complex. *Y Ben-Ari, Elsevier* 489-498.

139. Davis M. (1992) The role of amygdala in fear and anxiety. *Ann Rev Neurosci* **15**, 353-375.
140. Matheson B.K., Branch B.J., Taylor A.N. (1971) Effects of amygdaloid stimulation on pituitary adrenal activity in conscious cats. *Brain Res* **32**, 151-67.
141. Redgate, E.S., Fahringer, E.E. (1973) A comparison of the pituitary adrenal activity elicited by electrical stimulation of preoptic, amygdaloid and hypothalamic sites in the rat brain. *Neuroendocrinology* **12**, 334-343.
142. Hemsworth P.H., Barnett J. L., Coleman G.J., Hansen C. (1989) A study of the relationships between the attitudinal and behavioral profiles of strockpersons and the level of fear of humans and reproductive performance of commercial pigs. *Appl Anim Behav Sci* **66**, 273-278.
143. Doney J.M., Smith R.G., Gunn F.G. (1976) Effects of postmating environmental stress on administration of ACTH on early embryonic loss in sheep. *J Agric Sci* **87**, 133.
144. Stoebel D.P., Moberg G.P. (1982) Repeated Acute Stress During the Follicular Phase and Luteinizing Hormone Surge of Dairy Heifers. *J Of Dairy Sci* **65**, 92-96.
145. Hastings B.E., Abbott D.E., George L.M. (1992) Stress factors influencing plasma cortisol levels and adrenal weights in chinese water deer (*Hydropotes inermis*). *Res Vet Sci* **53**, 375-80.
146. Morton D.J., Anderson E., Foggin C.M., Kock M.D., Tiran E.P. (1995). Plasma cortisol as an indicator of stress due to capture and translocation in wildlife species. *The Vet Rec* **136**, 60-63.
- 147 Grandin T. (1997). Assessment of stress during handling and transport. *J Anim Sci* **75**, 249-257.

148. Jones R. B. (1987) The assessment of fear in domestic fowl. In: Zayan R., Duncan J.H., (Eds) Cognitive aspects of social behavior in domestic fowl, *Elsevier, Amsterdam*.