

Türkiye'deki İnfeksiyöz Bursal Hastalığı Salgınlarından Çok Virulent Virusların İzolasyonu ve Serotiplendirilmesi

Olca TÜRE

Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, 35010 Bornova, İzmir-TÜRKİYE

Fethiye ÇÖVEN

Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü, 45040 Manisa-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 05.02.1997

Özet: Türkiye'nin çeşitli coğrafik bölgelerinde 1992-1994 yılları arasında infeksiyöz bursal hastalığı (IBD) geçirmekte olan veya şüpheli sürülerden toplanan bursa Fabricius (BF) materyallerinden IBD virusları (IBDV) izole edildi. Saha virusları embriyolu spesifik-patojen-free (SPF) yumurta ve civiv embriyo fibroblast (CEF) hücre kültürlerine seri kör pasajlar yapılarak adapte edildi ve virus nötralizasyon (VN) tekniğiyle serotiplendirildi.

Bu çalışmada, agar jel presipitasyon (AGP) testi ile IBDV yönünden pozitif olduğu teşhis edilen toplam 60 adet BF örneğinden sadece 20 adet izole CEF hücre kültürüne adapte olarak üredi ve IBDV'ye özgü sitopatik etki (CPE) gösterdi. Yirmi izolenin daha ileri karakterizasyonu sırasında, bu izolelerin CPE'leri IBDV'ye benzeyen başka viruslarla karışık olduğu gözlemlendi. Hemaglutinasyon (HA), kloroform duyarlılık, IUDR (5'iododeoxyuridine) önlenim, Reovirus antiserumu ile adsorbsiyon gibi bir seri testler uygulanarak IBDV karışık viruslardan arındırılmaya çalışıldı. Bu işlemler sonunda 10 adet IBDV saf olarak izole edildi.

Serotip 1 grubu klasik D78 suşu, varyant E (Ev) suşu ve serotip 2 grubu OH suşu antikorları referans kullanılarak gerçekleştirilen VN testi ile serotiplendirme çalışmasında 10 adet saha virusunun serotip 1 grubunda yer aldığı bulundu. Serotip 2 grubu ile saha virusları arasında antijenik ilişki saptanmadı.

Bu çalışma, son yıllarda ülkemizde tavukçuluk endüstrisine büyük ekonomik zararlar veren IBDV'nin serotipleri hakkında bilgiler ortaya koydu ve bundan sonraki çalışmalarda referans olarak kullanılabilir 10 adet saf Türkiye IBD virusu sağlamış oldu.

Anahtar Sözcükler: Türkiye IBDV, Çok Virulent, İzolasyon, Serotiplendirme, VN.

Isolation and Serological Characterization of Highly Virulent Viruses From Infectious Bursal Disease Outbreaks in Turkey

Abstract: Infectious bursal disease (IBD) field viruses were isolated from the bursa Fabricius (BF) materials collected from the IBD infected or suspected flocks in different geographical regions of Turkey during 1992-1994. The field viruses were adapted to embryonated specific-pathogen-free (SPF) eggs and chicken embryo fibroblast (CEF) cell cultures by serial blind passages and characterized by virus neutralization test (VN).

In this study, out of 60 BF samples that were diagnosed positive for IBDV by agar gel precipitation (AGP) test, only 20 isolates adapted and grew in CEF cell cultures and showed cytopathic effect (CPE) typical to IBDV. During further characterization of the 20 isolates, it was noticed that these isolates were mixed with other viruses which have CPE characteristics similar to IBDV. A series of tests, such as hemagglutination (HA), chloroform susceptibility, IUDR (5'iododeoxyuridine) inhibition, adsorption with Reovirus antiserum were performed in order to separate IBDV from mixed viruses. As a result of this study, 10 field IBDV viruses were isolated.

Characterization studies carried out by VN test using the reference antisera to serotype 1 group classic D78 strain, variant E (Ev) and serotype 2 group OH strain indicated that, 10 field viruses belonged to serotype 1 group. No antigenic relationship was detected between the serotype 2 group and the field viruses.

This study provided information on the serotypes of the IBD viruses that caused great economic losses to the poultry industry in Turkey in recent years, and also provided 10 IBD Turkish isolates that can be used as reference viruses in later studies.

Key Words: Turkish IBDV, Very Virulent, Isolation, Serotyping, VN.

Giriş

İnfeksiyöz bursal hastalığı (IBD) genç piliçlerin akut, çok bulaşıcı viral bir hastalığı olup, bursa Fabricius'un (BF)

şiddetli yangısı ve immunosupresyon ile karakterizedir (1, 2). Cosgrove tarafından 1962 yılında rapor edilen bu hastalık ilk kez görüldüğü kasabanın ismiyle "Gumboro" hastalığı olarak da bilinmektedir (2).

Gumboro hastalığında hedef organ bursa Fabricius'tur (3). Virus, piliçlerin BF'unun gelişiminin hızlı olduğu 3-6 haftalık dönemde B-lenfosit hücrelerini yıkıma uğratarak humoral bağışıklık sistemine zarar verir ve immunosupresyona neden olur (1, 4-6). Hastalığın klinik ve sublinik olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Üç altıncı haftalar arasındaki duyarlı yaş döneminde enfekte olan piliçlerde hastalık klinik semptomlara neden olarak, yüksek morbidite ve mortalite ile seyrederek. Klinik Gumboro hastalığında immunosupresyon genellikle geçicidir (7). Onuncu günden önce enfekte olan hayvanlarda ise hastalığın sublinik formu etkili olur ve klinik belirti göstermeksizin BF'ta meydana gelen dejenerasyon nedeniyle hayvanlarda kalıcı immunosupresyon şekillenir (1, 4-7). İmmunosupresyondan etkilenen hayvanlar daha sonraki dönemlerinde bakteriyel, viral veya paraziter pek çok hastalık etkenine karşı duyarlı hale gelir ve başka hastalıklara karşı yapılan aşılamalardan da olumsuz veya yetersiz yanıt elde edilir (8).

Gumboro hastalığı viruslarının iki serotipi mevcuttur (9-11). Serotip 1 grubu viruslar tavuklarda hastalığa neden olurlar ve virulensleri ve antijeniteleri bakımından oldukça çeşitlilik gösterirler (11-17). Serotip 1 grubu içinde klasik antijenik yapıdaki viruslar yanında antijenik ve patojenik özellikleriyle klasik viruslardan çok farklı varyant viruslar, ilk kez 1985 yılında A.B.D.'nin Delaware eyaletinde sublinik enfeksiyonlardan izole edilmiştir (15). Serotip 1 grubu içindeki bu antijenik alt tiplerin sahadaki aşı başarısızlıklarında rollerinin olduğu düşünülmektedir (17). Hindilerden orijin alan serotip 2 viruslarının hindi ve tavuklarda patojen olmadığı bildirilmiştir (9, 18, 19).

Gumboro hastalığına neden olan virus Birnaviridae familyasında yer alır (20). İnfeksiyöz bursal hastalığı virusu 58-60 nm çapında, zarfsız-ikozahedral bir simetriye sahiptir ve genomu çift segmentli, çift sarmallı RNA yapısındadır (21, 22). İnfeksiyöz bursal hastalığı virusu dış ortama ve dezenfektanlara oldukça dirençlidir, o nedenle mücadelesi çok güç bir virustur (8). Hastalıkla mücadelede en önemli unsurlar; sanitasyon ve hijyenik koşulların iyi durumda olması, izolasyon önlemleri ve aşılamalardır.

Gumboro hastalığının son yıllarda tavuk hastalıkları arasında önem kazanmasının başlıca nedeni, ani ve spontan olarak ortaya çıkan çok virulent IBDV'nin meydana getirdiği yüksek ölüm ile sonuçlanan salgınlardır. İnfeksiyöz bursal hastalığı dünyada ilk ortaya çıktığı yıllardan 1987 yılına kadar en fazla %20-30 gibi bir ölüm oranıyla seyretmekte idi (8). Belçika'da 1987 yılında

başlayan, broylerde %5-30, yumurtacılar da %70 gibi yüksek ölümlere yol açan çok virulent IBDV'nin neden olduğu salgınlar kısa sürede Avrupa, Orta Doğu, Güney Afrika ve Orta Asya ülkelerine yayıldı (23-31). Ülkemizde de 1990 yılından bu yana yüksek mortalite ile seyreden, ancak alınan önlemlerle son zamanlarda hafifleyen salgınlar yaşanmıştır. Türkiye tavukçuluk endüstrisi hastalığın direkt ve indirekt etkilerinden dolayı büyük ekonomik zarara uğramıştır.

Türkiye'de IBDV ilk olarak 1978 yılında Çukurova bölgesinde bir broyler sürüsünden izole edilmiş ve serolojik olarak da virus varlığı ortaya konmuştur (32). Daha sonra ülkenin çeşitli yerlerinden toplanan materyallerden virus izolasyonu gerçekleştirilmiştir (33). Seksenli yılların sonuna doğru aşısız sürülerde AGP testiyle yapılan tarama çalışmalarında hastalığın İstanbul bölgesinde %78.2 (34), Konya ve çevresinde %31.3 (35), Ankara ve çevresinde %63.5 (36) oranında saptandığı bildirilmiştir. Bu çalışmalardan sonra özellikle çok virulent Gumboro salgınlarının etkili olduğu 1990'lı yıllar ile ilgili ilk kapsamlı epidemiyolojik raporlar 1995 yılında sunulan iki doktora çalışması ile yayınlanmıştır (24, 37). Gumboro hastalığının son yıllarda Türkiye'deki yaygınlığını virus izolasyonu gerçekleştirerek ortaya koyan bir çalışmada, şüpheli sürülerden toplanan BF materyallerinde AGP ile %82.18 oranında pozitiflik saptandığı bildirilmektedir (24). İzole edilen virusların bazıları ile yapılan patojenite çalışmasında, saha izolelerinin SPF piliçlerde %20-100 oranında mortaliteye neden olduğu görülmüştür (24). Aynı sürülerde Newcastle hastalığı virusu, Adenovirus ve Reovirusların da IBDV ile beraber tek, ikili veya kombine olarak çeşitli oranlarda pozitiflikleri saptanmış ve sekonder olarak bulunan bu hastalık etkenlerinin Gumboro hastalığı tablosunu ağırlaştırıcı rol oynadıkları vurgulanmıştır (24). Bir başka çalışmada, yumurta ve hücre kültürü pasajı yoluyla sublinik Gumboro hastalığı şüpheli sürülerin %64.64'ünde, klinik Gumboro olaylarının %54.54'ünde IBDV izolasyonu gerçekleştirilmiştir (37). Bu çalışmada da aynı sürüler Adenovirus, Reovirus ve Newcastle hastalığı viruslarıyla yüksek oranlarda enfekte bulunmuşlardır. Aynı çalışmada, Gumboro enfeksiyonunun bazen 8, 9, 10 gün gibi erken yaşlarda görüldüğü tesbit edilmiştir. Spesifik patojen free olmayan civcivlerde yapılan patojenite çalışmasında saha viruslarının %40-60 oranında ölüme neden olduğu bulunmuştur (37). İki araştırmada elde edilen bulgular Türkiye'de çok virulent Gumboro viruslarının sahada hakim olduğu ve izole edildiği yaş grupları dikkate alınırsa virusun çevrede yaygın olduğunu ve piliçlerin çok virulent IBDV ile erken yaşta tanıştığını göstermektedir.

Bu raporda, 1992-1994 yılları arasında Türkiye'de görülen çok virulent IBD salgınlarından gerçekleştirilen virus izolasyonu çalışmaları ile ülkemize ait IBDV'lerin VN tekniği ile serotiplendirme çalışmalarının sonuçları bildirilmiştir.

Materyal ve Metot

Spesifik Patojen Free Yumurta ve Cıvciv: Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü SPF sürülerinden sağlandı.

Hücre Kültürü: Virusların çoğaltılması ve VN testlerinde 10 günlük embriyolu SPF yumurtalardan hazırlanan CEF hücre kültürleri kullanıldı. Embriyo dokularının mekanik ve enzimatik (%0.5 trypsin) parçalanmasıyla tek hücre süspansiyonu enstitünün aşı üretim protokolüne göre hazırlandı. Hücreler için büyütme vasatı olarak %8 yeni doğmuş buzağı serumu (Biogal Industries, Kat.No.04-102-1A, İsrail), %10 tryptose phosphate buyyon (TPB), %7.5 NaHCO₃, 100 IU/ml penicilline, 100mg/ml streptomycine içeren Eagle's Minimum-Essential-Medium'u (MEM) (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Almanya) kullanıldı. Virus inokulasyonundan sonra kullanılan vasatın kompozisyonu serum oranının %2'ye düşürülmesi dışında büyütme vasatı ile aynı idi. Hazırlanan tek hücre süspansiyonundan, 60 mm çapındaki cam petrilere 5 ml büyütme vasatı içinde toplam 5x10⁶ hücre, 25 cm² lik flaklara (Nunc Co., Danimarka) 8 ml içinde 7x10⁶ hücre, 175 cm²'lik cam boatlara 100-150 ml vasat içinde toplam 1x10⁸ hücre ve 96'lık hücre kültürü pleytlerine (Costar, 3595, Cambridge, MA) 5x10⁶/ml hücre içeren süspansiyondan her göze 200 ul gelecek şekilde hücre ekimi yapıldı. Hücreler 37°C'de, %5 CO₂ içeren nemli atmosferde inkübe edildi. Monolayer en az %80 oranında tamamlandığında virus inokule edildi.

Referans Viruslar: Virus nötralizasyon çalışmasında referans olarak Dr.Y.M. Saif'ten (Food Animal Health Research Program, OARDC, Wooster, OH) sağlanan serotip 1 grubu klasik virusu (D78), varyant virusu (Ev), ve bir adet serotip 2 grubu virusu (OH) kullanıldı. Daha önceden CEF adapte olan bu viruslar laboratuvara ulaştıktan sonra 2 kez daha CEF'te pasaj yapılarak çoğaltıldı ve testlerde kullanılmak üzere titre edilerek -20°C de stoklandı. IBDV'nin karışık viruslardan arındırma çalışmasında kullanılan CEF'e adapte Reovirus S1133 suşu ve Tavuk Çiçeği virusu HP-1 suşu enstitünün Antijen Antiserum Üretim Laboratuvarından ve Doku Kültürü Laboratuvarından sağlandı.

Agar Jel Presipitasyon Test Antijeni: Serotip 1

grubu IBD virusu D78 suşu ile bursal homojenat olarak hazırlanan AGP test antijenleri Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü, Antijen ve Antiserum Üretim Laboratuvarından sağlandı.

Antiserumlar: Referans viruslara karşı antiserumlar izolatorde tutulan 3 haftalık SPF piliçlerde hazırlandı. Referans D78 ve OH suşları canlı virus olarak kullanıldı. Ev formol ile 1:1000 konsantrasyonda inaktive edildi. Tüm suşlar Freund'un complete ve incomplete adjuvantı ile karıştırılarak 2 hafta ara ile inokule edildi. Son inokulasyondan iki hafta sonra piliçlerden kan örnekleri kalp yoluyla toplandı, serumlar hazırlandı ve 56°C'deki su banyosunda 30 dakika inaktive edildi. Serumlar küçük birimler halinde -20°C de saklandı. Aynı yöntem ile Reovirus S1133 suşuna karşı hazırlanmış antiserum Dr. Ömer Faruk Mutlu'dan (Veteiner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bornova, İzmir) sağlandı.

Saha Viruslarının İzolasyonu: Türkiye'nin çeşitli coğrafik bölgelerinde 1992-1994 yılları arasında IBD geçirmekte olan veya söz konusu hastalık şüpheli sürülerden toplanan BF materyali IBDV izolasyonunda kullanıldı. Altmış ayrı salgından toplanan BF'lar antibiyotik katılmış (1000 IU/ml penicilline, 1000 mg/ml streptomycine) steril pepton broth ile homojenize edildi ve 1500 rpm'de 20 dakika santrifuj edilerek supernatant alındı. Homojenat sıvısı, D78 suşu referans antiserumuna karşı AGP ile incelenerek saha materyalinde IBDV'nin varlığı araştırıldı. Pozitif reaksiyon saptanan örneklerin supernatantından 6-8 günlük embriyolu yumurtanın sarı kesesine 0.2 ml inokule edildi. İlk 24 saatte ölen embriyolar spesifik kabul edilmeyerek atıldı. Daha sonraki günlerde ölen veya canlı kalan embriyoların sıvıları ve korioallantoik membranları (CAM) toplanarak homojenize edildi ve bu sıvıdan 6-8 günlük embriyolu yumurtaya pasaj yapıldı. En az 3 seri pasaj sonunda embriyoda tipik IBDV lezyonları gösteren örneklerin son pasaj sıvısından 60 mm petrilere veya 25 cm²'lik flaklarda hazırlanan CEF monolayer üzerine 0.5 ml inokule edilip, 37°C de 1 saat adsorpsiyondan sonra %2 serum içeren MEM ilave edildi. Kültürler 5-6 gün süreyle 37°C de %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi ve IBV'ye özgü CPE yönünden her gün mikroskopta kontrol edildi. Hücre kültüründeki pasajlar, virus CEF hücrelerine adapte oluncaya ve belirgin CPE oluşturuncaya kadar devam edildi. Her pasaj sonrasında kültürler 3 kez dondurulup çözülürdü, düşük hızda santrifuj edildi ve kültür sıvısı pasajda kullanıldı. Bütün pasaj sıvılarından örnekler ayrılarak -20°C'de saklandı.

İnfeksiyöz Bursal Hastalığı Virusunun Karışık Viruslardan Arındırılması: Cıvciv embriyo fibroblast hücrelerine adapte olan saha izoleleri IBDV'ye özgü CPE

göstermekle beraber, Reovirus, Newcastle hastalığı virusu gibi sahada yaygın olarak bulunan ve BF'tan IBDV ile aynı zamanda izole edilebilen, hücrede benzer CPE gösteren viruslarla da karışık olma ihtimali üzerine, HA, kloroform duyarlılık testi, büyütme vasatına 100 µg/ml oranında IUDR katılarak gerçekleştirilen IUDR önlenim testi, saha virus sıvısının eşit miktardaki Reovirus antiserumu ile adsorbsiyonu gibi bir seri test ve denemelerle diğer viruslardan arındırılmaya çalışıldı (38). Bu testlerde IBDV'yi temsilen D78 suşu, Reovirusu temsilen S1133 suşu ve DNA viruslarını temsilen Tavuk Çiçeği virusunun HP-1 suşu pozitif virus kontrolü olarak yer aldı ve her pasaj sonunda kültür sıvılarının HA aktiviteleri ölçüldü. Negatif kontrol olarak virus inokule edilmemiş CEF hücre pasaj sıvıları kullanıldı.

Nitel Virus Nötralizasyon Testi: Farklı aşamalardan geçirilerek IBDV dışındaki viruslardan arındırılmaya çalışılan, özellikle HA negatif izoleler titre edilerek nicel VN çalışmasına geçilmeden önce, referans ve saha viruslarının son çalışma pasajından alınan virus sıvısı eşit miktardaki referans serotip 1 grubu D78 suşu antiserumu ile karıştırıldı ve 37°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra CEF hücrelerine inokule edildi. Sitopatik etki göstermeyerek nötralize olan viruslar saf IBDV olarak kabul edildi ve çalışmanın devamında kullanıldı.

Virusların Titrasyonu: Referans ve saha virusları 96'lık mikro pleytte üretilmiş CEF hücrelerinde Reed & Muench (36) yöntemine göretitre edildi. Log10 tabanına göre sulandırılmış virusların her dilusyonu için 4 göz kullanılarak 25 ul'deki TCID₅₀ hesaplandı.

Nicel Virus Nötralizasyon Testi: Saha virusları, serotip 1 ve 2 grubu referans viruslarına karşı hazırlanmış antiserumlarla sabit virus değişken antikor titresini esasına dayanan beta-nötralizasyon tekniğiyle test edilerek serotiplendirildi (9, 17). Serumlar 1:10-1:81920 arasında iki katlı seri olarak sulandırıldı ve 100TCID₅₀/25ul olarak ayarlanmış eşit miktardaki virus ile karıştırılarak 37°C'de inkübe edildikten sonra, her dilusyon için 2 göz kullanılarak 96'lık pleytte üretilmiş CEF hücrelerine inokule edildi. Testte 100TCID₅₀/25ul kullanıldığı kontrolü olarak her saha virusu ve referans virus için geri titrasyon denilen virus kontrolleri ve enfekte edilmemiş hücre kontrolleri yer aldı. Sonuçlar 5 gün boyunca hergün mikroskopta izlenerek kaydedildi. Tüm testler en az 3 kez tekrarlandı ve titreler geometrik ortalamalar hesaplandı.

Bulgular

Virus İzolasyonu Sonuçları

Agar Jel Presiptasyon Test Sonucu: İnfeksiyöz

bursal hastalığı geçirmekte olan 60 ayrı sürüden toplanan BF materyalinin tümünde IBDV yönünden AGP testi ile pozitif reaksiyon saptandı.

Saha Viruslarının Embriyolu Yumurta İnkulasyon Sonuçları: Embriyolu SPF yumurtada kör pasaj yapılan saha viruslarının tümü embriyoda üreyerek IBDV'ye özgü lezyonlar oluşturdu. Genel olarak embriyolarda yaygın hemoraji, peteşiyal kanamalar, ödem, büyüme geriliği gibi bozukluklar dikkate çekti.

Civciv Embriyo Fibroblast Hücre Kültürü Pasaj Sonuçları: AGP testi ile IBDV yönünden pozitif olduğu saptanan ve yumurtaya adapte edilen saha izolelerinin 20 adedi seri kör pasajlar ile CEF hücrelerine adapte olarak üredi ve bu araştırmanın başlangıç çalışma materyali olarak kullanıldı. Hücreye adapte olarak üreyen izolelerle ilgili bilgiler Tablo 1'de sunulmuştur.

İnfeksiyöz Bursal Hastalığı Virusunun Karışık Viruslardan Arındırma Çalışması: Civciv embriyo fibroblast hücrelerine adapte olan bazı izoleler IBDV'ye özgü CPE oluşturmakla beraber, virus içeren kültür sıvıları ile yapılan HA testlerinde bazı izolelerin pozitif reaksiyon verdikleri gözlemlendi. Yaygın olarak beraber izole edilme şansı olan Newcastle hastalığı virusu, Reovirus, DNA virusları (Or: Adenovirus) gibi karışık viruslardan arındırmak için uygulanan testler ve sonuçları Tablo 2.'de özetlenmiştir. Civciv embriyo fibroblast hücrelerine adapte IBD saha izolelerinin son kültür pasajından alınarak yapılan HA testinde 11 izolenin HA aktivitesi gösterdiği gözlemlendi. Kloroform ile muameleden sonraki pasajda G37 hariç diğer tüm izolelerin HA aktivitelerini yitirdikleri görüldü. Kloroform ile muameleden sonraki pasajda G10 CPE göstermedi. İododeoxyuridine içeren vasat ile yapılan pasaj sonunda HA pozitif izolelerin sayısında artma oldu ve 7 izole HA özelliği gösterdi. Reovirus antiserumu ile adsorbsiyondan sonraki pasajda bu sayı sabit kaldı. Tabloda özetlenen arındırma çalışması sonucunda 11 izole kloroformla muameleden sonraki aşamalarda HA negatif özelliğini koruyarak VN için potansiyel çalışma materyali oldu. Aynı izoleler nitel VN testinde referans D78 antiserumu tarafından nötralize edildi, böylece saf IBDV oldukları saptanmış oldu. Pozitif virus kontrolleri D78, S1133 ve HP-1 suşları hiç bir aşamada HA aktivitesi göstermedi. İki virus (D78 ve S1133) spesifik antiserumları ile nötralize oldu ve HP-1 suşunun üremesi IUDR ile önlenildi. Negatif kontrol olarak kullanılan virus inokule edilmemiş CEF hücresi tüm aşamalarda negatif sonuç verdi.

Virusların CPE Özellikleri: İnfeksiyöz bursal hastalığı virusunun D78 suşu ve IBDV pozitif olduğu kesinleşen saha suşlarından temsilen seçilen ETL3 virusunun CEF

İzole Kod'u	Bölge	Yetiştirme Tipi	Hastalık Yaşı
G3	Marmara	Yumurtacı	.. ^a
G12	Marmara	Broyler	42 Günlük
G39	Marmara	Broyler	-
G40	Marmara	-	-
G41	Marmara	Broyler	31 Günlük
G10	Ege	Yumurtacı	42 Günlük
G19	Ege	Yumurtacı	56 Günlük
G21	Ege	Broyler	-
G34	Ege	Broyler	31 Günlük
G35 ^b	Ege	Yumurtacı	21 Günlük
G36	Ege	Broyler	-
G37	Ege	Broyler	-
G38	Ege	Broyler	25 Günlük
G42	Ege	Broyler	38 Günlük
G43	Ege	Yumurtacı	33 Günlük
G44	Ege	Broyler	30 Günlük
G23	İç Anadolu	Broyler	28 Günlük
ETL1	İç Anadolu	Broyler	35 Günlük
ETL3	İç Anadolu	Broyler	35 Günlük
ETL7	İç Anadolu	Broyler	28 Günlük

Tablo 1. Cıvciv Embriyo Fibroblast Hücrelerine Adapte Olan IBD Saha Virusları ile İlgili Bilgiler.

^aYetiştirme tipi veya hastalığıın oluştuğu yaş hakkında bilgi mevcut değildi.

^bSubklinik bir enfeksiyondan Dr.Aysel Ergün tarafından izole edildi.

hücrelerinde meydana getirdiği CPE özelliği sırasıyla Şekil 1 ve 2'de sunulmuştur. Şekil 3'te enfekte olmamış CEF hücre kontrolü yer almaktadır. Şekillerde görüldüğü gibi D78 ve ETL3'un CPE'si, ölü hücrelerin yuvarlaşması, kümeselmesi ve granüler yapı oluşumu ve tamamen parçalanmış monolayerde boş alanların meydana gelmesi şeklinde gözlemlendi. Virus nötralizasyon için seçilen izolelerin tümü inokulasyondan 24 saat sonra başlamak üzere 48-72 saatlerde IBDV'ye özgü çok belirgin dejeneratif bozukluklar meydana getirdi.

Pasaj Düzeyi ve Virus Titreleeri: Nitel VN testinde pozitif reaksiyon gösteren 10 adet saha izolesi ile referans virusların nicel virus nötralizasyon testi öncesi pasaj sayıları ve Reed & Muench'e göre hesaplanmış virus titreleeri Tablo 3'te gösterilmiştir. Saha viruslarının genellikle 10⁴/25 ul civarında titre oluşturarak üredikleri saptandı.

İnfeksiyöz Bursal Hastalığı Saha Viruslarının VN ile Serotiplendirilmesi: Serotip 1 grubu referans suşları, standart D78 ve Ev ile, serotip 2 grubu OH virusuna karşı hazırlanan antiserumlarla saha viruslarının karşılaştırmalı VN test sonuçları Tablo 4'te sunulmuştur.

Bu çalışmada yer alan 10 saha izolesi tek yönlü virus nötralizasyon testinde serotip 1 grubu standart D78 antiserumu ile daha yüksek titrelerde nötralize olurken, Ev virusu antikoruna ile oluşan titrelerin daha düşük olduğu gözlemlendi. Diğer bir bulgu, izolelerin D78 ve Ev antikorları ile ilişkilerinde kendi aralarında farklılıklar olduğu idi. Titreleerdeki bu farklılık ayrı bölgelerden izole edilenler arasında olduğu gibi aynı bölge içindeki suşlar arasında da gözlemlendi. Serotiplendirme çalışması sonunda Türkiye IBDV'lerinin serotip 1 grubunda yer aldığı ve klasik antijenik yapıya daha yakın oldukları ortaya kondu. Saha ve referans virusların hiç biri serotip 2 grubu virusu OH suşu antikoruna ile nötralizasyon özelliği göstermedi.

İzole Kodu	Son Pasaj ^a	Kloroform ^b	IUDR ^c	Reovirus Antiserumu ^d	Nitel VN Test Sonucu ^e
G3	+	-	-	-	+
G10 ^f	+	-	Y	Y	Y
G12	-	-	-	-	+ ^g
G19	+	-	+	+	-
G21	+	- ^h	Y	Y	+
G23	+	- ^h	Y	Y	+
G34	+	-	-	-	+
G35	+	-	-	-	+
G36	+	- ^h	Y	Y	+
G37	+	+	+	+	-
G38	-	-	-	-	+
G39	+	-	+	+	-
G40	+	-	+	+	-
G41	-	-	-	-	+
G42	-	-	+	+	-
G43	-	-	+	+	-
G44	-	-	+	+	-
ETLIK1	-	-	+	+	-
ETLIK3	-	-	-	-	+
ETLIK7	-	-	-	-	+
D78 ⁱ	-	-	-	-	+
S1133 ^j	-	-	-	- ^l	Y
HP-1 ^j	-	-	- ^m	Y	Y
CEF ^k	-	-	-	-	-

Tablo 2. IBD Saha İzolelerinin Karşık Viruslardan Arındırma Çalışmaları ve Aşamalar Arası Hemaglutinasyon Aktiviteleri.

^a CEF hücrelerine adapte olmuş saha viruslarının hiç bir muamele görmeden önceki son pasaj sıvısının HA durumu

^b Bir kez kloroform ile muamele edilen virusun CEF'te pasajından sonra kültür sıvısının HA durumu

^c Kloroform ile muamele sonrası elde edilen virusun IUDR'li vasat kullanılarak pasajı yapıldıktan sonra HA durumu.

^d IUDR'li vasat ile üretilmiş virusların Reovirus antiserumu ile adsorbsiyonundan sonra CEF pasaj kültür sıvısının HA durumu.

^e Nitel VN testinde D78 antiserumu ile nötralize olan izoleler pozitif(+), nötralize olmayanlar negatif (-) olarak işaretlenmiştir. Pozitif reaksiyon verenler serotiplendirme için seçilmiştir.

^f Kloroform ile muamele edildikten sonra CPE göstermeyen tek izole.

^g Serotiplendirmede kullanılmadı.

^h Erken pasaja dönülerek kültür sıvısı iki kez kloroform ile muamele edilerek saflaştırılan izolelerin CEF pasaj kültür sıvısının HA durumu.

ⁱ IBDV pozitif kontrol suşu.

^l Reovirus pozitif kontrol suşu.

^j DNA virusu pozitif kontrol suşu.

^k Negatif virus kontrolü olarak inokule edilmemiş CEF hücresi.

^l Nitel uygulanan testte S1133 suşu homolog antiserum ile nötralize oldu.

^m HP-1 suşunun replikasyonu 100ug/ml dozdaki IUDR tarafından önlendi.

Y Yapılmadı.

Tablo 3. Referans ve Saha IBDV'lerinin CEF Hücrelerindeki Pasaj Sayısı ve Titreleeri.

Izole Kodu	Pasaj No. ^a	TCID ₅₀ /25µl
G3	11	2.13x10 ⁵
G41	11	3.16x10 ⁴
G21	6	3.16x10 ⁴
G34	11	3.16x10 ⁴
G35	10	2.28x10 ⁴
G36	6	1.69x10 ⁴
G38	10	3.16x10 ⁴
G23	7	3.16x10 ⁴
ETL3	13	4.57x10 ⁴
ETL7	12	1.69x10 ⁴
D78	3	3.16x10 ⁵
EV	2	3.16x10 ⁴
OH	3	2.28x10 ³

^aNicel VN testi uygulanmadan önceki pasaj sayısı.

Tablo 4. Saha Viruslarının Referans D78 ve Ev Antiserumları ile VN Test Sonuçları.

Viruslar	Antiserumlar		
	Serotip 1		Serotip 2
	D78	Ev	OH
G3	40960a	5120	<10
G41	20480	5120	<10
G21	17222	8055	<10
G34	23490	6535	<10
G35	6089	3995	<10
G36	7760	4030	<10
G38	8611	5923	<10
G23	14482	6089	<10
ETL3	24355	6535	<10
ETL7	11762	3378	<10
D78	10240	4035	<10
Ev	7241	81920	<10
OH	<10	<10	10240

a Antikor titreleri 100TCID₅₀/25µl miktardaki virüsü nötralize eden son serum dilusyonu olarak kabul edildi. Testler en az 3 kez tekrarlanarak geometrik ortalaması alındı.

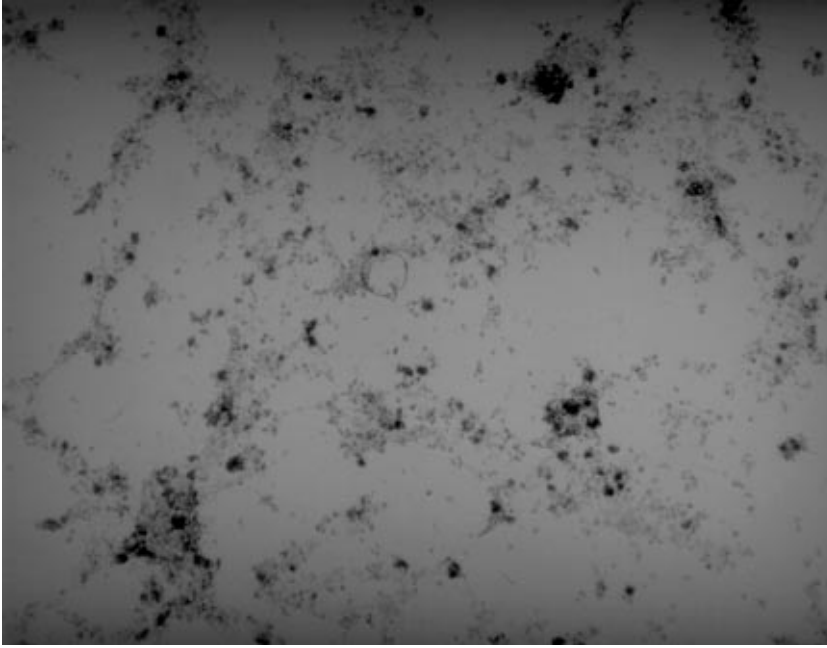


Şekil 1. IBDV pozitif virus kontrolü. Serotip 1 grubu referans virüsü D78 suşu ile enfekte edilmiş CEF hücre kültüründe inokulasyondan 72 saat sonra CPE görünümü (Olympus, 10X).

Tartışma ve Sonuç

Türkiye'de Gumboro hastalığının tanısı genellikle klinik bulgulara göre yapılmakta ve gereksinim olmadıkça

rutin teşhislerde virus izolasyonu yoluna gidilmemektedir. Bugüne kadar araştırma amacıyla yapılan izolasyon, identifikasyon çalışmalarında embriyolu yumurta, hücre



Şekil 2. İç Anadolu Bölgesi IBD saha izolesi ETL3'ün CEF hücrelerine inokulasyonundan 48 saat sonra meydana getirdiği CPE (Olympus, 4X).



Şekil 3. Virus inokule edilmemiş CEF hücre kontrolü (Olympus, 20X).

kültürü, AGP ve elektron mikroskopi (EM) gibi tekniklerle Türkiye IBDV 'leri teşhis edilmiş (24, 37), serolojik olarak sahada AGP, nicel AGP (QAGP) ve enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) testlerinden yararlanılmıştır (40). Teşhis Laboratuvarlarında Gumboro hastalığının hızlı ve doğru teşhisi amacıyla immunoperoksidaz (IP) ve immunofloresan (IF) gibi teknikler yerleştirilmeye çalışılmaktadır (41).

İnfeksiyöz bursal hastalığı virusları laboratuvarlarda

genellikle AGP, ELISA, IF, IP, EM gibi teknikler ile teşhis edilebilmektedir, ancak bu teknikler poliklonal antikorlar ile uygulandığında viruslar üzerindeki ortak antijenlerle reaksiyon verdiklerinden sadece IBDV'nin veya antikorlarının varlığını ortaya koyabilmekte, serotipleri ve alt-tipleri birbirinden ayırdedememektedirler (42, 43). Virusların antijenik ve immunojenik özelliklerinin ortaya konmasında en hassas prosedür *in vivo* hayvan denemeleridir (43). *In vitro* koşullarda poliklonal antikor

kullanarak serotip ve subtipleri birbirinden ayıran, antijenik ilişkileri ortaya koymaya yarayan en duyarlı ve spesifik testlerden biri VN tekniğidir (11, 17, 44). Virusların izole edilip *in vitro* olarak yumurta ya da hücrede çoğaltılmasını gerektiren bu tekniğin zaman alıcı ve pahalı olması dezavantajlarıdır. Yeni geliştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ürünü problemler ve reverse transkriptaz/polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon endonükleaz (RT/PCR-RE) gibi tekniklerle bu sınıflandırma virusun kültür ortamlarında çoğaltılmasına gerek duyulmadan moleküler düzeyde ortaya konabilmektedir (42, 43, 45).

Gumboro hastalığında serotip ve alt-tiplerin ortaya konması önemlidir, çünkü sadece serotip 1 grubu virüsleri tavuklarda hastalık meydana getirmektedir (18, 19) ve serotip 1 grubu içinde de antijenik yönden farklı alt-tipler bulunmaktadır (11, 16, 17, 46). Alt-tiplerin belirlenmesinin pratik önemi sahadaki aşı başarısızlıkları ile ilgilidir. Salgın, aşı virusuyla benzer antijenik yapı taşımayan bir virus tarafından meydana getiriliyor ise aşılama tam korunma sağlanamayabilir.

Bu çalışmada birinci aşamayı BF materyallerinden IBDV'nin saf olarak izole edilmesi oluşturmuştur. İkinci aşamada, saha virüsleri referans virüslerle karşılaştırmalı olarak VN testi ile serotiplendirilmiştir.

Bursa Fabricius kaynaklı IBDV'lerin embriyolu yumurtaya adaptasyon çalışmasında, ilk pasajlarda erken embriyo ölümleri nedeniyle gözlenemeyen IBDV'ye özgü lezyonlar sonraki pasajlarda ölümün 3-4'üncü günlerde başlamasıyla gözlenebilmiştir. Embriyolarda daha çok klasik virulent virüslerin meydana getirdiği lezyonlara benzer yaygın kanamalar, karın ve baş bölgesinde ödem, gelişme geriliği saptanmıştır (24).

Embriyolu yumurtadan CEF kültürlerine pasaj ile yapılan adaptasyon çalışmasında başlangıçtaki 60 numunedan sadece 20 adedinin CEF'te ürediği görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda da çok virulent saha virüslerinin hücre kültürlerine adapte edilmesinde güçlüklerle karşılaşıldığı bildirilmektedir (8, 11). Bu çalışmada başlangıçtaki materyalin 1/3'ü oranında izolenin hücrede üretilebilmesi literatürlerdeki gözlemlerle paralellik göstermektedir. Özellikle sahada salgınların en şiddetli seyrettiği 1993 yılında İstanbul bölgesinden elimize ulaşan saha materyalleri ile yaptığımız çalışmada hiç birinin hücreye adapte olmadığı gözlenmiştir. Çok patojen virüslerle ilgili bu olgunun gerçek nedeni henüz aydınlatılabilmemiş değildir. Civciv embriyo fibroblast hücrelerine adapte olanların bazıları 1 ci, genellikle 3-4 cü pasajlarda artarak ve daha sonraki pasajlarda yaygın CPE göstererek ve daha yüksek titreler

oluşturarak üremişlerdir. Saha virüsleri IBDV'ye özgü ölü hücrelerin yuvarlaklaşarak kümeler halinde toplanması, hücre sitoplazmasında granüler yapı, monolayerin yer yer boşluklar oluşturması gibi bozukluklar meydana getirmiştir (8). Karışık kültürlerde, IBDV benzeri CPE ile beraber sarımsak renkte hücre kümeleri, sınırsız tarzda hücreler gözlenmiştir. Bu çalışmada CPE oluşturan virüsler kendi aralarında bazı farklılıklarla beraber 24 saatten başlamak üzere 4-5 ci günlerde tam dejenerasyon oluşturmuştur. Çalışmanın başlangıcında referans D78 virüsü ile karşılaştırıldığında saha virüslerinin bazılarının CPE özelliklerinde farklılık gözlenmesi, kültür sıvılarında HA aktivitesinin saptanması bu virüslerin başka virüslerle karışık olduğunu göstermiştir. Nitekim bir süre önce sonuçlandırılan epidemiyolojik iki ayrı IBDV izolasyon çalışmasında, salgınlardan toplanan BF materyallerinden aynı anda Reovirus, Adenovirus ve Newcastle hastalığı virüslerinin pozitifliğinin saptanması bu çalışmaya da ışık tutmuş, karışık virus kültür sıvıları kloroform, IUDR, Reovirus antiserumu ile muamele edilerek ve her aşama arasında CEF'te pasaj yapılarak karışık virüslerden arındırılmaya çalışılmıştır. Önce 20 izolede 11 adedi HA pozitif reaksiyon verirken, kloroform ile muameleden sonra bu sayı 1'e düşmüştür. Başlangıçtaki %55 oranındaki HA pozitiflik değeri diğer araştırmacıların Türkiye'de BF ve yumurta sıvısında Newcastle hastalığı virüsleri için saptadıkları oranlara benzer bulunmuştur (24, 37). Kloroformlamadan sonra IUDR'li medium kullanılarak yapılan CEF pasajında HA pozitif reaksiyon gösteren izole sayısının artması, kloroformlamadan sonra bu virüslerin tamamen inaktive olmadığını, ancak pasaj sıvısında HA ile saptanamayacak kadar az sayıda olduklarını ve uygun kültür ortamı bulduklarında tekrar çoğaldıklarını göstermektedir. Reovirus antiserumu ile adsorpsiyondan sonra HA gösterenlerin oranında bir değişim olmamıştır. Bu denemelerin sonunda, HA pozitif olan kloroforma duyarlı Newcastle hastalığı virüslerinin ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla kloroformlamanın daha erken pasajlarda en az iki kez yapılmasında yarar olduğu kanaatine varılmıştır. Proje süresinin kısıtlı olması nedeniyle karışık olan tüm izolasyonlar için gerçekleştirilmese de, G21, G23 ve G36 izoleleri için tekrar erken pasajlara dönülmüş, kültür sıvıları iki kez kloroform ile muamele edilerek pasaj yapılmış ve diğer arındırma işlemlerine gerek kalmadan nitel VN sonucu ile saptandığı gibi bu suşlar saf olarak izole edilebilmişlerdir. Bu şekilde çeşitli saflaştırma aşamalarından geçirilen virüslere nitel VN testi uygulandığında 10 adet saha IBDV suşu referans D78 suşu antikorları ile nötralize olmuş ve çalışmaya uygun bulunmuştur. Bunlar, Marmara Bölgesinden G3, G41, Ege Bölgesinden G21, G34, G35, G36, G38 ve İç Anadolu

Bölgesinden G23, ETL3 ve ETL7 izoleleridir. Virus nötralizasyon ile serotiplendirme çalışmasında 10 adet saha izolesinin serotip 1 grubu klasik ve varyant referans viruslarıyla ortak nötralizasyon özelliği gösterdiği ve serotip 2 grubu virusu OH virusu ile hiç bir antijenik yakınlıklarının bulunmadığı ortaya konmuştur. Tek yönlü VN'de saha viruslarının D78 antikoruna ile Ev antikoruna kıyasla daha yüksek titrelerde nötralize olmaları bu virusların antijenik olarak klasik gruba yakın olduklarını göstermektedir. Ancak, bu virusların gerçek antijenik alt gruplarının ortaya konması çarpaz-virus nötralizasyon testlerine bağlıdır. Farklı bölgelerdeki veya aynı bölge içindeki virusların D78 ve Ev antikorları karşısında oluşturdukları VN titreleri arasında farklılıklar saptanması saha viruslarının kendi aralarında da heterojen olduklarını göstermektedir. Diğer yandan Ege Bölgesinden izole edilen G35, G36 ve G38 suşları arasında klasik ve varyant virus antikorları ile oluşturdukları titreler yönünden değerlendirildiğinde daha az fark olduğu görülmektedir. Bu izolelerin antijenik subtipler olma ihtimali vardır. Bu tezleri kanıtlamak ,antijenik farklılıkları ortaya koymak ve derecelendirmek için serotiplendirme çalışması devamında çarpaz-virus nötralizasyon testleri uygulanmıştır. Bu çalışmanın detaylı sonuçları bir başka raporda sunulacaktır.

Kaynaklar

1. Allan, W.H., Fragher J.T., and Cullen G.A., Immunosuppression by the Infectious Bursal Agent in Chickens Immunized against Newcastle Disease, *Vet. Rec.*, 1972; 90: 511-512.
2. Cosgrove A.S., An apparently New Disease of Chickens-Avian Nephrosis, *Avian Dis.*, 1962; 6: 385-389.
3. Kaufer I., and Weiss E., Significance of Bursa Fabricius as a Target Organ in Infectious Bursal Disease of Chickens, *Infect. and Immunity.*, 198; 27: 364-367.
4. Burkhardt E., and Muller H., Susceptibility of Chicken Blood Lymphoblasts and Monocytes to Infectious Bursal Disease Virus (IBDV), *Arch. Virol.*, 1987; 94: 297-303.
5. Faragher J.T., Allan W.H., and Cullen G.A., Immunosuppressive Effect of the Infectious Bursal Agent in the Chicken, *Nature New Biol.*, 1972; 237: 118-119.
6. Hirai K., Kunihiro K., and Shimakura S., Characterization of Immunosuppression in Chickens by Infectious Bursal Disease Virus, *Avian Dis.*, 1979; 24: 950-965.
7. Rosenberger J.K., The Role of IBD in Immunosuppression, *World Poultry Misset, Special Issue on Gumboro*, 1994, p:7.

Sonuç olarak, Türkiye'de problem olan çok virulent IBDV'nin yer aldığı serotip grubu duyarlı bir teknik olan VN testi ile ilk defa bu çalışma sonucunda belirlenmiş ve izole edilen virusların serotip 1 grubunda yer aldıkları rapor edilmiştir. Bu proje ayrıca, gelecekte ülkemizde IBDV ile yapılacak çalışmalarda kullanılmak üzere karakterize edilmiş kaynak virus sağlamıştır.

Teşekkür

Projenin finansal desteğini sağlayan TÜBİTAK-Veteriner Hayvancılık Araştırma Grubuna ve Tarım ve Köyişleri Bakanlığı-Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğüne, projenin enstitümüzde yürütülmesi sırasında desteğinden dolayı Enstitü Müdürü Adnan Serpen'e teşekkür ederiz. Doku Kültürü ve Araştırma Laboratuvarlarında çalışan personele ve Uzm.Vet.Hekim Sabahattin İçin'e yardımlarından dolayı teşekkür ederiz. Referans virusları sağlayan Dr.Y.M.Saif'e, G35 suşunu çalışmamıza veren Dr.Aysel Ergün'e, Reovirus antijeni ve antiserumu sağlayan Dr.Ömer Faruk Mutlu'ya ve projede yer alan bursa Fabricius materyallerini gönderen Veteriner Araştırma Enstitülerindeki tüm Veteriner Hekim'lere, Özel Teşhis Laboratuvarlarından materyal desteği sağlayan değerli meslektaşlarımıza teşekkürü bir borç biliriz.

8. Lukert P.D., and Saif Y.M., Infectious Bursal Disease, *Diseases of Poultry*, Edited by Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., Reid W.M., Yoder Jr. H.W., Iowa State Press, Ames, pp:648-663, 1991, 9th ed.
9. Jackwood D.J., Saif Y.M., and Hughes J.H., Characteristics and Serologic Studies of Two Serotypes of Infectious Bursal Disease Virus in Turkey, *Avian Dis.*, 1982; 26: 871-882.
10. Lukert P.D., Jones S.M., Lee L.H., and Nusbaum K.E., Antigenic Variations of Several Strains of Infectious Bursal Disease Virus, *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 1981; 179: 269-270.
11. McFerran J.B., McNulty M.S., McCillip E., Corner T.J., McCracken R.M., Collins D.S., and Allan G., Isolation and Serological Studies with Infectious Bursal Disease Viruses From Fowl, Turkeys and Ducks, Demonstration of a Second Serotype, *Avian Path.*, 1980; 9: 395-404.
12. Ismail N.M., Saif Y.M., Immunogenicity of Infectious Bursal Disease Viruses in Chickens, *Avian Dis.*, 1991; 35: 460-469.
13. Jackwood D.J., Saif Y.M., Moorhead P.D., Immunogenicity and Antigenicity of Infectious Bursal Disease Virus Serotype I and II in Chickens, *Avian Dis.*, 1985; 29: 1184-1194.

14. Mazariegos L.A., Lukert P.D., and Brown J., Pathogenicity and Immunosuppressive Properties of Infectious Bursal Disease "Intermediate" Strains, *Avian Dis.*, 1990; 34: 203-208.
15. Rosenberger J.K., and Cloud S.S., Isolation and Characterization of Variant Infectious Bursal Disease Viruses, 123rd Am. Vet. Med. Assoc. Meet. Abstr. no.181, 1985; p:357.
16. Snyder D.B., Savage P.K., Mengel S.A., Vakharia V.N., and Luttkick D., Molecular Epidemiology of Infectious Bursal Disease Virus in the United States, *Proc. Intl. Sym. on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia*, Rauschholzhausen, Germany, 1994; pp:65-70.
17. Jackwood D.H., and Saif Y.M., Antigenic Diversity of Infectious Bursal Disease Viruses, *Avian Dis.*, 1987; 31: 766-770.
18. Ismail N.M., Saif Y.M., Lack of Pathogenicity of Five Serotype 2 Infectious Bursal Disease Viruses in Chickens, *Avian Dis.*, 1988; 32: 757-759.
19. Jackwood D.J., Saif Y.M., Moorehead P.D., and Bishop G., Failure of Two Serotype II Infectious Bursal Disease Viruses to Affect the Humoral Immune Response of Turkeys, *Avian Dis.*, 1984; 28: 100-116.
20. Brown F., The Classification and Nomenclature of Viruses: Summary of Results of Meeting of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai, September 1984, *Intervirology*, 1986; 25: 141-143.
21. Dobos P., Hill B.J., Hallet R., Kells D.T.C., Becht H., and Teninges D., Biophysical and Biochemical Characterization of Five Animal Viruses with Bi-segmented Double-Stranded RNA Genomes, *J. Virol.*, 1979; 32: 593-605.
22. Muller H., Scholtissek C., and Becht H., The Genome of Infectious Bursal Disease Virus Consists of Two Segments of Double Stranded RAN, *J.Virol.*, 1979; 31: 584-589.
23. Chettle N.J., Stuart J.C., and Wyeth P.J., Outbreak of Virulent Infectious Bursal Disease in East Anglia, *Vet. Rec.*, 1989; 25: 271-272.
24. Çöven F., Broylar ve Yumurtacı Tavuklarda Gumboro (Infectious Bursal Disease) Hastalığının İnsidensi ve Virus İzolasyonu, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 1995, Doktora Tezi.
25. Drouin P., Toux J.Y., Picault J.P., Etteradossi N., Guittet M., and Bennejean G., Epidemiology of Infectious Bursal Disease in France, *Proc.Intl. Sym.on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia*, Rauschholzhausen, Germany, 1994, pp:215-228.
26. Du Perez J.H., Control of wIBD in South Africa, *World Poultry Misset*, Special Issue on Gumboro, 1994, pp:17-18.
27. Lasher HbN., IBD Prevention and Control in Asia, *World Poultry Misset*, Special Issue on Gumboro, 1994, pp:26-29.
28. Mohiuddin S.M., Infectious Bursal Disease in India, *Poultry International*, July, 1994, pp:56-57.
29. Nunoya T., Otaki Y., Tajima M., Hiraga M., and Saito T., Occurrence of Acute Infectious Bursal Disease with High Mortality in Japan and Pathogenicity of Field Isolates in specific-Pathogen-Free Chickens, *Avian Dis.*, 1992; 36: 597-609.
30. Tsai H.J., Lu Y.S., Epidemiology of Infectious Bursal Disease in Taiwan in 1992., *JW.Chinese Soc. Vet. Sci.*, 1993; 19: 249-258.
31. Van den Berg T.P., Gonze M., Muelemans G., Acute Infectious Bursal Disease Virus, *Proc. Intl. Sym. on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia*, Rauschholzhausen, Germany 1994, pp:54-64.
32. Kandil M., Hastalıklı Piliçlerin Bursa Fabriciilerinde Bir Enfeksiyöz Bursitis Virusunun İzolasyonu ve Bazı Özellikleri Üzerinde Araştırmalar, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 1978, Yüksek Lisans Tezi.
33. Ergün A., Tavukların Bazı Viral Hastalıklarının Epizootiyolojik Taramasında Kullanılmak Üzere Antijen ve Antiserum Hazırlanması, *Etilik Vet. Mikrob. Derg.*, 1989; 6 (4): 35-54.
34. Babila A., Ası Y., Akçadağ B., ve Gürel A., İstanbul ve Trakya Bölgesi Kümes Hayvanlarında IB, ILT, IBD, EDS, AE ve Adenovirus enfeksiyonlarının Epizootiyolojik Araştırması ve İzolasyon Çalışmaları, *Pendik Hayvan Hastalıkları Araşt. Enst. Derg.*, 1988; 19, (1-2): 66-77.
35. Baysal T., Bozkır M., Konya Bölgesi Kümes Hayvanlarında IBD, ILT, EDS, IBD, AE ve Adenovirus Enfeksiyonlarının Epizootiyolojik Araştırması ve İzolasyon Çalışmaları, *Etilik Vet. Mikrob. Derg.*, 1989; 6(4): 23-30.
36. Sayım Y., Akman A., ve Girgin H., Ankara Bölgesi Kümes Hayvanlarında IB, ILT, EDS, IBD, AE ve Adenovirus Enfeksiyonlarının Epizootiyolojik Araştırması ve İzolasyon Çalışmaları, *Etilik Vet. Mikrob. Derg.*, 1988; 6(2): 83-94.
37. Ergün A., Klinik ve Subklinik Gumboro Vakalarından Virus İzolasyonu ve Serotiplendirilmesi, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 1995, Doktora Tezi.
38. Villegas P., *Avian Virus Diseases, Laboratory Manual*, College of Veterinary Medicine, Univ. of Georgia, 1987.
39. Reed L.J., and Muench H., Siple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints, *The Am. J. of Hygiene*, 1937; 27: 493-497.
40. Ası Y., İyisan A.S., İnfeksiyöz Bursal Disease'e (IBD, Gumboro) Karşı Aşılı Etçi Piliçlerde ELISA Yönetim ile Antikor Düzeyinin Saptanması ve QAGP Yönetimi ile Karşılaştırılması, *Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araşt. Enst. Derg.*, 1991; 22: 107-121.
41. Pala H.H., Türe O., Gumboro Hastalığının İmmunoperoksidaz ve İmmunofloresan Teknikleri ile Teşhisi, *Bornova Vet. Kontr. Araşt. Enst. Derg.*, 1996; 21(35): 161-175.

42. Jackwood D.J., and Jackwood R.J., Infectious Bursal Disease Viruses: Molecular Differentiation of Antigenic Subtypes Among Serotype 1 Viruses, *Avian Dis.*, 1994; 38: 531-537.
43. Saif Y.M., Laboratory Versus Live Bird Testing, *World Poultry Misset, Gumboro Special Issue*, 1994, p:9.
44. Ismail N.M., Saif Y.M., Differentiation between Antibodies to Serotype 1 and 2 Infectious Bursal Disease Viruses in Chicken Sera, *Avian Dis.*, 1990; 34: 1002-1004.
45. Giambone J.J., Liu H.J., and Dormitorio T., Genetic Variations in Infectious Bursal Disease Virus Using Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequence Comparisons of Polymerase Chain Reaction Generated cDNA, *Proc.Intl.Sym. on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia*, Rauisholzhausen, Germany, 1994, pp:71-82.
46. Snyder D.B., Lana D.P., Cho B.R., and Marquardt W.W., Group and Strain Specific Neutralization Sites 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.*, 1989; 32: 535-539.