

Enfeksiyöz Bursal Hastalık (IBD; Gumboro Hastalığı) Virusu ile Enfekte Edilmiş Hindi Embriolarında Makroskopik ve Mikroskopik Değişimler*

Enver BEYTUT

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

Nursal METİN

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 10.12.1997

Özet : Bu çalışma, Enfeksiyöz Bursal Hastalık Virusu (IBDV) tavuk izolatına karşı hindi embriolarının duyarlı olup olmadıklarının saptanması ve başta Bursa Fabricius (BF) olmak üzere bazı iç organlarda şekillenen morfolojik değişimleri ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada 178 embriyolu hindi yumurtası ve IBDV'unun 28. tavuk embriyosu pasajı kullanılmış, hazırlanan viral süspansiyondan 13. günde sarı keseye (SK) ve 15. günde allantois boşluğuna (AB) 0.1 ml inokulasyon yapılmıştır. Enfekte embriyolarda ölümler özellikle inokulasyonun 3-7. günlerinde şekillenmiş, SK %20 ve AB deneme grubunda ise %17 olarak bulunmuştur. Makroskopik olarak enfekte embriyolarda but ve göğüs kaslarında kanama, BF'da peribursal ödem ve kanama ile karaciğerde mozaik benzeri çizgilerle karakterize nekroz gözlenmiştir. Mikroskopik olarak da enfekte BF'larda primer plika ve lenf folliküllerinde geç gelişme, kanama ve folliküler nekroz, karaciğerde subkapsular koagülasyon nekrozu, kaslarda intramusküler kanama ve mononükleer hücre infiltrasyonları tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler : Enfeksiyöz Bursal Hastalık, Morfolojik Değişimler, Hindi Embriyosu.

Macroscopic and Microscopic Changes in Turkey Embryos Infected with Infectious Bursal Disease (IBD; Gumboro Disease) Virus

Abstract : The purpose of this study was to determine the susceptibility of turkey embryos to the chicken isolate of Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) and to investigate the morphologic changes occurred particularly in bursa of Fabricius (BF) and some visceral organs.

In the study, 178 embryonated turkey eggs and 28th passage of the virus from chicken embryo were used. Doses of 0.1 ml from the viral suspension were inoculated into yolk sac (YS) and allantoic cavity (AC), respectively on 13th and 15th days of incubation. The deaths in the infected embryos occurred especially between 3rd and 7th days of inoculation and the proportions of death were 20 % in YS trial group and 17 % in AC trial group. Macroscopically, hemorrhage in rump and chest muscles, peribursal edema and hemorrhage in BF and necrosis characterized with mosaic like lines in liver of infected embryos were observed. Delayed formation of primary plicae and lymphoid follicles, hemorrhage and follicular necrosis in the BF, subcapsular coagulation necrosis in the liver and intramuscular hemorrhage and mononuclear cell infiltration in muscles were detected microscopically.

Key Words : Infectious Bursal Disease, Morphologic Changes, Turkey Embryo

Giriş

Enfeksiyöz bursal hastalık (IBD) yaygın olarak 2-15 haftalık piliçlerde görülen, BF'un akut nekrotik yangısı ve atrofisi ile karakterize, immun sistemin baskılanmasına

yol açan bir virus enfeksiyonudur. Doğal enfeksiyonlar genellikle 3-6 haftalık piliçlerde ortaya çıkmakta (1-3) hindi ve ördek gibi kanatlı türlerinde ise daha çok sub-klinik bir seyir izlemektedir (4-7). IBD başta BF olmak

* Bu çalışma aynı adlı doktora tezinden özetlenmiştir.

üzere (4,8-11), dalak, timus ve sekal tonsillerden oluşan lenfoid dokuyu etkilemekte ve hastalık için spesifik kabul edilen lezyonlar bu organlarda ortaya çıkmaktadır (2-4,6,12-15). Ancak karaciğer, böbrek, iskelet kasları ve bezli mide gibi non-lenfoid organların da virustan etkilenmediği saptanmıştır (9,13,16).

IBD'da özellikle BF'da meydana gelen morfolojik değişimlere bağlı olarak humoral bağışıklık sisteminin etkilenmesi, hastalığı immunolojik açıdan önemli kılmaktadır (10,17). Özellikle kuluçkadan çıktıktan sonra ilk iki hafta içinde enfekte olan civcivlerde BF'da erken dönemde meydana gelen değişimler humoral bağışıklık sisteminin gelişmesini engellemektedir (3,12,15,18). Dolayısıyla enfeksiyon atlatılsa bile immun sistem baskılandığından civcivler daha sonra birçok viral, bakteriyel ve protozoal enfeksiyonlara karşı daha duyarlı hale gelmekte ve aşılmalarda yeterli düzeyde antikor oluşmamaktadır (1,4,8,11,15,19,20).

Hindilerde IBD her ne kadar subklinik olarak seyrederse de (1,4,5), yapılan serolojik araştırmalarda (8,21-23) klinik belirti göstermeyen birçok sürüde hindilerin virus-spesifik antikor taşıdıkları saptanmıştır. Bu nedenle gerek piliçlerde gerekse hindi palazlarında, özellikle immunosupratif etkisiyle, kanatlı yetiştiriciliğinde önemli kayıplara yol açan, IBDV'una karşı SK ve AB inokulasyon yolları ile hindi embriyolarının duyarlı olup olmadıklarının belirlenmesi ve şekillenen morfolojik değişimlerin ortaya konulması çalışmanın amacını oluşturmuştur.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada kullanılan hindi yumurtaları, Bingöl Tarım İl Müdürlüğüne bağlı arıcılık ve hindi üretme istasyonunda damızlık hindi üretimi yapılan kümeslerden temin edildi. Virus olarak, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı tarafından bir salgından izole edilen IBDV'un 28. tavuk embriyosu pasajı kullanıldı. Çalışmada deneme aynı koşullarda tekrarlandı. Buna göre I. Denemede 94 adet [40 adet SK(7 grup), 40 adet AB(6 grup) 14 adet kontrol] ve II. Denemede (tekrarlama) ise 84 adet [35 adet SK(7 grup), 35 adet AB(6 grup) 14 adet kontrol] olmak üzere toplam 178 adet embriyolu hindi yumurtası çalışmada kullanıldı. Kuluçkanın 13. gününde SK'ye ve 15. gününde AB'na ELD₅₀ 10⁻³ aktiviteli virus 10.000 İ.Ü. penicillin ve 1 g streptomycin ihtiva eden phosphate buffered saline (PBS) ile 10⁻² oranında sulandırılarak hazırlanan viral süspansiyondan 0.1 ml inokulasyon yapıldı. İnokulasyonu izleyen ilk 48 saat içinde meydana gelen embriyo ölümleri non-spesifik kabul edilerek değerlendirme dışı bırakıldılar (7,14,24). İnokulasyonların 3. gününden 28. güne kadar enfekte ve kontrol grubu embriyolardan günlük olarak örnekler alınmaya başlandı. Deneme grupları ile değerlendirme dışı bırakılan, ölen ve alınan enfekte ve kontrol embriyo sayıları tablo-1 de verilmiştir. Alınan enfekte ve kontrol grubu embriyolar makroskopik olarak incelendikten sonra, vücut ağırlıkları tartılıp but uzunluğu ve but genişlikleri ölçülüp kayıt edildi. Daha sonra sistemik

Tablo 1. Deneme süresince alınan enfekte, kontrol ve değerlendirme dışı bırakılan embriyo sayıları.

	I. DENE ME						II. DENE ME					
	SARI KESE		ALLANTOİS BOŞLUĞU				SARI KESE		ALLANTOİS BOŞLUĞU			
İnokulasyonu İzleyen Kuluçka Günleri	Değerlendirme Dışı Bırakılan Emb.Say.	Alınan Enfekte Emb.Say.	Alınan Enfekte Emb.Say.	Değerlendirme Dışı Bırakılan Emb Say.	Alınan Enfekte Emb.Say.	Alınan Kontrol Emb.Say.	Değerlendirme Dışı Bırakılan Emb.Say.	Alınan Enfekte Emb Say.	Değerlendirme Dışı Bırakılan Emb.Say.	Alınan Enfekte Emb.Say.	Alınan Kontrol Emb.Say.	
13-14. Gün	5						9					
15-16. Gün	-	2 3	4			2	-	1 2	4		2	
17-18. Gün	-	2 2	-	2 3	2		-	1 3	-	3 3	2	
19-20. Gün	-	5 2	-	4 1	2		-	5 1	-	7 1	2	
21-22. Gün	-	4	-	6	2		-	6	-	6 1	2	
23-24. Gün	-	4	-	8	2		-	3	-	5	2	
25-26. Gün	-	3	-	5	2		-	2	-	1 1	2	
27-28. Gün	-	7 1	-	6 1	2		-	1 1	-	1 2	2	
TOPLAM	5	27 8	4	31 5	14		9	19 7	4	23 8	14	

nekropsileri yapılarak BF ve dalak ağırlıkları tartıldıktan sonra karaciğer, böbrek, bezli ve kaslı mide, timus, but ve göğüs kasları ve chorioallantoik membran (CAM)'dan alınan örneklerle birlikte tesbit edildi. Bilinen yöntemlerle hazırlanan parafin bloklardan alınan kesitler Hematoxylin-Eosin (HE) ile, gerekli görülenler ise Van Gieson, Giemsa ve Sudan Black B ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda incelendiler (25).

Hem SK hem de AB deneme grubunda embriyo, BF ve dalak ağırlıkları ile but uzunluğu ve genişliği ölçüm ve tartım sonuçlarının ortalama değerleri (X) ve standart hataları (Sx) hesaplanarak kontrol ve enfekte gruplar arasında oluşan farkların önemlilik dereceleri Mann Whitney U testine göre belirlendi (26).

Sonuçlar

Makroskobik ve mikroskobik bulgularla birlikte BF, dalak ve embriyo ağırlıkları ile but uzunluk ve genişliklerine ait sonuçlar SK ve AB deneme gruplarında ayrı ayrı değerlendirilerek bunlara ilişkin tartım ve ölçüm sonuçlarının ortalama değerleri, standart hataları ve önemlilik dereceleri sırasıyla tablo 2 ve 3' te; yine her iki deneme grubuna ait BF, dalak ve embriyo ağırlıkları ile kuluçka günleri arasındaki ilişki şekil-1,2,3 te, but uzunluk ve genişlikleri ile kuluçka günleri arasındaki ilişki ise şekil-4,5 de verilmiştir.

I. Makroskobik Bulgular

a) Sarı Keseye İnokulasyon Yapılan Deneme Grubu Embriyolarda Makroskobik Bulgular

Birinci ve 2. grup (15-18. günler) embriyolarda boyun ve abdominal bölgede şiddetli subkutan ödem, diffuz konjesyon, göğüs (M. pectoralis major) ve but kaslarında (M. biceps femoris, M. gracilis ve M. semimembranosus), kanatlarda, ayak parmaklarında ve baş bölgesinde diffuz kanamalar görüldü (şekil-6). Nekropside karaciğerde mozaik benzeri çizgilerden oluşan nekroz odakları, dalakta hafif büyüme ve peritoneal yüzeyde peteşial kanamalar, böbreklerde hiperemi, BF'da peribursal ödem, serozada şiddetli kanama ve CAM'da ödem izlendi. Üçüncü grupta (19-20. günler) ödematöz değişikliklerin azaldığı, 1. ve 2. gruba benzer şekilde çene altında, göz çevresinde, ekimotik kanamalar, deride şiddetli konjesyon, abdominal bölgede ödem (şekil-7), karaciğerde fokal nekroz odakları, böbreklerde ve dalakta hiperemi ve BF'da Peteşial kanamaların şekillendiği görüldü. Dört ve 5. grup (21-24. günler) embriyolarda kontrollere oranla belirgin gelişim geriliği ve cüceleşme saptandı. Bu gruplarda kaslarda kanama gözlenmemekle birlikte boyun ve sırt bölgesinde subkutan ödem şekillendiği tespit edildi. Karaciğerde kahverengimsi çizgilerle karakterize nekroz, BF'da serozada peteşial kanama, bezli mide mukozasında hiperemi ve bazı olgularda kaslı midede aşırı büyüme görüldü. Altıncı grupta (25-26. günler) bazı embriyolar-

Tablo 2. Sarı keseye inokulasyon yapılan deneme grunda embryo, bursa Fabricius ve dalak ağırlığı ile but uzunluğu ve but genişliği ölçüm sonuçlarının ortalama değerleri (X), standart hataları (Sx) ve önemlilik dereceleri (U).

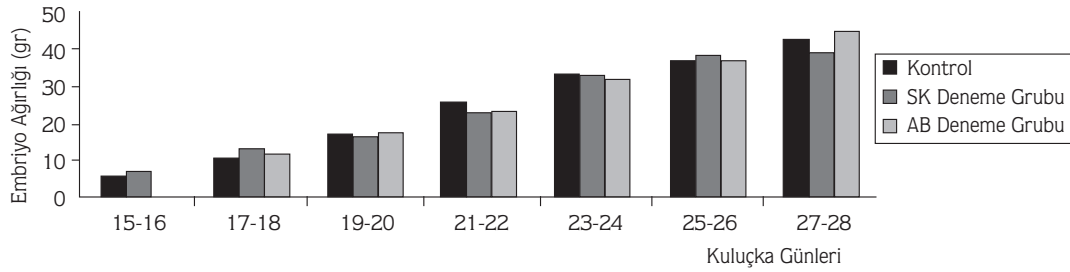
Grup No. (Kuluçka Günleri)		Embriyo Ağır. (gr)		Bursa Fab. Ağır. (mg)		Dalak Ağır. (mg)		Embriyo But Uz. (cm)		Embriyo But Gen (cm)	
		X ± Sx	U	X ± Sx	U	X ± Sx	U	X ± Sx	U	X ± Sx	U
1. Grup (15-16. gün)	Kontrol	5.64 ± 0.33		20.00 ± 0.00		15.00 ± 5.00		6.25 ± 0.05		2.40 ± 0.10	
	Enfekte	6.16 ± 1.42	29*	24.75 ± 2.21	22.5	15.50 ± 3.64	20	5.97 ± 0.54	16	2.13 ± 0.20	27*
2. Grup (17-18. gün)	Kontrol	10.67 ± 1.56		20.00 ± 4.47		14.00 ± 3.74		7.13 ± 0.27		2.56 ± 0.16	
	Enfekte	12.61 ± 3.72	42*	23.57 ± 3.49	24.5	15.71 ± 6.76	18.5	6.87 ± 0.43	30.5	2.50 ± 0.17	28.5
3. Grup (19-20. gün)	Kontrol	16.38 ± 2.47		21.00 ± 5.16		15.00 ± 2.88		7.46 ± 0.50		2.70 ± 0.28	
	Enfekte	15.88 ± 3.35	41	22.50 ± 4.55	37	14.08 ± 3.86	33	7.12 ± 0.50	48	2.42 ± 0.22	45.5
4. Grup (21-22. gün)	Kontrol	24.39 ± 1.59		22.25 ± 2.27		17.00 ± 3.08		8.60 ± 0.35		2.92 ± 0.25	
	Enfekte	23.24 ± 3.34	25	23.44 ± 3.46	21	16.44 ± 2.49	18.5	8.15 ± 0.64	27	2.64 ± 0.25	27
5. Grup (23-24. gün)	Kontrol	32.37 ± 3.36		27.25 ± 2.83		19.00 ± 4.12		9.25 ± 0.77		3.25 ± 0.32	
	Enfekte	32.28 ± 4.26	11	28.00 ± 5.27	12.5	22.28 ± 2.31	14.5	9.27 ± 0.76	14	3.27 ± 0.43	12.5
6. Grup (25-26. gün)	Kontrol	37.23 ± 3.84		34.50 ± 4.77		23.33 ± 1.69		9.86 ± 0.56		3.33 ± 0.22	
	Enfekte	38.52 ± 3.09	9	31.20 ± 6.61	9	24.80 ± 6.98	8	9.66 ± 0.79	11	3.30 ± 0.10	9
7. Grup (27-28 gün)	Kontrol	42.01 ± 0.02		40.00 ± 0.00		22.50 ± 2.50		10.05 ± 0.45		3.80 ± 0.00	
	Enfekte	39.38 ± 3.96	12	36.00 ± 3.74	19*	25.16 ± 3.71	10.5	9.91 ± 0.52	16	3.60 ± 0.12	19.5

* : Mann Whitney U testine göre enfekte ve kontrol grupları arasındaki fark (P<0.05) düzeyinde önemli bulunmuştur.

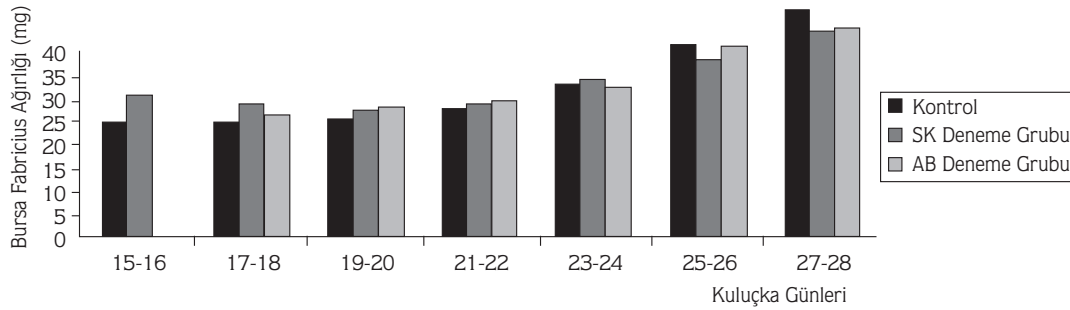
Tablo 3. Allantois boşluğuna inokulasyon yapılan deneme grubunda embryo, bursa Fabricius ve dalak ağırlığı ile but uzunluğu ve but genişliği ölçüm sonuçlarının ortalama değerleri (X), standart hataları (Sx) ve önemlilik dereceleri (U).

Grup No. (Kuluçka Günleri)		Embriyo Ağır. (gr)		Bursa Fab. Ağır. (mg)		Dalak Ağır. (mg)		Embriyo But Uz. (cm)		Embriyo But Gen (cm)	
		X ± Sx	U	X ± Sx	U	X ± Sx	U	X ± Sx	U	X ± Sx	U
1. Grup (17-18. gün)	Kontrol	10.67 ± 1.56		20.00 ± 4.47		14.00 ± 3.74		7.13 ± 0.27		2.56 ± 0.16	
	Enfekte	12.23 ± 2.04	41*	21.40 ± 5.81	21*	14.75 ± 3.19	11	6.93 ± 0.42	29	2.36 ± 0.14	35.5
2. Grup (19-20. gün)	Kontrol	16.38 ± 2.47		21.00 ± 5.16		15.00 ± 2.88		7.46 ± 0.50		2.70 ± 0.28	
	Enfekte	16.75 ± 2.58	33	23.14 ± 8.50	33	16.22 ± 2.57	32	7.34 ± 0.45	35.5	2.44 ± 0.13	46*
3. Grup (21-22. gün)	Kontrol	24.39 ± 1.59		22.25 ± 2.27		17.00 ± 3.08		8.60 ± 0.35		2.92 ± 0.25	
	Enfekte	22.83 ± 3.49	24	23.87 ± 3.25	21	16.37 ± 2.11	16.5	8.02 ± 0.41	28*	2.73 ± 0.15	24
4. Grup (23-24. gün)	Kontrol	32.37 ± 3.36		27.25 ± 2.83		19.00 ± 4.12		9.25 ± 0.77		3.25 ± 0.32	
	Enfekte	31.55 ± 5.22	11	26.28 ± 5.66	11.5	20.28 ± 4.68	12	8.76 ± 0.99	13	2.98 ± 0.24	13.5
5. Grup (25-26. gün)	Kontrol	37.23 ± 3.84		34.50 ± 4.77		23.33 ± 1.69		9.86 ± 0.56		3.33 ± 0.22	
	Enfekte	37.17 ± 1.37	12	33.33 ± 4.67	11	21.83 ± 4.97	11	9.66 ± 0.37	11.5	3.43 ± 0.09	10
6. Grup (27-28 gün)	Kontrol	42.01 ± 0.02		40.00 ± 0.00		22.50 ± 2.50		10.05 ± 0.45		3.80 ± 0.00	
	Enfekte	44.32 ± 3.77	10	36.42 ± 7.88	9	21.42 ± 1.83	10	10.42 ± 0.29	11	3.52 ± 0.07	15*

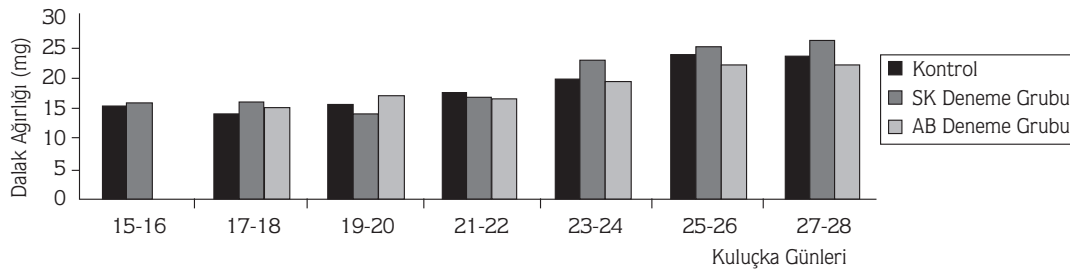
* : Mann Whitney U testine göre enfekte ve kontrol grupları arasındaki fark (P<0.05) düzeyinde önemli bulunmuştur.



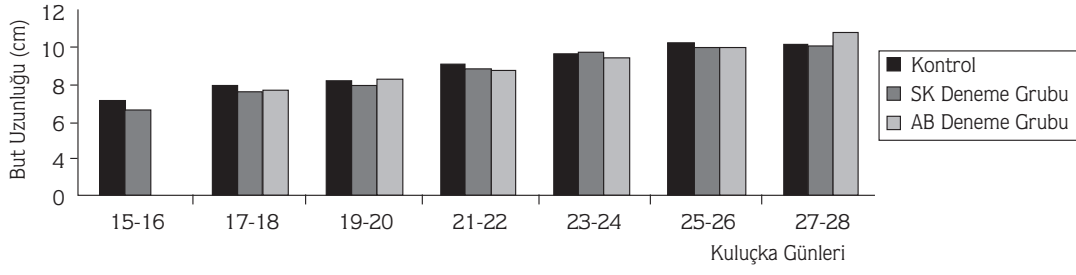
Şekil 1. Embriyo vücut ağırlığı ile kuluçka günleri arasındaki ilişki.



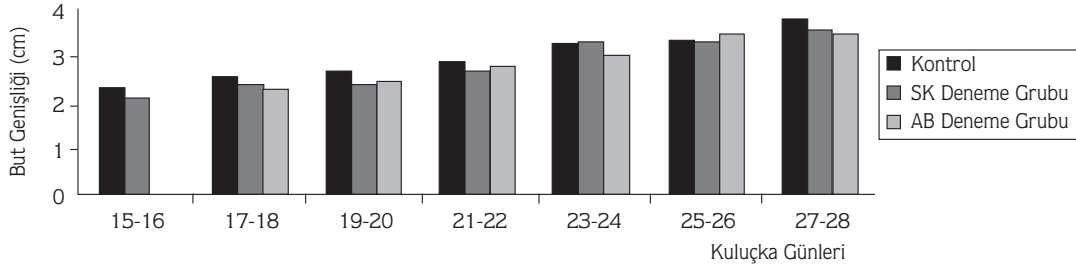
Şekil 2. Bursa Fabricius ağırlığı ile kuluçka günleri arasındaki ilişki.



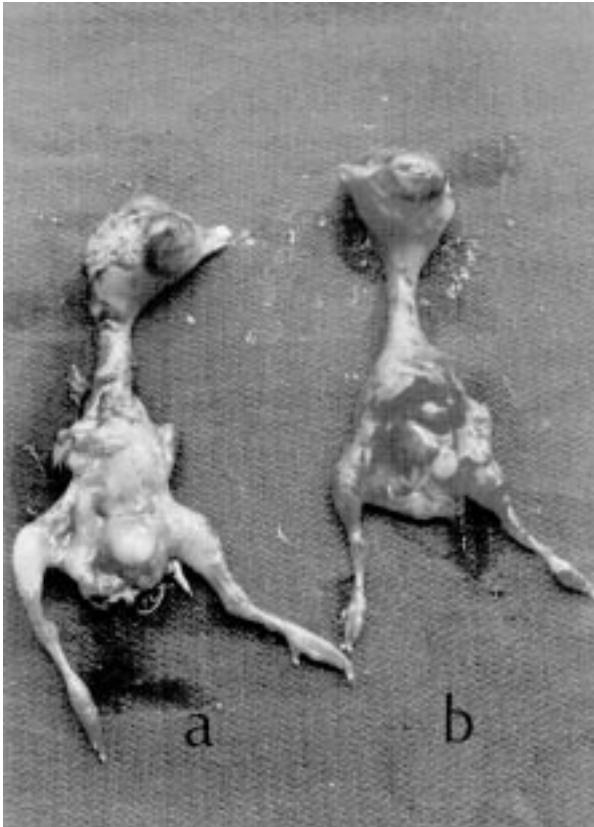
Şekil 3. Dalak ağırlığı ile kuluçka günleri arasındaki ilişki.



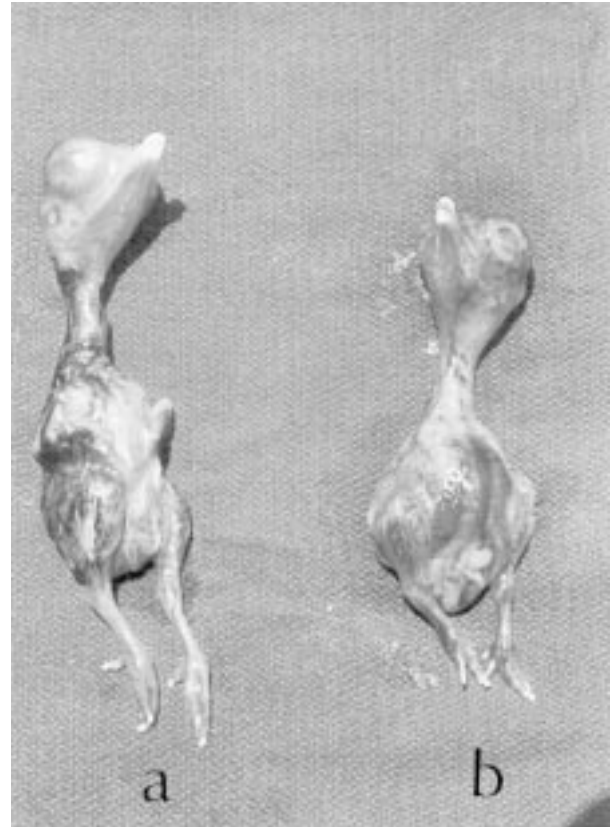
Şekil 4. Embriyo but uzunluğu ile kuluçka günleri arasındaki ilişki.



Şekil 5. Embriyo but genişliği ile kuluçka günleri arasındaki ilişki.



Şekil 6. Embriyoda vücut yüzeyinde yaygın kanamalar. a) Kontrol, b) Enfekte (SK, 18. gün)



Şekil 7. Embriyoda deride konjesyon ve abdominal bölgede ödem. a) Kontrol, b) Enfekte (SK, 18. gün)

da gözler çevresinde ve bezli mide mukozasında kanama saptandı. Yedinci grupta (27-28. günler) BF'da atrofi ve kaslı midede mukozada şiddetli kanama dışında diğer organlarda lezyona rastlanmadı.

b) Allantois Boşluğuna İnokulasyon Yapılan Deneme Grubu Embriyolarında Makroskobik Bulgular

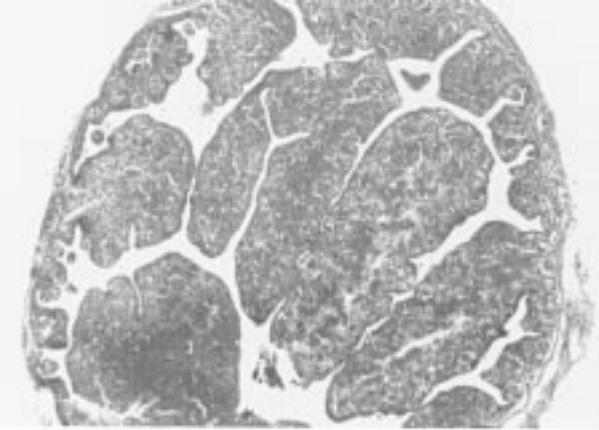
Birinci ve 2. grup (17-20. günler) embriyolarında serebral bölgede, çene altında, but kaslarında, ayak parmaklarında ve kanatlarda yaygın peteşial kanamalar, karın bölgesinde subkutan ödem ve enfekte embriyolarında belirgin gelişim geriliği dikkati çekti. Nekropside serozal yüzeylerde, karaciğerde ve BF'da kanamalar, peribursal ödem ve CAM'da şiddetli konjesyon görüldü. Üçüncü ve 4. grupta (21-24. günler) göğüs ve but kaslarında gözlenen kanamaların bazı embriyolarında tüm vücut yüzeyine yayıldığı dikkati çekti. BF'da hafif ödem, böbreklerde hiperemi ve karaciğerde nekroz gözlemlendi. Beşinci grup (25-26. günler) embriyolarında özellikle sırt bölgesinde ödem, dalakta hiperemi ve BF'da az sayıda peteşial kanama saptandı. Altıncı grupta (27-28. günler) sadece 28. günde alınan bir embriyoda BF'da ve dalakta şiddetli kanama tespit edildi.

II. Mikroskobik Bulgular

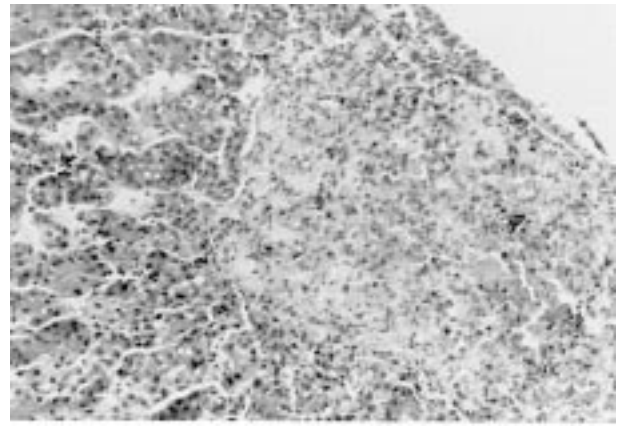
a) Sarı Keseye İnokulasyon Yapılan Deneme Grubu Embriyolarında Mikroskobik Bulgular

Mikroskobik bulguların değerlendirilmesinde şekillenen lezyonlara ilaveten, enfekte ve kontrol grubu embriyolarında BF'da primer ve sekonder plikaların gelişimi ile plikalardaki ortalama follikül sayısı da göz önünde bulundurulmuştur.

BF'da; birinci grupta (15-16. günler) 15. güne kadar primer plikaların tam olarak gelişmediği ve bursal lumene mukozal kıvrımlar halinde uzadıkları, lenf folliküllerinin ise hiç şekillenmediği görüldü. Onaltıncı günde primer plikaların şekillenmeye başladığı ve lenf folliküllerinin epitelyal tomurcuklar şeklinde L. propriaya yansydıkları gözlemlendi. L. epitelyaliste kalınlaşma, plikalarda ödem ve subserozal damarlarda konjesyon dikkati çekti. Yine 16. günde alınan bazı olgularda tüm plikalarda şiddetli interfolliküler ve intrafolliküler kanamaların meydana geldiği izlendi (şekil-8). İkinci grup (17-18. günler) embriyolarında primer plikaların belirgin olarak ortaya çıktıkları ancak sekonder plikaların oluşmadığı gözlemlendi. Plikalarda heterofil lökosit infiltrasyonu, subserozal ve interfolliküler ödem ve plikalarda damarların hiperemik oldukları görüldü. Üçüncü ve 4. grupta (19-22. günler) primer plikalarla birlikte bunlardan kaynaklanan sekonder plikaların epitel kıvrımlar halinde lumene yansydıkları saptandı. T. serozadan başlayarak interfolliküler aralığa yayılan ödem, folliküler lenfositlerde piknoz, karyoreksis ve bu folliküller çevresinde mononükleer hücre artışı izlendi. Beşinci grupta (23-24. günler) serozal damarlarda şiddetli konjesyon, kanama, interfolliküler bağdokuda mononükleer hücre infiltrasyonu, tek tük piknotik hücreler, folliküler medullada kistik yapıda oluşumlar, bursal lumende içerisinde piknotik hücreler bulunan asidofilik görünümde amorf bir kitle ve kontrollere oranla daha az sayıda follikül oluşumu gözlemlendi. Altıncı ve 7. grup (25-28. günler) embriyolarında folliküler nekroz, follikülerin çapında küçülme ve sayılarında azalmaya bağlı olarak plikalarda atrofi gözlemlendi.



Şekil 8. Bursa Fabricius plikalarında şiddetli kanama ve genişleme. (SK, 16. gün, H.E. x 80)



Şekil 9. Karaciğerde subkapsular nekroz. (SK, 17. gün, H.E. x 264)

Dalakta; 1-5. grup (15-24. günler) embriyolarda venöz sinuslar ve trabekular venlerde konjesyon, subkapsular kanama, heterofil lökosit artışı ve tek tük piknotik hücreler tespit edildi. Altıncı ve 7. gruplarda (25-28. günler) subkapsular fokal nekroz odakları ve mononuklear hücre artışı ile birlikte kapsulada belirgin kalınlaşma görüldü. Ayrıca enfekte embriyonal dalaklarda germinal merkezlerin 26-27. güne kadar şekillenmediği, bu dönemden itibaren ise taslaklar halinde oluşmaya başladıkları gözlemlendi. Kontrol embriyolarda ise anılan merkezlerin aynı dönemlerde daha belirgin şekillendikleri ancak tam oluşmadıkları görüldü. Timusta; 1. grupta (15-16. günler) lopcukların tam olarak oluşmadığı ve kapsula altında az sayıda lenfositlerden oluşan kümeler halinde ortaya çıktığı belirlendi. İkinci grup (17-18. günler) embriyolarda timik lopcukların şekillenmesinin yanı sıra; timus korteks ve medullasında kanama, karyoreksis, heterofil lökosit infiltrasyonu ve Hassal korpusküllü çevresindeki damarlarda hiperemi tüm gruplarda görülen lezyonlardı.

Karaciğerde; 1. grupta (15-16. günler) hücre koronlarının adacıklar biçiminde ortaya çıktığı belirlendi. 1-6. grup (15-26. günler) embriyolarda özellikle parasentral ve subkapsular bölgede şiddetli kanama, V. sentralis ve V. interlobularislerde konjesyon, sinuzoidal dilatasyon, subkapsular nekroz (şekil-9), fokal lenfoid hücre odakları ve heterofil lökosit ile mononuklear hücrelerden oluşan perivasküler hücre infiltrasyonları tespit edildi. Yedinci grupta (27-28. günler) sadece sinuzoidal dilatasyon ve konjesyon görüldü. Böbreklerde; 1-5. gruplarda (15-24. günler) intersitisyel dokuda ve subkapsular yüzeylerde yaygın kanama, tubulus epitellerinde piknoz ve bu hücrelerin bazal laminadan ayrılarak lumene dökülmesi, toplayıcı tubuluslar ve intertubuler damarlar çevresinde heterofil lökosit infiltrasyonu, subkapsular fokal mononuklear hücre artışları, glomerular hiperemi ve Bowman boşluğunda serbest eritrositler tespit edildi. Altıncı ve 7. gruplarda (25-28. günler) intersitisyel dokuda hafif kanama dışında önemli bir lezyona rastlanmadı. İskelet Kaslarında; şiddetli intramuskuler kanamalar (şekil-10), konjesyon, intermuskuler ödem, kas hücrelerinde nekroz ve mononuklear hücreler ile heterofil lökositlerin bazı damarlar çevresinde artarak 3-4 hücre kalınlığına varan infiltratif odaklar oluşturduğu saptandı. Yirmikiinci günde alınan bazı olgularda, kanamaların şiddetli olduğu kas liflerinde birçok damarda ortaya çıkan ve damar çeperinin kalınlaşması, endotel hücrelerinin

şişmesi ve heterofil lökositlerin damar çeperine sızması ile karakterize vaskulitis görüldü. Bezli ve kaslı midede; mukozada kanama, L. epitelyaliste dökülme, L. propriada konjesyon, bezli midede bez alveollerinde serbest eritrositler ve kaslı midede T. muskulariste tüm tabakaya yayılan şiddetli kanama tespit edildi. CAM'da; 1-4. gruplarda (15-22. günler) epitel tabakada kalınlaşma, epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, subepitelyal tabakada ödem ve diffuz heterofil lökosit infiltrasyonu saptandı. Beşinci, 6. ve 7. gruplarda (23-28. günler) CAM'da herhangi bir değişikliğe rastlanmadı.

b) Allantois Boşluğuna İnokulasyon Yapılan Deneme Grubu Embriyolarda Mikroskopik Bulgular

BF'da; 1. ve 2. gruplarda (17-20. günler) primer plikaların şekillendiği ancak lenf folliküllerinin L. propriada epitelyal tomurcuklar halinde olduğu görüldü. L. epitelyaliste yer yer lumene dökülmeler, plikalarda diffuz heterofil lökosit infiltrasyonu, kanama ve ödem tespit edildi. Üçüncü ve 4. gruplarda (21-24. günler) plikal ödemin kısmen azaldığı gözlemlendi. İnterfolliküler yüzeylerde bağdoku hücrelerinde artış, intrafolliküler kanama, heterofil lökosit infiltrasyonu, bazı folliküllerde piknoz ve retiküler hücrelerde intrasellüler ödem saptandı. Beşinci ve 6. gruplarda (25-28. günler) plikalarda kanamaların azaldığı ve ödemin kaybolduğu görüldü. Ayrıca 6. grupta bazı embriyolarda interfolliküler bağdoku hücrelerinde artış, az sayıda ve düzensiz çapta follikül şekillenmesi, primer plikaların incelenmesi ve boyalarının küçülmesi izlendi. Dalakta; 1-4. grup (17-24. günler) embriyolarda, konjesyon, perivasküler heterofil lökosit infiltrasyonu, bazı kapillar damarlarda endotel hücrelerinde şişkinlik, subkapsular kanama ve özellikle bu



Şekil 10. İskelet kaslarında yaygın intramuskuler kanamalar. (SK. 22. gün. H.E. x 132)

kısımlarda ve periarteriyel bölgede piknotik hücreler belirlendi. Beşinci ve 6. gruplarda (25-28. günler) periarteriyel nekroz, kapsulada kalınlaşma ve bazı olgularda difüz ve şiddetli kanamalar saptandı. Timusda; lopcuklarda konjesyon, kortikal bölgede piknotik lenfositler, heterofil lökosit artışı ve özellikle 4. ve 5. grupta bazı embriyolar da lenfositlerde belirgin nekroz ve lenfositlerin boşalması ile ortaya çıkan fokal odaklar görüldü. Karaciğerde; 1-5. grup (17-26. günler) embriyolar da subkapsular koagulatif nekroz odakları, kanama ve bu kısımlarda yoğunlaşan lenfoid hücre infiltrasyonları, Kupffer hücre aktivasyonu, V. sentralisler çevresinde mononükleer hücre ve az sayıda heterofil lökositlerden oluşan ve 5-6 hücre kalınlığına varan infiltrasyonlar görüldü. Altıncı grup (27-28. günler) embriyolar da karaciğerde sadece parankimde kanama ve sinuzoidlerde dilatasyon dikkati çekti. Böbreklerde; intersitisyel dokuda kanama, bazı genişlemiş tubulus lumenlerinde eozinofilik kitleler, epitel hücrelerinde dejenerasyon, intertubuler damarlarda konjesyon ve bu bölgelerde heterofil lökosit infiltrasyonu tespit edildi. İskelet Kaslarında; difüz intramuskuler kanamalar, ödem, kas hücrelerinde nekroz ve perivasküler mononükleer hücre artışları görüldü. Bezli ve Kaslı midede; mide mukozasında kanama, L. epitelyalite piknotik hücreler, L. propriada lenfosit artışı, submukozada alveoler bezler çevresinde ödem ve subserozal konjesyon dikkati çekti. CAM'da; SK deneme grubuna benzer biçimde 1-4. gruplarda (17-24. günler) epitel tabakada proliferatif üremeler, epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, yaygın heterofil lökosit infiltrasyonları subepitelyal tabakada ödem ve konjestif değişimlere bağlı olarak membranda kalınlaşma görüldü. Beşinci ve 6. gruplarda (25-28. günler) ise ödemin kaybolduğu ve membranın belirgin olarak incelendiği gözlemlendi.

Tartışma

Günümüze kadar tavuk ve hindilerden izole edilen IBDV'ları antijenik özelliklerine göre 2 serotipe ayrılmış, tavuklardan izole edilenler serotip 1 ve hindilerden izole edilenler ise serotip 2 olarak belirlenmiştir (1,4,11,15,21,23,27-30). Tavuk izolatlarının duyarlı piliç sürülerinde klinik belirtili bir enfeksiyona ve hindi palazlarında subklinik bir hastalığa yol açtığı (11,23), hindilerden izole edilen IBDV'larının ise tavuk ve hindilerde enfeksiyöz ve taşınabilir olmaları ile birlikte patojenik olmadıkları tespit edilmiştir (8,21,22,27,28,30-32). Çalışmamızda ise kullanılan izolatin, broiler pil-

çlerde IBD'in spesifik klinik ve patolojik belirtileri, yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden bir salgında ölen piliçlerin BF'undan izole edilmesi ve izolata karşı hazırlanan antiserumda grup spesifik antijenin ortaya konulması bu izolatin serotip 1'e ait olabileceğini desteklemiştir. Zira literatürde de benzeri salgınlardan sadece serotip 1 izole edilmiştir (7,11).

IBD her ne kadar tavuklara özgü bir enfeksiyon olarak kabul edilirse de hindi palazlarının doğal olarak enfekte oldukları saptanmış ve deneysel enfeksiyonlar bildirilmiştir (4-6,33,34). Nitekim IBDV'un tavuk izolatu ile deneysel olarak enfekte edilen 1-7 günlük (32,35) ve 3-6 haftalık palazlarda (5,20,31), BF'da folliküler nekroz ve atrofi ile timus ve sekal tonsillerde lezyonlar görülmüştür. Ayrıca inokulasyonun 12. gününde virus spesifik antikörlerin saptanması, BF'da virus ile enfekte hücrelerin tespit edilmesi (32) ve başta BF olmak üzere birçok organ ve gaitadan etkenin izole edilmesi (1,11,20,31,35) palazların enfekte olduklarını doğrulamıştır. Hindi embriyolarında ise yapılan literatür incelemelerinde doğal yada deneysel enfeksiyon bildirilmemiş fakat tavuk (14,24,36-38) ve Pekin ördeği (19) embriyosunda tavuk izolatu ile deneysel enfeksiyon oluşturulmuş ve embriyo ölümleri kaydedilmiştir. Deneysel embriyo inokulasyonlarında virus ekimini izleyen 48 saat içinde şekillenen ölümler non-spesifik kabul edilmiş (7,14,33), daha sonraki ölümler ve IBD lezyonları ise hastalığın belirtileri olarak değerlendirilmiştir. Tavuk (4,20,24,36,37) ve Pekin ördeği (19) embriyosunda ölümlerin daha çok inokulasyonun 3-6. günlerinde şekillendiği açıklanmıştır. Çalışmamızda da ölümler daha çok inokulasyonun 3-7. günlerinde meydana gelmiş ve bu çalışmalarla bir benzerlik ortaya konulmuştur.

Tavuk embriyolarında yapılan bazı çalışmalarda embriyo ölümlerinin inokulasyon yoluna bağlı olarak değiştiği, CAM'a inokulasyonda %95, AB'una inokulasyonda %75 ve SK'ye inokulasyonda ise daha düşük oranlarda şekillendiği açıklanmıştır (36,38). Çalışmamızda ise embriyo ölüm oranları; SK deneme grubunda %20, AB deneme grubunda ise yaklaşık %17 olarak kaydedilmiştir. Çalışmamızda görülen ölüm oranları ile bu çalışmalarda kaydedilen oranların farklı oluşunda; muhtemelen tür farklılığı, virusun virulensi ve inokulasyon dozunun farklı olması rol oynayabilir. Zira IBDV'un virulensi yüksek bazı tavuk izolatları ile enfekte edilen piliç sürülerinde ölüm oranının %100'e kadar yükseldiği bildirilmesine (12,39,40) karşın, aynı izolat ile

enfekte edilen hindi palazlarında mikroskopik değişimler saptanmakla beraber ölüm olayına rastlanılmamıştır (15,23). Yine tavuk embriyolarında ölüm olaylarının %100 olarak bildirildiği bir çalışmada (38) virusun 7. tavuk embriyosu pasajı (ELD₅₀) 1 ml dozunda kullanılmış, çalışmamızda ise virusun 28. tavuk embriyosu pasajı (ELD₅₀) 0.1 ml dozunda kullanılmıştır.

Tavuk embriyolarında inokulasyonu izleyen 7. güne kadar enfekte embriyolarda vücut ağırlığının kontrollere göre yüksek olduğu ve bu dönemden itibaren ağırlık artışının azalarak kontrollerin altına düştüğü ifade edilmiştir (14,19). Araştırmamızda da sırasıyla tablo-2,3 ve şekil-1 de görüleceği gibi, hem SK hemde AB deneme gruplarında inokulasyonun 3-6. günlerinde enfekte embriyo vücut ağırlığının kontrollerden yüksek olduğu ve 7. günden itibaren azalarak kontrollerin ağırlığına erişemediği gözlenmiştir. İstatistiksel olarak inokulasyonun 3-6. günlerinde enfekte ve kontrol gruplarının vücut ağırlıkları ortalaması arasında oluşan fark (AB deneme grubunda 2. grup hariç) önemli (P<0.05) olmuştur. Yine tablo-2,3 ve şekil-2 de görüleceği gibi SK deneme grubunda 3-6. ve AB deneme grubunda ise inokulasyonun 3-8. günleri arasında BF'un ağırlıkları embriyo vücut ağırlığına paralel olarak aynı gün alınan kontrollere oranla yüksek bulunmuş ve Pekin ördeği embriyosunda yapılan çalışma (19) ile benzerlik göstermiştir. Ancak istatistiki yönden enfekte ve kontrol grubu embriyolar arasında oluşan fark sadece SK deneme grubunda 7. grup ve AB deneme grubunda ise 1. grupta önemli (P<0.05) bulunmuştur. Bu çalışmada inokulasyonu izleyen ilk günlerde şekillenen ve bir araştırmacı (34) tarafından civcivlerde enfeksiyonun 2-8. günleri arasında BF'da saptanan ağırlık artışının nedeni, aynı çalışmada belirtildiği gibi BF'da serozal hiperemi, peribursal ödem ve mukozal kanamalar ile izah edilmiştir. Literatürde rastlanılmamakla beraber bu çalışmada enfekte ve kontrol embriyoların dalak ağırlıkları da belirlenmiştir. Enfekte embriyo dalak ağırlıkları inokulasyonun 3-6. günlerinde kontrollerden kısmen yüksek bulunmuş (tablo-2,3 ve şekil-3) ancak istatistiksel olarak gruplar arasında önemli bir farkın oluşmadığı görülmüştür. Dalakta inokulasyonu izleyen ilk günlerde saptanan bu ağırlık artışları mikroskopik olarak gözlenen konjesyon, kanama ve heterofil lökosit artışı gibi geçici değişimlerin ilk günlerde daha şiddetli olmasına yorumlanabilir.

Tavuk ve Pekin ördeği embriyolarında enfekte gruplarda but uzunluğu ve but genişliğinin inokulasyonun 4-5. günlerine kadar kontrollerden yüksek olduğu, 8. gün-

den sonra subkutan ödem ve konjesyonun azalması ile kontrollerin altına düştüğü ifade edilmiştir (14,19). Bu sonuçlardan farklı olarak çalışmamızda hem SK (tablo-2, şekil-4,5) hemde AB (tablo-3, şekil-4,5) deneme grubunda genellikle enfekte embriyo but uzunluk ve genişlikleri kontrollerin altında seyretmiş ve böylece enfekte embriyolarda görülen gelişme geriliğini de desteklemiştir. Ancak istatistiksel olarak enfekte ve kontrol embriyo but uzunlukları arasında oluşan fark, AB deneme grubunda 3. grupta önemli (P<0.05) bulunmuş; but genişlikleri ise SK deneme grubunda 1. ve 7., AB deneme grubunda ise 2. ve 6. grupta önemli (P<0.05) olmuştur.

IBDV enfeksiyonlarında önemli bir bulgu olarak değerlendirilen (1,13,20,36,41) göğüs ve but kaslarında kanamalar, tavuk (20,37,38) ve Pekin ördeği (19) embriyolarında da bildirilmiştir. Çalışmamızda da her iki deneme grubunda inokulasyonun 3-8. günlerinde iskelet kaslarında, ayak parmaklarında ve baş bölgesinde kanamalara rastlanmıştır. Yine bu çalışmada nekropside BF'da serozada peteşial kanamalar, karaciğerde nekroz ve böbreklerde hiperemi gözlenmiş, tavuk (11, 14, 20, 24, 33, 36, 42) ve Pekin ördeği (19) embriyosunda görülen lezyonlarla uyum içinde olduğu dikkati çekmiştir.

Normal olarak tavuk embriyolarında 13-14. günlerde ortaya çıktığı bildirilen (14,43,44) primer plikaların çalışmamızda 15. günde ortaya çıktığı görülmüştür. Yine normal tavuk embriyosunda 12-16. kuluçka günlerinde şekillendiği belirtilen (43) lenf folliküllerinin, IBDV ile enfekte tavuk embriyosunda 15. güne kadar şekillenmediği ve 16-18. günlerde ise az sayıda oldukları açıklanmıştır (38). Çalışmamızda da benzeri şekilde 16. günden itibaren folliküllerin oluştuğu gözlenmiş ancak enfekte grupların kontrollere kıyasla daha az sayıda lenf follikülüne sahip oldukları ve lenfosit içeriklerinin de yetersiz olduğu gözlenmiştir. Enfekte embriyolarda folliküllerin lenfosit içeriklerinin yetersiz olması, virusun özellikle B lenfositler üzerinde nekrotik etkisinin (39,45) yanısıra, mezenkimal hücrelerin lenfoblastlara ve onlarında B lenfositlere farklılaşmasının (43,44) virus tarafından bloke edilmesine yorumlanabilir. Zira embriyonal BF'da 18. kuluçka gününde görülen (51) ve virusun primer afinite gösterdiği bildirilen (10,12,17) IgM üreten B lenfositlerin sırasıyla IgG>IgA>IgB üreten B lenfositlere dönüşümünün bloke edildiği saptanmış ve immün sistemin baskılanmasında önemli bir mekanizma olarak açıklanmıştır (10,17).

Çalışmamızda inokulasyonun 4-7. günleri arasında BF plikalarında intrafolliküler ve interfolliküler kanamaların şekillendiği ve plikaların genişlemesine yol açtığı gözlenmiştir. Bazı çalışmalarda (20,33,42) ise enfeksiyonun 5. gününe kadar görülen ve geçici değişimler olarak tanımlanan bursal kanamaların bir araştırıcı tarafından (14) da ileri sürüldüğü gibi diapedezis yoluyla şekillendiği sanılmaktadır. IBDV ile enfekte tavuk embriyolarında (38) 16-18. günlerde görülen piknotik lenfositler araştırmamızda da aynı dönemlerde görülmüş, ayrıca 25-28. günlerde folliküler medullada içlerinde nekrotik doku bulunan kist benzeri yapılar saptanmıştır. Benzeri kistik yapılar bazı çalışmalarda (48,49) bir günlük civcivlerde de folliküler medullada gözlenmiş ve kistik bursitis olarak adlandırılmıştır. Birtakım çalışmalarda (34,40) ise anılan lezyonun folliküller medullada görülmesi, bu bölgenin değişik gelişim evrelerinden lenfositleri içeren lenfositopietik bir merkez olması (36,50) ve virusun özellikle bu bölgedeki olgunlaşmış B lenfositlere karşı predileksiyon göstermesi ile açıklanmıştır (15,34,46,48).

Enfekte civcivlerde (4,24,41,45) ve Pekin ördeği embriyosunda (19) dalakta bildirilen kanama ve nekroz bu çalışmada daha hafif olarak görülmüş, ayrıca enfekte embriyolarda germinal merkezlerin kontrollere göre daha geç şekillendikleri tespit edilmiştir. Enfekte embriyolarda germinal merkezlerin daha geç şekillenmesi, virusun B lenfositler üzerindeki direk etkisi sonucu BF'da folliküllerin oluşumunun gecikmesine paralel olarak dalakta sözkonusu oluşumların gelişiminin baskılanması ile izah edilmektedir (10). Zira embriyonal gelişimin sonuna doğru veya kuluçkadan çıktıktan kısa bir süre sonra BF'tan, dalak, timus ve sekal tonsiller gibi sekonder lenfoid organlara doğru B lenfosit göçü başlamakta (bir tür geriye periferilizasyon) ve kuluçkadan çıktıktan sonra 3 hafta içinde tamamlanmaktadır. Bu nedenle BF'da erken embriyonal dönemde B lenfositlerin nekrozunun sekonder lenfoid organlarda BF'a bağımlı bölgelerin oluşumunu engelleyebileceği düşünülmektedir. Tavuk ve Pekin ördeği embriyosunda virusun timusta yol açtığı değişimlerin incelenmemesine karşın, çalışmamızda inokulasyonun 3. gününden itibaren her iki deneme grubunda enfekte embriyolarda timik kortekste piknotik lenfositler, kanama ve bazı olgularda ise lenfositlerin nekrozu ve boşalması ile karakterize fokal odaklar tespit edilmiştir. Timusta lenfosit boşalması ve virusun bu hücreler üzerindeki etkisi bildirilmiş (18,47), ayrıca embriyonal dönemde ve bir günlük iken IBDV ile enfekte edilen civcivlerin kanında B lenfosit sayısının yanısıra T lenfosit sayısının da azalması

hücrel immun sisteminde baskılandığı sonucuna götürmüştür.

Gerek doğal enfeksiyonlarda civcivlerde (9,13,16) gerekse deneysel olarak enfekte edilen tavuk (14,24,36) ve Pekin ördeği (19) embriyolarında başta karaciğer olmak üzere non-lenfoid organlarda bazı değişimler gözlenmiştir. Tavuk embriyolarındaki bir çalışmada (14) inokulasyonu izleyen ilk günlerde karaciğer hücre kordonlarının adacıklar şeklinde ortaya çıktığı ve nekropside görülen mozaik benzeri çizgilerin ise mikroskobik olarak subkapsular nekrozlar halinde görüldüğü ifade edilmiştir. Buna paralel olarak çalışmamızda da inokulasyonun 3-4. günlerinde Remark hücre kordonlarının bozulduğu izlenmiş, organa benekli bir görünüm veren çizgilerin ise kimi olgularda tüm subkapsular alana yayılan koagülasyon nekrozları olduğu görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada daha çok subkapsular ve periasiner olarak görülen lenfoid hücre infiltrasyonları, piliçlerde de ortaya konulmuş (12,13,16) ve ektopik lenfoid odaklar olarak ifade edilmiştir. Çalışmamızda böbreklerde özellikle 1-5. gruplarda tespit edilen intersitisyel kanama ve konjesyon Pekin ördeği embriyosu (19) ve civcivlerde (4,16) de bildirilmiştir. Özellikle subkapsular yüzeylerde, toplayıcı tubuller ve intertubuler damarlar çevresinde ortaya çıkan heterofil lökosit ve mononükleer hücre artışları yine birçok çalışmada civcivlerde bildirilmiştir (4,16,36,38,41). Bazı çalışmalarda (1,13) ise böbreklerde mononükleer hücre artışları non-spesifik antijen uyarımına, heterofil lökosit infiltrasyonları ise lokalize kemotaktik faktörlere bağlanmıştır. Çalışmamızda özellikle inokulasyonun 3-7. günleri arasında göğüs ve but kaslarında diffuz yada fokal olarak görülen intramusküler kanamalar, kas hücrelerinde nekroz ve perivasküler mononükleer hücre artışları tavuk (11,14,24,37,38) ve Pekin ördeği (19) embriyolarında bildirilen değişimlerdir. İki haftalığa kadar olan civcivlerde sıklıkla ortaya konulan (4,16,20,36) bezli mide mukozasında kanamalara, çalışmamızda hem bezli hemde kaslı mide mukozasında rastlanmıştır. Yine bu çalışmada CAM'da SK deneme grubunda inokulasyonun 3-6. ve AB deneme grubunda ise 3-9. günlerinde görülen epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, subepitelial tabakada ödem ve kalınlaşma Pekin ördeği embriyolarında (19) da gözlenmiş, tavuk embriyolarında ise bir çalışmada (14) CAM'da kanamalar bildirilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgularla hindi embriyolarının IBDV'un tavuk izolatu ile enfekte oldukları ortaya konulmuş ve hastalık için spesifik kabul edilen

makroskopik ve mikroskopik değişimlerin başta BF olmak üzere birçok iç organda şekillendiği gözlenmiştir. Ancak saptanan lezyonların, lokalizasyon ve nitelik olarak SK ve AB deneme grupları arasında önemli bir fark göster-

memesine karşın, SK deneme grubunda kısmen daha şiddetli olduğu ve embriyoların bu yolla yapılan virus inokulasyonuna karşı daha duyarlı oldukları sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. Cummings, T.S., Broussard, C.T., Page, R.K., Thayer, S.G. and Lukert, P.D.: Infectious Bursal Disease Virus in Turkeys. *Vet. Bull.*, (1986), 56, (9), 757-762
2. Fadly, A.M. and Nazerian, K.: Pathogenesis of Infectious Bursal Disease in Chickens Infected with Virus at Various Ages. *Avian Dis.*, (1983), 27, (3), 714-723.
3. Ismail, N.M., Fadly, A.M. and Chang, T.S.: Effect of Bursal Cell Number on the Pathogenesis of Infectious Bursal Disease in Chickens. *Avian Dis.*, (1987), 31, 546-555.
4. Abdu, P.A., Abdullahi, S.U., Adesiyun, A.A. and Ezeokoli, C.D.: Infectious Bursal Disease. (Review), *World's Poult. Sci. j.*, (1986), 42, (3), 219-231.
5. Chui, C.H. and Thorsen, J.: Experimental Infection of Turkeys with Infectious Bursal Disease Virus and the Effect on the Immunocompetence of Infected Turkeys. *Avian Dis.*, (1984), 28, (1),197-207.
6. Greenfield, C.L., Dohms, J.E. and Dietert, R.R.: Infectious Bursal Disease Virus Infection in the Quail-Chicken Hybrid. *Avian Dis.*, (1986), 30, (3), 536-542.
7. Winterfield, R.W., Fadly, A.M. and Bickford, A.: Infectivity and Distribution of Infectious Bursal Disease Virus in the Chicken. Persistence of the Virus and Lesions. *Avian Dis.*,(1972),16, 622-632.
8. Jackwood, D.J., Saif, Y.M., Moorhead, 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, (1), 100-116.
9. Ley, D.H., Yamamoto, R. and Bickford, A.A.: Immune-Complex Involvement in the Pathogenesis of Infectious Bursal Disease Virus in Chickens. *Avian Dis.*, (1979), 23, (1), 219-224.
10. Nakai, T. and Hirai, K.: In Vitro Infection of Bursaectomized Chicken Lymphocytes by Infectious Bursal Disease Virus. *Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ.*, (1984), 49, 239-245.
11. Rosales, A.G., Villegas, P., Lukert, P.D., Fletcher, O.J., Mohamed, M.A. and Brown, J.: Isolation, Identification, and Pathogenicity of Two Field Strains of Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Dis.*, (1989), 33, 35-41.
12. Kaufer, I. and Weiss, E.: Significance of Bursa of Fabricius as Target Organ in Infectious Bursal Disease of Chickens. *Infect. Immun.*, (1980), 27, (2) 364-367.
13. Ley, D.H., Yamamoto, R. and Bickford, A.A.:The Pathogenesis of Infectious Bursal Disease: Serologic, Histopathologic, and Clinical Chemical Observations.*Avian Dis.*,(1983),27,(4),1060-1085.
14. Leyk, W.: Makro-und Mikroskopische Veranderungen des Hühnerembryos Nach Experimenteller Infektion Mit Dem Erreger der Infektiösen Bursitis Der Junghennen.Th.,Inaug.Dis.,Giessen, (1971).
15. Saif, Y.M.: Immunosuppression Induced by Infectious Bursal Disease Virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, (1991), 30, 45-50.
16. Okoye, J.O.A.: Histopathology of Infectious Bursal Disease in Non-Lymphoid Organs of Chickens. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop.*, (1985), 38, (3), 229-234.
17. Hirai, K., Funakoshi, T., Nakai, T. and Shimakura, S.: Sequential Changes in the Number of Surface Immunoglobulin-Bearing B Lymphocytes in Infectious Bursal Disease Virus-Infected Chickens. *Avian Dis.*, (1981), 25, (2), 484-496.
18. Sharma, J.M. and Lee, L.F.: Effect of Infectious Bursal Disease on Natural Killer Cell Activity and Mitogenic Response of Chicken Lymphoid Cells: Role of Adherent Cells in Cellular Immune Suppression. *Infect. Immun.*, (1983), 42, (2), 747-754.
19. Karadaş, E. ve Metin, N.: Enfeksiyöz Bursal Hastalık (IBD-Gumboro hastalığı) Virusu ile Enfekte Edilmiş Pekin Ordeği Embryosunda Makroskopik ve Mikroskopik Değişimler. *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences.*, (1994), 18, 339-345.
20. Lukert, P.D. and Hitchner, S.B.: Infectious Bursal Disease. *Dis. of Poult.*, 8th Ed., Iowa State Univ. Press., Ames, Iowa, pp. 566-576, (1984).
21. Chin, R.P., Yamamoto, R., Lin, W., Lam, K.M. and Farver, T.B.:Serological Survey of Infectious Bursal Disease Virus Serotypes 1 and 2 in California Turkeys. *Avian Dis.*,(1984),28,(4), 1026-1036.
22. Jackwood, D.J. and Saif, Y.M.: Prevalence of Antibodies to Infectious Bursal Disease Virus Serotypes I and II in 75 Ohio Chicken Flocks. *Avian Dis.*, (1983), 27, (3), 850-854.
23. Neumann U., Leopold, S., Behr, K.-P., Lüders, H. and Siegmann, O.: Sequential Serological Studies in Different Turkey Farms in Northern Germany. 2. Report: Detection of Humoral Antibodies Against Infectious Bursal Disease Virus Serotype I and II., *Arch. Geflügelk.*, (1991), 55, (1), 14-18.
24. Hitchner, S.B.: Infectivity of Infectious Bursal Disease Virus For Embryonating Eggs. *Poult. Sci.*, (1970), XLIX, (2), 511-516.
25. Luna, L.G.: *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology.* 3th ed., McGraw-Hill Book Company, New York, (1968).
26. Sümbüloğlu, K. ve Sümbüloğlu, V.: *Biyoistatistik*, 4. Baskı, Özdemir Yayıncılık, (1993), Ankara.

27. Ismail, N.M., Saif, Y.M. and Moorhead, P.D.: Lack of Pathogenicity of Five Serotype 2 Infectious Bursal Disease Viruses in Chickens. *Avian Dis.*, (1988), 32, 757-759.
28. Jackwood, D.J., Saif, Y.M. and Moorhead, P.D.: Immunogenicity and Antigenicity of Infectious Bursal Disease Virus Serotypes I and II in Chickens. *Avian Dis.*, (1985), 29, (4), 1184-1194.
29. Lam, K.M.: Lysis of Chicken Lymphocytes by Infectious Bursal Disease Viruses. *Avian Dis.*, (1988), 32, 818-821.
30. Sivanandan, V., Sasipreeyajan, J., Halvorson, D.A. and Newman, J.A.: Histopathologic Changes Induced by Serotype II Infectious Bursal Disease Virus in Specific-Pathogen-Free Chickens. *Avian Dis.*, (1986), 30, (4), 709-715.
31. Jackwood, D.J., Saif, Y.M. and Hughes, J.H.: Characteristic and Serologic Studies of Two Serotypes of Infectious Bursal Disease Virus in Turkeys. *Avian Dis.*, (1982), 26, (4), 871-882.
32. Perelman, B. and Heller, E.D.: The Effect of Infectious Bursal Disease Virus on the Immune System of Turkeys. *Avian Dis.*, (1983), 27, (1), 66-76.
33. Benton, W.J., Cover, M.S. and Rosenberger, J.K.: Studies on the Transmission of the Infectious Bursal Agent (IBA) of Chickens. *Avian Dis.*, (1967), 11, 430-438.
34. Mohanty, G.C., Pandey, A.P. and Rajya, B.S.: Infectious Bursal Disease in Chickens. *Curr. Sci.*, (1971), 40, 181-184.
35. Eddy, R.K., Chettle, N.J. and Wyeth, P.J.: Antibody Responses and virus Reisolation in Turkeys Experimentally Infected With an Infectious Bursal Disease Isolate. *Vet. Rec.*, (1985), 116, 368-369.
36. Faragher, J.T.: Infectious Bursal Disease of Chickens. *Vet. Bull.*, (1972), 42, (6), 361-369.
37. Kandil, M. ve Metin, N.: İmmunodifüzyon ve Histopatolojik Yöntemler Yardımı ile Tavuklarda Enfeksiyöz Bursitisin Yayılımı Üzerinde Araştırmalar. *F.Ü. Vet. Fak. Derg.*, (1981), 6, (1-2), 43-49.
38. Kandil, M. ve Metin, N.: Enfeksiyöz Bursitis Virusu ile Enfekte Edilmiş Tavuk Embryosunda Makroskobik Bulgular ve Embryonal Bursa Fabricii'de Histopatolojik Değişimler. *F. Ü. Vet. Fak. Derg.*, (1982), VII, (1-2), 277-284.
39. Burkhardt, E. and Müller, H.: Susceptibility of Chicken blood Lymphoblasts and Monocytes to Infectious Bursal Disease Virus (IBDV). *Arch. Virol.*, (1987), 94, 297-303.
40. Kaufer, I. and Weiss, E.: Electron-Microscope Studies on the Pathogenesis of Infectious Bursal Disease After Intrabursal Application of the Causal Virus. *Avian Dis.*, (1976), 20, (3), 483-495.
41. Helmboldt, C.F. and Garner, E.: Experimentally Induced Gumboro Disease (IBA). *Avian Dis.*, (1964), 8, 561-575.
42. Jhala, M.K., Kher, H.N. and Prajapati, K.S.: Experimental Infection of Infectious Bursal Disease Virus in Chicken. *Indian J. Anim. Sci.*, (1990), 60, (11), 1309-1310.
43. Ackherman, G.A. and Knouff, R.A.: Lymphocytopoiesis in the Bursa of Fabricius. *Am. J. Anat.*, (1959), 104, (2), 163-178.
44. Ackherman, G.A.: Electron Microscopy of the Bursa of Fabricius of the Embryonic Chick with Particular Reference to the Lymphoepithelial Nodules. *J. Cell Biol.*, (1962), 13, 127-146.
45. Cheville, N.F.: Studies on the Pathogenesis of Gumboro Disease in the Bursa of Fabricius, Spleen, and Thymus of the chicken. *Am. J. Pathol.*, (1967), 51, 527-551.
46. Müller, R., Kaufer, I., Reinacher, M. and Weiss, E.: Immunofluorescent Studies of Early Virus Propagation After Oral Infection with Infectious Bursal Disease Virus (IBDV). *Zbl. Vet. Med. B.*, (1992), 26, 345-352.
47. Okoye, J.O.A., Nwosuh, C.I., Onwujiobi, C.B.O., Onuoha, A.S. and Okonkwo, P.U.: Pathogenesis of Infectious Bursal Disease in Cyclophosphamide-treated Chickens. *Avian Pathol.*, (1992), 21, 615-620.
48. Nagi, S.A. and Millar, D.L.: Morphologic Changes in the Bursa of Fabricius of Chickens After Inoculation with Infectious Bursal Disease Virus. *Am. J. Vet. Res.*, (1979), 40, (8), 1134-1139.
49. Singh, L.D.K. and Rao, A.T.: Effect of Levamisole and Prednisolone on Chicken Infected with Infectious Bursal Disease Virus. *Indian J. Anim. Sci.*, (1988), 58, (5), 589-593.
50. Frazier, J.A.: The Ultrastructure of the Lymphoid Follicles of the chick Bursa of Fabricius. *Acta. Anat.*, (1974), 88, 385-397.
51. Hirai, K., Kunihiro, K. and Shimakura, S.: Characterization of Immunosuppression in Chickens by Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Dis.*, (1979), 23, (4), 950-965.