

İNFEKSİYÖZ BRONŞİTİS'E KARŞI AŞILANMIŞ TAVUKLARDA BAĞIŞIKLIK KRİTERİNİN SAPTANMASI*

Fuat Aydın**

The evaluation of immune status of hens vaccinated against infectious bronchitis.

Summary: *In this study a group of commercial layer hens were vaccinated against infectious bronchitis at 10 and 23 weeks of age with H120 and H52 strains, respectively. The immunity produced in laying hens following the intra-ocular administration of the vaccines was determined with HI and AGP tests. Birds in vaccinated group were classified into groups at 2 months after the second vaccination and following this classification all the birds were challenged intratracheally with IBV M41 strain and the relation between the clinical signs and prechallenge HI titers were evaluated.*

The mean HI titer measured 4 weeks after H 120 vaccination was found to reach a maximum level which was calculated as \log_2 7.76. After the second vaccination with H 52, a remarkable increase both in mean HI titers and in number of birds with positive AGP test results 4th week post-vaccination as measured \log_2 9.32. The minimum and maximum numbers of AGP positive birds were found to be 5.71 % and 29.88 %, respectively.

In the vaccinated group, pre-challenge mean HI titers were \log_2 7.02 where post-challenge mean HI titers were \log_2 6.29. In the control group, mean HI titers of \log_2 9.45 were calculated and 14 serum samples (70 %) were found to be AGP positive.

Birds having a mean HI titer of \log_2 6 or more before challenge, seemed to be more resistant against infection but no correlation was found between the resistance and the percentage of birds reacting in AGP.

* Aynı başlıklı Doktora tezinden özetlenmiş olan bu çalışma A.Ü. Araştırma fonu tarafından desteklenmiştir (90 30 00 08 No'lu proje).

** Dr., A.Ü. Kars Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars.

When compared with AGP test, HI test was found to be more sensitive in detecting the immunity produced following vaccination or infection. Moreover, a weak correlation was found between the results of the two tests.

Özet: *Bu çalışmada infeksiyöz bronşitis'e karşı 10. hafta H120, 23.hafta H52 suşu ile burun-göze damlatma yöntemiyle aşılanmış yumurtacı tavuklarda oluşan bağışıklık HI ve AGP testleriyle saptanmıştır. İkinci aşılardan 2 ay sonra aşılu gruptakiler HI titrelere göre gruplandırıldıktan sonra denemedeki tüm hayvanlar IBV M41 suşu ile intratracheal yolla eprüve edilerek hayvanların eprüvasyon öncesi HI titreleri ile klinik belirtisi arasındaki ilişki değerlendirilmiştir.*

H120 ile aşılardan 4 hafta sonra ortalama HI titresi pik noktaya çıkmış ve \log_2 7.76 olarak saptanmıştır. AGP pozitif hayvan yüzdesi 3.75 ile 6.89 arasında değişmiştir. H52 ile yapılan ikinci aşılardan sonra hem HI titresinde hem de AGP pozitif hayvan yüzdesinde belirgin bir artış gözlenmiş ve ortalama HI titresi 4. hafta pike çıkmış ve \log_2 9.32 olarak belirlenmiştir. AGP pozitif hayvan sayısı en düşük % 5.71 en yüksek % 29.88 olarak saptanmıştır.

Eprüvasyon öncesi aşılu grupta ortalama HI titresi \log_2 7.04 eprüvasyondan sonra ise \log_2 6.29 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda eprüvasyondan 10 gün sonra ortalama HI titresi \log_2 9.45 AGP pozitif hayvan sayısı ise % 70 (14 hayvan serumu) olarak saptanmıştır.

Eprüvasyon öncesi ortalama HI titresi \log_2 6.0 ve yukarısında olan hayvanlar infeksiyona dirençli bulunmuş ancak AGP pozitif hayvan yüzdesi ile infeksiyona direnç arasında herhangi bir ilişki gözlenmemiştir.

HI testi aşılama ve infeksiyon sonrası oluşan immun yanıtın gösterilmesinde AGP testine göre daha duyarlı bulunmuş ve iki testin sonuçları arasında zayıf bir ilişki gözlenmiştir.

Giriş

İnfeziyöz bronşitis, tavuk yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan viral bir infeksiyondur. Hastalık yumurtacı tavuklarda yumurta veriminin düşmesine, civcivlerde ise gelişememeye ve ölümlere neden olmaktadır (10,37,42), Hastalığın ilk defa 1931 yılında ABD'de (43) tespitinden sonra, yapılan çalışmalarla tüm dünyada hüküm sürdüğü saptanmıştır (47). Yurdumuzda etken izolasyon

ve identifikasyonu yapılamamış olmasına karşın hastalığın varlığı serolojik olarak ortaya konmuştur (16,41).

Hastalığın teşhisi, direkt olarak infekte dokulardan virus izolasyonu (12,24), indirekt olarak da enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (35,44), virus nötralizasyon (VN) (12,33), hemaglutinasyon inhibisyon (HI) (9,16,22,33,36) ve agar jel presipitasyon (AGP) (11,28) gibi serolojik testlerle yapılmaktadır.

Herhangi bir işleme tabi tutulmamış IB virusunun tavuk eritrositlerini aglutine etme özelliği yoktur (5,14). Virusa HA özelliği kazandırmak için tripsin ya da eter ile muamelesi denenmiştir (6). Bu işlemlerle virus hemaglutinasyon aktivitesi kazanmasına karşın, bu aglutinasyonun hem spesifik hem de non-spesifik serumlarla inhibe edilmesinden dolayı uzun yıllar HI testi konvensiyonel bir test olarak kullanılamamıştır. 1975 yılında Bingham ve ark,(5) virusun konsantrasyonu ve Clostridium perfringens'den elde edilen fosfolipaz C enzimi ile muamelesinden sonra tavuk ve kobay eritrositlerini aglutine ettiğini ve bu HA aktivitesinin sadece spesifik antiserumlarla giderilebileceğini göstermişlerdir. Alexander ve ark. (2) ve Alexander ve Chettle (1) HA ve HI test prosedürlerini geliştirerek HI testinin kısa sürede sonuç verdiğini, duyarlı ve kolay bir test olduğunu, elde edilen sonuçların diğer serolojik testlerle (VN,CF,AGP) karşılaştırılabileceğini bildirmişlerdir. Daha sonra HI testi birçok laboratuvarında hastalığın teşhisi yada aşılama sonrası oluşan immun yanıtın gösterilmesi için yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (8,18,25,37).

HI testi IBV suşları arasındaki antijenik ilişkiyi saptamak (9,13), aşılı (8,18,23,35,38) ve infekte (16,33,36) hayvanlarda oluşan immun yanıtı göstermek için kullanılmıştır. Test % 1 (1,2,22), % 0.5 (26,38) ve % 0.6'lık (20) yıkanmış tavuk eritrositi kullanılarak U (1,38) veya V (16) şeklindeki mikropelatelerde yapılmaktadır.

HI antikorumları infeksiyondan 1 hafta sonra saptanabilmekte (22) ve 4. haftada (3,37) pike çıkmaktadır. Alexander ve ark,(3) IB virusunun H52, H120 ve T suşuyla deneysel olarak infekte ettikleri 3 haftalık SPF civcivlerde HI titresinin infeksiyondan sonra 28. günde pike çıktığını ve 227 gün boyunca diagnostik düzeyde kaldığını, Müneer ve ark, (37) 77 haftalık yumurtacı tavukların IBV ile intraoküler yolla infeksiyonunu takiben yumurtaların ağırlığının azaldığını, iç ve dış kalitesinin düştüğünü ve bu hayvanlarda serum HI titresinin infeksiyondan 4 hafta sonra maksimum seviyeye yükseldiğini saptamışlar-

dır. Demiröz ve ark, (16) HI testiyle inceledikleri şüpheli serumların 32.98'ini M41, % 45.92'sini D274 serotipine karşı pozitif bulmuşlardır. HI testi çeşitli araştırmacılar tarafından (9,13) IB virusunun suşları arasındaki antijenik ilişkiyi göstermek için kullanılmış ve test edilen suşlar arasında yoğun kros reaksiyonlar gözlenmiştir. Cook ve ark. (13) kros reaksiyonlardan dolayı HI testinin tiplendirmede kullanılmayacağını ileri sürmüşlerdir.

Agar jel presipitasyon (AGP) testi virusa karşı oluşan antikorları saptamak (11) ya da antijenin direkt identifikasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır (17,21). Test Woernle (46) tarafından standarde edilmiştir. Gelb ve ark. (21) broilerlerde IB infeksiyonuna neden olan 5 izolatu AGP testi ile identifiye etmişlerdir. Maiti ve ark. (32) bu testle yumurta verimi düşüklüğü görülen tavuklardan sağlanan 464 serum örneğinden 21'inde (% 4.5) IB'e karşı antikor tespit ettiklerini açıklamışlardır.

Gough ve Alexander (22) ticari bir aşı ile aşılama sonrası oluşan primer immun yanıtı göstermek için HI, AGP, CF ve VN testlerini kullanmışlardır. HI testiyle antikorların aşılama 1 hafta sonra tespit edilmeye başlandığını ve 14 haftalık bir periyod içinde diagnostik düzeyde kaldığını, presipitinlerin ise 1. haftada tespit edilmesine karşın bu antikorların geçici ve değişken olduğunu ve AGP ile HI testi arasında zayıf bir korelasyon bulunduğunu açıklamışlardır. McDonald ve ark. (31) sahada 3.hafta H120, 8. hafta HL ve 17 haftada H52 suşuyla aşılanmış (içme suyu) broiler damızlıklardaki HI ve AGP yanıtını incelemişlerdir. Araştırmacılar HI titrelerini (\log_2) aşılama öncesi 1.2, aşılama 5. haftada 4.6, 10. haftada 5.3, 17. haftada 6.5, 25. haftada 10,2 ve 30. haftada 8.2 olduğunu, AGP pozitif hayvan yüzdesinin ise 2.haftada negatif, 5-6. haftalarda % 50'nin altında, 25. haftada % 84 ve 30. haftada % 33 olduğunu bildirmişlerdir.

Hastalıktan korunmak için genelde broiler ve yumurtacılar için iki farklı aşılama programı bulunmaktadır (24). Broilerler 1.haftada canlı attenüe aşıyla (24), yumurtacılar ise 1.haftadaki canlı attenüe aşıyla aşılamayı takiben yumurtalama periyodunun (15-16.hafta) başlangıcında inaktive aşıyla aşılanmaktadır (8,34,38).

Aşılı hayvanların patojen IB virusuna karşı dirençleri konusunda diğer ülkelerde çeşitli kriterler (yumurta verimi, virus izolasyonu, klinik belirti vb.) esas alınarak yapılan çalışmalar mevcuttur (8,15,22,23, 33). Mcpherson ve Feest (33) yaptıkları saha taramasında H120 ve

H52 ile aşılanmış broiler ve broiler damızlıklarda hastalığın klinik belirtileri ile HI titresi arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Broilerlerde \log_2 4-5, yumurtacılar da ise \log_2 5-6 arası HI titresinin enfeksiyona karşı koruyucu olduğunu bildirmişlerdir. Darbyshire ve Peters (15) IB'e karşı maternal antikör taşıyan civcivleri H120 ile aşıladıktan (intranasal yolla) sonra değişik zaman aralıklarında eprüve etmişler ve hayvanlardaki korunmayı saptamak için tracheal siliar aktivitenin ölçümünü esas almışlar, immun yanıtı göstermek için de HI ve VN testlerini kullanmışlardır. Araştırmacılar eprüvasyondan sonra histopatolojik bulgular ile siliar aktivite arasında mutlak bir ilişki bulduklarını, buna karşın HI titreleri ve korunma arasındaki ilişkiyi incelediklerinde sadece HI titresi \log_2 6 ve yukarı olan hayvanların korunduğunu açıklamışlardır. Gough ve Alexander (22) ticari bir aşı ile aşılanmış 3 haftalık civcivleri 22. haftada IBV M41 suşuyla aerosol yolla eprüve etmişlerdir. Araştırmacılar immun yanıtı göstermek için AGP ve HI testlerini kullanmışlar ve eprüvasyondan sonra hayvanlardaki korunmanın derecesini belirlemek için eprüvasyondan 4 gün sonra hayvanların öldürülerek iç organlarından (böbrek, ovidukt, trachea) virus izolasyonunu kriter olarak almışlardır. Eprüvasyon öncesi ortalama HI titreleri \log_2 5 ve altında olan hayvanlardan virus izole edildiğini, titresi \log_2 6 ve yukarısında olan hayvanlardan virus izole edilemediğini, AGP test sonuçları ile korunma arasında herhangi bir korelasyon bulunmadığını bildirmişlerdir. Box ve ark. (8) enfeksiyöz bronşitis'e karşı aşıları tavukların virülent IB virusu ile eprüve eddiklerinde yumurta verimlerinin HI titreleri ile ilişkili olduğunu, HI titresi \log_2 8 ve yukarısında olan hayvanların yumurta veriminde hiç bir değişiklik olmadığını saptamışlardır.

Yurdumuzda hastalığın varlığı bildirilmesine ve aşılama programları uygulanmasına karşın konu ile ilgili herhangi bir araştırma yapılmamıştır.

Bu çalışmada, enfeksiyöz bronşitis'e karşı aşılanmış tavuklarda oluşan bağışıklığın HI ve AGP testleri ile saptanması, HI titrelerine göre gruplandırılan hayvanların patojen IB virusu ile eprüvasyonundan sonra bu enfeksiyona karşı aşılama sonrası oluşan koruyucu HI titresinin ülkemiz koşullarında belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Virus: Hemaglutinasyon (HA), hemaglutinasyon inhibisyon (HI) antijenlerinin hazırlanması ve eprüvasyon çalışmalarında kullanılan

IBV M41 suşu Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü'nden, agar jel presipitasyon (AGP) antijeninin hazırlanmasında kullanılan IBV Beaudette suşu ise Bakteriyoloji Bilim Dalı kültür kolleksiyonundan temin edilmiştir.

Embriyolu Tavuk Yumurtaları: Virusun üretilmesi ve HA, HI ve AGP testlerinde kullanılan antijenin hazırlanmasında gerekli olan embriyolu SPF tavuk yumurtaları Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü'nden sağlanmıştır.

Deneme Hayvanları: Çalışmada özel bir yetiştirmeden sağlanan 1 günlük 125 adet Hisex Brown ırkı yumurtacı civciv kullanılmıştır. Hayvanların 25 tanesi kontrol, 100 tanesi de deneme grubunu oluşturmuştur.

Aşılar: Çalışmada, Intervet firmasına ait IB H120 (Intervet, IB vaccine nobilis) ve Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü tarafından üretilen canlı, liyofilize H52 aşıları kullanılmıştır.

Mikroplate'ler: HA ve HI testlerinde Greiner firmasına ait altı yuvarlak 96 gözlü mikroplate'lerden yararlanılmıştır.

Tampon Sıvılar: HA ve HI testlerinde sulandırma sıvısı olarak PBS (pH 7.2) ve fosfolipaz C enziminin sulandırılması amacıyla da 0.01 M Tris-HCl bufferden (pH 6.5) yararlanılmıştır.

Phospholipase C Enzimi: HA antijeninin hazırlanmasında Clostridium perfringens'den elde edilen fosfolipaz C enzimi (Sigma Chemical Co.125 Ünite, Tip 1) konsantre edilen virusa, Tris-HCl bufferde sulandırılıp 10 IU / ml oranında katılarak kullanılmıştır.

Yıkamış Tavuk Eritrositi: Kan Alsever solüsyonuna 1 / 3 oranında alınıp 3 kez PBS solüsyonu ile yıkamış (1000 g'de 10 dak.) ve sediment PBS ile % 2 oranında sulandırılarak GA ve HI testlerinde kullanılmıştır.

Hiperimmün Serum Hazırlanması: Bilim dalı deneme hayvanları ünitesinde konvensiyonel olarak barındırılan 6 adet 6 aylık horoza, IB H52 aşısı 10 ml PBS ile sulandırılıp 0.1 ml intratracheal yolla birer hafta aralıklarla 4 kez inoküle edilmiş son inokülasyondan 10 gün sonra hayvanların kanları alınarak serumları çalışmada hiperimmün serum olarak kullanılmıştır (26).

Aşılama: Özel bir yetiştirmeden 1 günlükken temin edilen deneme hayvanları 3 haftalık olduklarında kanları IB virusuna karşı anti-

kor yönünden kontrol edilmiştir. Deneme grubunda bulunan 100 adet piliç 10 haftalıkken canlı, liyofilize IB H120 (Intervet, IB vaccine nobilis) aşısı, 23 haftalıkken canlı, liyofilize IB H52 (Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü-Manisa) aşısıyla burun göze damlatma yöntemiyle aşılanmıştır.

Virusun Üretilmesi: IB virusunun M 41 suşu PBS içinde 10^{-2} sulandırılıp SPF 10 günlük embriyolu tavuk yumurtalarının korioallantoik boşluğuna inokülasyonu takiben 37.C'de 48 saat inkübe edilmiştir (24 saat içinde meydana gelen ölümler değerlendirmeye alınmadı). Bu süre sonunda yumurtaları korioallantoik sıvıları aseptik koşullarda toplanıp (27) -20°C 'de dondurularak saklanmış ve çalışmada stok olarak kullanılmıştır.

Embriyo İnfektif Doz 50 (EID_{50})'nin Hesaplanması: EID_{50} 'nin hesaplanması Reed ve Muench'in (40) mtoduna göre yapılmıştır.

Eprüvasyon: H52 ile yapılan son aşılardan 2 ay sonra aşıli grupta olanlar HI titrelerine göre gruplandırıldıktan sonra tüm hayvanlar IBV M41 suşu ($3.16 \times 10^4 EID_{50} / 0.1 \text{ ml}$) ile intratracheal yolla infekte edilerek klinik gözlem altında tutulmuşlardır.

Agar jel Presipitasyon (AGP) Test Antijeni: AGP testinde, IB canlı liyofilize aşısı (H52, H120) 5 ml steril distile su ile sulandırılıp antijen olarak kullanılmıştır. Hazırlanan bu antijen kullanılmadan önce negatif serum, pozitif serum, FTS, distile su ve PBS ile nonspesifik bir reaksiyon yönünden kontrol edilmiştir.

Hemaglutinasyon (HA) ve Hemaglutinasyon İnhibisyon (HI) Test Antijeni: HA ve HI testlerinde kullanılan antijen Perrotta ve ark.'nin (29) yöntemine göre hazırlanmıştır.

Hemaglutinasyon (HA) Testi: HA testi mikrolate'lerde yapılmıştır. Antijen PBS içinde 2 katlı (0.025 ml antijen - 0.025 ml PBS) sulandırılıp üzerine 0.025 ml PBS ve 0.025 ml %2'lik tavuk eritrositlerinden konularak 4.C'de 30-45 dakika bekletildikten sonra sonuçlar değerlendirilmiştir. Dantela tarzında çöküntünün oluştuğu gözde reaksiyon pozitif olarak değerlendirilmiş ve pozitif reaksiyon görülen en son sulandırma 1 HA ünitesi olarak kabul edilmiştir (4).

Hemaglutinasyon İnhibisyon (HI) Testi: Test mikrolate'lerde yapılmıştır. Plate'nin tüm gözlerine 0.025 ml PBS konulduktan sonra yukarıdan aşağıya 1.gözlere test edilecek serum örneklerinden 0.025 ml konulup soldan sağa 2 katlı (1 / 2'den 1 / 1024'e kadar) sulandırıl-

mıştır. Daha sonra tüm gözlere 4HA ünitesinde sabit tutulan IBV HA antijeninden 0.025 ml konulup 4.C'de 15 dakika bekletilmiş ve bunu takiben tüm gözlere 0.025 ml % 2'lik tavuk eritrositlerinden ilave edilerek 4.C'de 30-45 dakika bekletilip sonuçlar değerlendirilmiştir. Her plate'de negatif serum, pozitif serum ve kan kontrolü da yapılmıştır. Dügme tarzındaki çöküntünün görüldüğü gözlerde reaksiyon pozitif, pozitifliğin görüldüğü en son sulandırma ise HI titresi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar 4 HA ünitesine göre hesaplanmıştır (4).

Agar Jel Presipitasyon (AGP) Testi: Bu test Lohr'un (28) bildirdiği yöntemine göre 9 cm çapındaki plastik petri kutularında yapılmıştır.

Bulgular

Hiperimmün Serum: Horozlarda hazırlanan ve AGP, HI testlerinde kontrol amacıyla kullanılan hiperimmün serumun titresi HI testi ile \log_2^{-11} (1 / 2048) olarak saptanmıştır.

Embriyo İnfektif Doz (EID₅₀)'nin Saptanması: Embriyolu tavuk yumurtalarının koriallantoik sıvısında üretilen IB virusunun EID₅₀'si Reed ve Muench'in (40) metoduna göre $3.16 \times 10^4 / 0.1$ ml olarak hesaplanmıştır.

Hemaglutinasyon (HA) Antijeni: HA antijeninin titresi 1 / 512 olarak belirlenmiştir. Ancak her HI testinde titre tayini yapılarak kullanılmıştır.

Hemaglutinasyon İnhibisyon (HI) Test Sonuçları: Deneme hayvanlarından aşılama öncesi (3.hafta) ve aşılama sonrası belirli aralıklarla kan alınarak serumları HI ve AGP testleriyle incelenmiştir. Aşılama öncesi 3.haftada tüm hayvanlardan alınan kan örneklerinin ortalama HI titresi \log_2 4.91 olarak belirlenmiştir (Tablo 1).

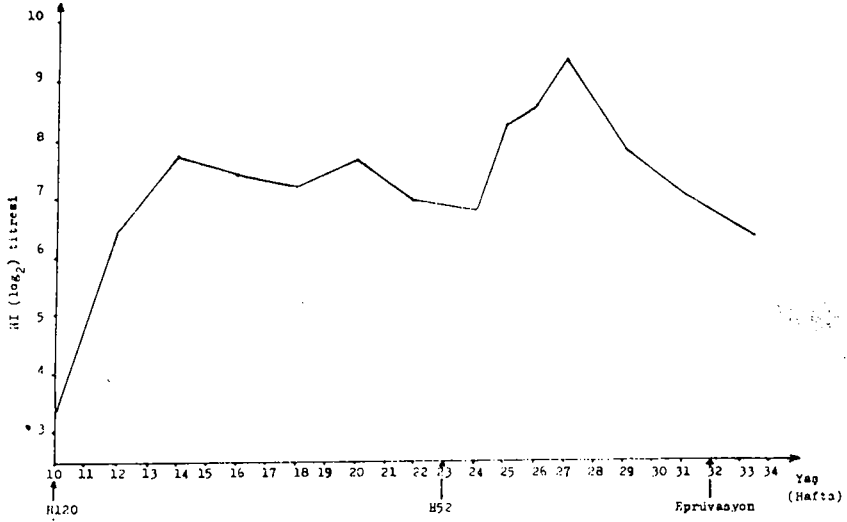
Hayvanların aşılama öncesi ortalama HI titreleri tespit edildikten sonra ilk aşılama 10. haftada H120, ikinci aşılama ise 23.haftada H52 aşılı ile gerçekleştirilmiştir.

Aşılı Grup: Birinci aşılama sonrası 15 gün sonra test edilen 85 serumun HI titre dağılımı \log_2 3-9 arasında değiştiği, ortalama titre nin \log_2 6.44 olduğu, antikor düzeyinin pik noktaya 4.haftada çıktığı ve pik antikor titresinin \log_2 7.76 olduğu belirlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Aşılı ve kontrol grubunda bulunan hayvanların HI ve AGP test sonuçları.

Ortalama Titreler	Yaş (Hafta)	3	10	12	14	16	18	20	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
			H120							H52									Epi.			
Asılı Grup	HI (log ₂) titresi	4.91		5.44	7.76	7.48	7.28	7.69	6.98		6.80	8.27	8.57	9.32		7.80		7.04				6.29
	İncelenen serum sayısı	125		85	84	58	67	81	60		81	47	50	37		35		87				74
	AGP % Pozitiflik oranı	0		6.25	6.41	4.76	5.17	3.75	6.89		18.98	8.51		5.71		12.5		29.88				8.69
	Pozitif serum	0		4	5	2	3	3	4		15	4		2		4		26				6
	İncelenen serum	100		64	78	42	58	80	58		79	47		35		32		87				69
Kontrol Grubu	HI (log ₂) titresi																	3.80				9.45
	İncelenen serum sayısı																	20				20
	AGP % pozitiflik oranı	0																0				70
	Pozitif serum	0																0				14
	İncelenen serum	25																20				20

23. haftadaki 2.aşlamayı takiben antikor titresi yükselerek pik noktaya 4.haftada çıkmış, ortalama \log_2 9.32 olarak belirlenmiştir (Tablo 1). Bundan sonraki haftalarda ortalama HI titresi düşmeye başlamış ve epruvasyondan önceki haftada \log_2 7.04 olarak saptanmıştır (Tablo 1, Grafik 1).



Grafik 1. Birinci ve ikinci aşlamadan sonra ortalama HI titresi.

Kontrol Grubu: Bu grupta 31.haftada alınan kanserumlarındaki ortalama HI titresi \log_2 3.60 olarak saptanmıştır (Tablo 1).

Agar Jel Presipitasyon (AGP) Test Sonuçları

Aşılı Grup: Denemeye alınan 125 adet hayvanın 3. haftada kanları alınarak serumları ayrılmış ve bu serumlar AGP testi ile incelenmiş ve tüm hayvanların serumları negatif bulunmuştur (Tablo 1). Birinci, ikinci aşlamayı takiben ve epruvasyondan sonraki AGP test sonuçları Tablo 1 ve Grafik 2'de gösterilmiştir. Tablo 1'de görüldüğü gibi AGP pozitif hayvan yüzdesi 1. aşlamadan sonra düşük 2. aşlamadan sonra ise yükselmiş fakat dalgalanma göstermiştir.

Kontrol Grubu: Bu grupta 31. haftada hayvanlardan alınan 20 adet kan serumunun tümü AGP testi ile negatif sonuç vermiştir (Tablo 1).

Otuzikinci haftada EID_{50} titresi $3.16 \times 10^4 / 0.1$ ml olan IBV M41 suşu kontrol grubu dahil tüm hayvanlara intratracheal yolla 0.1 ml miktarında verilerek infekte edilmiş ve hayvanlar 10 gün süreyle gözlem altında tutulmuşlardır. Kontrol grubundaki tüm hayvanlar 3.günden itibaren hırıltılı solunum, öksürük ve aksırık ile karakterize solunum belirtileri göstermeye başlamıştır. Bu semptomlar gözlem periyodunun sonuna doğru azalmış ve 10.günde sadece 3-4 hayvanda klinik semptomlar gözlenebilmiştir.

Eprüvasyon öncesi aşılı grupta bulunan hayvanlar patojen suş ile infekte edildiklerinde, 87 hayvandan 2 log HI 4'e sahip 2, 2 log HI 5'e sahip 7 hayvanın 3. günden itibaren orta şiddette hırıltılı solunum, öksürük, aksırık ile karakterize solunum semptomları göstermeleri infeksiyon yönünden pozitif kabul edilmiştir. (Tablo 4).

Tablo 4. Değişik HI titrelerine göre gruplandırılan hayvanların eprüvasyon sonu infeksiyon yönünden pozitiflik dağılımı.

Hayv. sayısı	2 log HI Titrelemi										Ortalama titre
	Neg.	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10	-11	
9	-	-	2	7	-	-	-	-	-	-	

Onuncu ve yirmüçüncü haftalarda IB'e karşı aşılana ve aşısız kontrol hayvanlar 32.haftada patojen IB virusu ile eprüve edilmişler ve eprüvasyondan 10 gün sonra bu hayvanların serumları alınarak HI titreleri belirlenmiştir (Tablo 5 ve Tbalo 6).

Tablo 5. Eprüvasyondan 10 gün sonra aşılı gruptaki hayvanlara ait serumların HI titrelerine göre dağılımı.

Serum sayısı	2 log HI Titrelemi										Ortalama titre
	Neg.	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10	-11	
72	3	-	2	9	23	21	11	3	-	-	6.29

Tablo 6. Eprüvasyondan 10 gün sonra kontrol grubundaki hayvanlara ait serumların HI titrelerine göre dağılımı.

Serum sayısı	2 log HI Titrelemi										Ortalama titre
	Neg.	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10	-11	
20	-	-	-	-	1	-	2	5	10	2	9.45

Aşılı grupta bulunan ve eprüvasyona alınan 87 hayvandan 79'una ait serum örnekleri 32.haftada yapılan eprüvasyondan 10 gün sonra AGP testiyle incelenmişler ve bu test sonucu 69 serumdan 6'sı (% 8.69) bu testle pozitif sonuç vermiştir (Tablo 1, Garafik 2).

Kontrol grubunda bulunan ve eprüvasyona alınan 20 hayvana ait serum örnekleri 32. haftada yapılan eprüvasyondan 10 gün sonra AGP testiyle incelenmişler ve bu test sonucu 20 serumdan 14'ü (% 70) testte pozitif sonuç vermiştir (Tablo 1).

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada 10. haftada H120 ve 23. haftada H52 ile aşılannmış tavuklarda oluşan bağışıklık HI ve AGP testleriyle saptanmış, aşıllı gruptaki hayvanlar HI titrelere göre gruplandırıldıktan sonra kontrol grubundakilerle birlikte ikinci aşılardan 2 ay sonra IBV M41 suşuyla intratracheal yolla infekte edilmiş ve bu hayvanlara ait serumların HI titreleri ile oluşturulan infeksiyon arasındaki ilişki incelenmiştir.

Witter (45), 4-5 haftalık 500 adet beyaz leghornu deneysel olarak IB virusunun bir saha suşuyla (M41 suşu) intratracheal yolla infekte etmiş ve bu hayvanlarda oluşan immun yanıtı göstermek için AGP ve VN testlerini kullanmıştır. Araştırmacı, presipitinlerin 8. günde saptanıp 94. güne kadar kalıcı bulunduğunu, inokülasyon sonrası 10-17. günler arasında hayvanların %80'den fazlasının pozitif yanıt verdiğini, fakat presipitinlerin bazı hayvanlarda geçici ve değişken olduğunu bildirmiştir. Gazdzinski ve ark. (19), presipitinlerin tanımlanabildiği zaman saptamak ve hayvanlardaki klinik belirtileri gözlemek amacıyla 11 haftalık 20 adet pilici IBV H52 suşuyla intratracheal olarak infekte etmişler, hayvanların % 80'inde presipitinleri 8. günde, % 100'ünde ise 10-15. günlerde belirlemişlerdir. Araştırmacılar inokülasyondan 48 saat sonra hayvanların % 90'nının öksürük, aksırık ve tracheal sesler ile karakterize klinik semptomlar gösterdiğini ve semptomların 16. güne kadar devam ettiğini, Macdonald ve ark. (29) 11 haftalık ve infeksiyöz bronşite'e karşı antikor taşımayan 10 adet Brown leghorn ırkı pilici IBV H52 suşuyla intratracheal olarak infekte ettiklerinde 48 saat sonra tüm hayvanların değişik derecelerde olmak üzere öksürük, aksırık ve tracheal sesler gibi klinik semptomlar gösterdiğini ve bu semptomların 8.güne kadar gözlenebildiğini, presipitinlerin de 13.günde tüm hayvanlarda tespit edilebilirliğini bildirmişlerdir. Macdonald ve ark. (30) 15 haftalık 10 adet pilici IBV H52 suşuyla intravenöz yolla infekte etmişler ve presipitinleri inokülasyondan 10 gün sonra tüm hayvanlarda belirlediklerini açıklamışlardır. Aynı araştırmacılar, infeksiyondan 10 gün sonra HI titrelerinin \log_2 10-12 arasında olduğunu, Box ve ark. (7) ise 31 haftalık 10 adet SPF yumurtacının

IBV virusunun virüent Massachusetts suşuyla aerosol yolla infeksiyonundan sonra ortalama HI titrelerinin 37. haftada \log_2 10.1 olarak saptanmıştır.

Bu çalışmada, kontrol grubunda bulunan 20 adet hayvan 32 haftalık olduğunda IBV M41 suşuyla intratracheal olarak eprüve edildikten sonra 10 gün klinik gözlem altında tutulmuştur. İnfeksiyondan 10 gün sonra alınan kan örnekleri AGP testiyle incelendiğinde AGP pozitif hayvan sayısı 14 (%70) olarak tespit edilmiş, deneme infeksiyonunu takiben 3.günde başlayan ve gözlem periyodu olan 10.güne kadar devam eden hastalığa özgü klinik belirtiler gözlenmiştir. Ayrıca yine infeksiyondan 10 gün sonra alınan kan örnekleri HI testi ile incelendiğinde, ortalama HI titresinin \log_2 9.25 olduğu saptanmıştır. Elde edilen bulgular yukarıdaki araştırmacıların sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Çeşitli araştırmacılar (19,29,31,45) değişik yollarla aşılınmış hayvanlarda oluşan presipitinlerin virüent IB virusundan ileri gelen infeksiyon sonrası oluşan presipitinlerle benzer olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmada kontrol grubunda bulunan hayvanların intratracheal eprüvasyonlarından sonra AGP pozitif hayvan sayısının %70 olmasına karşın deneme grubundaki hayvanların AGP testinde 1.aşılama- dan sonra % 6.89'u, 2.aşılama- dan sonra ise % 29.88'i pozitif olarak belirlenmiştir. Aşılı gruptaki değerlerin çok düşük olması, aşılama- da burun-göz damlatma yönteminin kullanılmasına bağlı olabilir.

Monreal ve ark. (35) sahada 3. hafta H120, 10. ve 18. haftalarda H52 ile içme suyuyla aşılınmış proiler damızlıklarda aşılama sonrası oluşan bağışıklığı ELISA, HI ve AGP testleriyle ölçmüşlerdir. Araştırmacılar H120 ile yapılan 1.aşılama- dan sonra HI ve AGP testleriyle bağışıklığın ölçülemediğini, buna karşın H52 ile yapılan 2.aşılama- yı takiben HI ve AGP testleriyle antikorların saptandığını bildirmişlerdir. Macdonald ve ark. (30) sahada 3.hafta H120, 8.hafta HL ve 17. hafta H52 ile aşılınmış broiler damızlıklardaki HI ve AGP yanıtını incelemişler ve HI testiyle immun yanıtın tam olarak saptanabilmesine karşın AGP testiyle saptanan antikorların geçici, değişken olduğunu ve iki test arasında zayıf bir ilişki bulunduğunu açıklamışlardır.

Bu çalışmada, aşılı grupta gerek birinci ve gerekse ikinci aşılama- dan sonra meydana gelen bağışıklık HI testiyle başarılı bir şekilde gösterilebilmesine karşın, AGP testi ile saptanan pozitif hayvan sayısının çok düşük olduğu ve iki test arasında zayıf bir ilişki bulunduğu

gözlenmiştir. Alınan bu sonuçlar, araştırmacıların bulgularına uygunluk göstermekte, ayrıca aşılama sonrası HI ve AGP testleri kullanıldığında oluşan antikorların kısa sürede saptanmasında HI testinin daha duyarlı ve stabil olduğunu göstermektedir.

IB hastalığının korunmasında kullanılan aşuların ne derece bağışıklık verdiğinin belirlenmesi amacıyla çeşitli araştırmacılar tarafından aşılama sonrası yapılan eprüvasyonları takiben klinik semptomlar, histopatolojik bulgular ve hayvanlardan virus izolasyonu kriter olarak alınmıştır (15,22,23,33).

Macphenson ve Feest (33), yaptıkları saha taramasında canlı attenüe aşıyla aşılanmış broiler ve broiler damızlıklarda, hastalığın klinik belirtileri ile HI titresini arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Araştırmacılar, broilerlerde \log_2 4-5. yumurtacılar ise \log_2 5-6 arası HI titresinin enfeksiyona karşı koruyucu olduğunu bildirmişlerdir. Gough ve Alexander (22) ve Gough ve Alexander (23) canlı attenüe IB aşısıyla aşılanmış hayvanlarda patojen IB virusuyla eprüvasyonu takiben HI titresini \log_2 6 ve yukarısında olan hayvanların enfeksiyona direnç göstermelerine karşın bu titrenin altında olan hayvanların direnç göstermediğini bildirmişlerdir. Benzer bulgu Darbyshire ve Peters (15) tarafından da saptanmıştır.

Bu çalışmada, H52 ile yapılan 2. aşılardan 2 ay sonra (32. hafta) hayvanlar HI titrelerine göre gruplandırılıp patojen IB virusuyla (M41 suşu) intratracheal olarak eprüve edilmişlerdir. Çalışmada enfeksiyona karşı korunma, klinik belirtiler esas alınarak değerlendirilmiştir. Eprüvasyon öncesi \log_2 4'de bulunan 2 hayvanın 2'si, \log_2 5'de bulunan 7 hayvanın 7'si eprüvasyondan sonra klinik belirti gösterirken \log_2 6 ve yukarısında bulunan hayvanların hiçbir klinik belirti göstermemiştir. Aynı şekilde 32. haftada intratracheal yolla eprüve edilen kontrol grubundaki ortalama HI titresini \log_2 3.60 olan 20 hayvanın % 100'ünde enfeksiyöz bronşitis'e ilgili klinik belirtiler gözlenmiştir. Alınan bu sonuçlara göre \log_2 6 ve üzerindeki titrede bulunan hayvanlarda hiçbir klinik belirti görülmemesi bu konuda yapılan araştırmalarla paralellik sağlamakta ve bu titrenin IB enfeksiyonuna karşı koruyucu HI titresini eşiti olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmanın sonucunda hayvanların bağışıklık durumlarının belirlenmesinde kullanılan AGP testinde en iyi sonuç canlı liyofilize IB aşısı antijen olarak kullanıldığında alınmıştır. AGP testi ile HI testi karşılaştırıldığında; HI test sonuçlarının immun yanıtın tam ve kısa sürede saptanabilmesinde daha duyarlı ve stabil olduğu anlaşıl-

mış ve iki test arasında bir korelasyon bulunmadığı ortaya çıkmıştır. Ayrıca HI titresine göre gruplandırılan hayvanların; epvürasyon sonrası \log_2 6 ve üzerinde olan hayvanların hastalığa ilgili klinik belirtiler göstermemesi HI \log_2 6.0 titresinin korunma için yeterli olduğunu göstermiştir.

Kaynaklar

1. Alexander, D.J. and Chettle, N.J. (1977). *Procedures for the haemagglutination and haemagglutination inhibition tests for avian infectious bronchitis virus*. Avian Pathol., 6: 9-17.
2. Alexander, D.J., Bracewell, C.D. and Gough, R.E. (1976). *Preliminary evaluation of the haemagglutination and haemagglutination inhibition tests for avian infectious bronchitis virus*. Avian Pathol., 5: 125-134.
3. Alexander, D.J., Gough, R.E. and Pattison, M. (1978). *A long-term study of the pathogenesis of infection of fowls with three strains of avian infectious bronchitis virus*. Res. Vet. Sci., 24: 228-233.
4. Anonim. (1987). *Preparation of haemagglutinating infectious bronchitis virus antigen*. 2-3.
5. Bingham, R.W., Madge, M.H. and Tyrell, D.A.J. (1975). *Haemagglutination by avian infectious bronchitis virus-a coronavirus*. J. Gen. Virol., 28: 381-390.
6. Biswall, N., Nazerian, K. and Cunningham, C.H. (1966). *A haemagglutinating fraction of infectious bronchitis virus*. Am. J. Vet. Res., 27: 1157-1167.
7. Box, P.G., Beresford, A.V. and Roberts, B. (1980). *Protection of laying hens against infectious bronchitis with inactivated emulsion vaccines*. Vet. Rec., 106: 264-268.
8. Box, P.G., Holmes, H.C., Finnerly, P.M. and Froyman, R. (1988). *Infectious bronchitis in laying hens: the relationship between haemagglutination inhibition antibody levels and resistance to experimental challenge*. Avian Pathol., 17: 349-361.
9. Brown, A.J. and Bracewell, C.D. (1985). *Application of the haemagglutination inhibition test to typing of infectious bronchitis virus*. Vet. Rec., 116: 47-48.
10. Case, J.T., Ardans, A.A., Bolton, D.C. and Reynolds, B.J. (1983). *Optimization of parameters for detecting antibodies against infectious bronchitis virus using an enzyme linked immunosorbent assay: temporal response to vaccination and challenge with live virus*. Avian Dis., 27: 196-210.
11. Chubb, R.C. and Cumming, R.B. (1971). *The use of the gel diffusion precipitin technique with avian infectious bronchitis nephritis virus*. Aust. Vet. J., 4 : 496-499.
12. Cook, J.K.A. (1984). *The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983*. Avian Pathol., 13: 733-741.
13. Cook, J.K.A., Brown, A.J. and Bracewell, C.D. (1987). *Comparison of the haemagglutination test and the serum neutralization test in tracheal organ cultures for typing infectious bronchitis virus strains*. Avian Pathol., 16: 505-511.

14. Corbo, L.J. and Cunningham, C.H. (1959). *Haemagglutination by tyrpsin-modified infectious bronchitis virus*. Am. J. Vet. Res., 20: 876-883.
15. Darbyshire, J.H. and Peters, R.W. (1985). *Humoral antibody response and assessment of protection following primary vaccination of chicken with maternally derived antibody against avian infectious bronchitis virus*. Res. Vet. Sci., 38: 14-21.
16. Demirözü, K., Altinel, C. ve Alp, A. (1989). *Marmara bölgesinde IB infeksiyonunun HI testi ile saptanması ve bu etkenin serotiplerinin belirlenmesi*. Pendik Hayvan Hast. Merk. Araşt. Enst. Derg., 20: 65-77.
17. Doi, M., Takamaki, T., Koimaru, H., Yoshimura, M. Masu, S., Shirai, J. and Kawamura, H. (1982). *Serotypes of avian infectious bronchitis virus isolates from field cases in Japan*. Avian Dis., 26: 946-956.
18. Findon, G. (1987). *Some field observations on the antibody response to avian infectious bronchitis on Auckland layer farms*. N.Z. Vet. J., 35: 211-214.
19. Gazdzinski, P., Macdonald, J.W. and Macmartin, D.A. (1977). *The agar gel precipitin response of the H120 and H52 vaccines of infectious bronchitis virus*. Avian Pathol., 6: 143-148.
20. Gelb, J.Jr. and Killian, S.L. (1987). *Serum antibody responses of chickens following sequential inoculations with different infectious bronchitis virus serotypes*. Avian Dis., 31: 513-522.
21. Gelb, J.Jr., Perkins, B.E., Rosenberger, J.K. and Allen, P.H. (1981). *Serologic and cross-protection studies with several infectious bronchitis virus isolates from Delmarva-reared broiler chickens*. Avian Dis., 25: 655-666.
22. Gough, R.E. and Alexander, D.J. (1978). *Comparison of serological tests for the measurement of the primary immun response to avian infectious bronchitis virus vaccine*. Vet. Microbiol., 2: 289-301.
23. Gough, R.E. and Alexander, D.J. (1979). *Comparison of immunity in chickens infected with a live infectious bronchitis vaccine by three different routs*. Res. Vet. Sci., 26: 329-332.
24. Hofstad, M.S. (1984). *Avian infectious bronchitis*. In: *Hofstad, M.S. et al. Diseases of poultry*. 8th ed., Iowa State Univ., Press, Ames, Iowa. pp. 429-443.
25. King, D.J. (1988). *Identification of recent infectious bronchitis virus isolates that are serologically different from current vaccine strains*. Avian Dis., 32: 362-364.
26. King, D.J. and Hopkins, S.R. (1983). *Evaluation of haemagglutination inhibition test for measuring the response of chickens to avian infectious bronchitis virus vaccination*. Avian Dis., 27: 100-112.
27. Lashgari, M.S. and Newman, J.A. (1982). *Preparing haemagglutinating antigen from isolates of infectious bronchitis virus*. Avian Dis., 26: 508-519.
28. Lohr, J.E. (1980). *Infectious bronchitis agar gel precipitin test-Use of infected allantoic fluid as antigen*. Avian Dis., 24: 463-467.
29. Macdonald, J.W., Randall, D.A., Mcmartin, D.A. and Dagless, M.D. (1981). *Immunity following vaccination with the H120 strain of infectious bronchitis virus via the drinking water*. Avian Pathol., 10: 295-301.

30. Macdonald, J.W., Randall, C.J., Macmartin, D.A. and Dagless, M.D. (1933). *Immunity following inoculation of the H120 and H52 vaccine strains of infectious bronchitis virus into the crop of domestic fowl*. Avian Pathol., 12: 379-388.
31. Macdonald, J.W., Dagless, M.D., Mcmartin, D.A., Randall, C.J., Pattison, M., Early, J.L. and Aubrey, S. (1982). *Field observations on serological responses to vaccine strains of infectious bronchitis virus administered by coarse spray and via drinking water*. Avian Pathol., 11: 537-546.
32. Maiti, N.K., Sharma, S.N. and Sambyal, D.S. (1985). *Precipitating antibodies against infectious bronchitis and fowl adenoviruses in laying birds with egg drop problem*. J. Res. Punjab Agric. Univ., 22: 391-393.
33. Mopherson, I. and Feest, A. (1978). *Some observations on the value of the infectious bronchitis haemagglutination inhibition test in the field*. Avian Pathol., 7: 337-348.
34. Manulemans, G., Carlier, M.C., Gonze, M., Petit, P. and Vandebroek, M. (1987). *Incidence, characterization and prophylaxis of nephropathogenic avian infectious bronchitis viruses*. Vet. Rec., 120: 205-206.
35. Monreal, G., Bauer, H.J. and Wiegman, J. (1985). *Comparison of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), haemagglutination inhibition test and agar gel precipitation test for detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus*. Avian Pathol., 14: 421-434.
36. Muneer, M.A., Newman, J.A., Goyal, S.M. and Ajmal, M. (1987). *Detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus*. Pakistan J. Biochem., 20: 11-15.
37. Muneer, M.A., Halvarson, D.A., Sivanandan, V., Newman, J.A. and Coon, C.N. (1986). *Effects of infectious bronchitis virus (Arkansas strain) on laying chickens*. Avian Dis., 30: 644-647.
38. Muneer, M.A., Newman, J.A., Halvarson, D.A., Sivanandan, V., Nagaraja, K.V. and Coon, C.N. (1988). *Efficacy of infectious bronchitis virus vaccines against heterolog challenge*. Res. Vet. Sci., 45: 22-27.
39. Perrotta, C., Purtek, C., Wilson, R.A., Cowen, B.S. and Eckroade, R.A. (1988). *A standardized enzyme linked immunosorbent assay for infectious bronchitis virus: comparison with haemagglutination inhibition and virus neutralization assays for measuring protective antibody levels in chickens*. Avian Dis., 32: 451-460.
40. Reed, L.J. and Muench, H. (1938). *Am. J. Hyg.*, 27: 493-497. In: Arda, M.: *Hastalık etkenlerinin titrasyon ve nötralizasyon içtlerinde uygulanan laboratuvar metodları*. A.Ü. Veteriner Fakültesi yayınları, 273, 1971.
41. Sayım, Y., Akman, A. ve Girgin, H. (1988): *Ankara bölgesi kümes hayvanlarında IB, ILT, IBD, EDS'76, AE ve adenovirus enfeksiyonlarının epizootiyolojik araştırılması ve izolasyon çalışmaları*. Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg., 6: 83-94.
42. Sevoian, M. and Levine, P.P. (1957). *Effects of infectious bronchitis on the reproductive tracts, egg production and egg quality of laying chickens*. Avian Dis., 1: 136-164.
43. Shalk, A.F. and Hawn, M.C. (1931). *JAVMA*. 78: 413-422. In: Woernle, H.: *Historical survey. Proc. I. Int. Symp. Infectious Bronchitis, Rauischholzhausen, West Germany, 23-26 June 1988*, pp. 11-21.

44. **Tacconi, G., Asdrubali, G., Colleti, M., Franciosini, M.P. and Sirugo, G.** (1987). *Detection of antibodies against infectious bronchitis virus by enzyme linked immunosorbent assay in the serum fowls from non-vaccinated flocks.* Riv. Avicolt., 56: 67-71.
45. **Witter, R.L.** (1962). *The diagnosis of infectious bronchitis of chickens by the agar gel precipitin test.* Avian Dis., 6: 478-492.
46. **Woernle, H.** (1966). *The use of the agar gel diffusion technique in the identification of certain avian virus diseases.* The Veterinarian. 4: 17-28.
47. **Woernle, H.** (1988). *Historical survey, Proc. I. Int. Symp. Infectious bronchitis. Rauschholzhausen, West Germany, 23-26 June, pp. 11-21.*