

Broyler damızlık ve ticari broyler sürülerinde tavuk anemi virüsünün ve antikor varlığının araştırılması*

Şinasi AŞKAR¹, Murat YILDIRIM¹

¹ Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye.

Özet: Bu çalışmada, tavuk anemi hastalığına (chicken infectious anemia-CIA) karşı aşı ve aşısız broyler damızlık sürülerinde tavuk anemi virüs (chicken anemia virus-CAV) antikor varlığını ve bu damızlıkların ticari broyler sürülerinde CAV maternal antikor seyrini, antikor ve VP1 ile VP2 gen varlığını araştırmak amaçlandı. Çalışmada enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ile polimerase chain reaction (PCR) testleri kullanıldı. Haziran 2008- Şubat 2009 tarihleri arasında CIA hastalığına karşı 6'sı aşı, 6'sı aşısız broyler damızlık sürülerinden toplam 218 kan serumu ve bu damızlıkların 32 ticari broyler sürüsünden belirli aralıklarla toplam 2074 kan serumu ve 1916 doku örneği elde edildi. Aşı ve aşısız damızlıklar seropozitif saptanırken, ortalama antikor titreri karşılaştırıldığında istatistikî olarak önemli bir fark olmadığı belirlendi. Aşı ve aşısız damızlıkların günlük ve 1 haftalık ticari broyler sürülerinde maternal antikor oranının % 98 - 100, 2 haftalıkken % 5 – 60, 3 haftalıkken % 0 - 15 arasında olduğu belirlendi. Aşı damızlıkların 4 haftalık 8 ticari broyler sürüsünün % 62.5'inde, 5 haftalık 16 ticari broyler sürüsünün % 93.8'inde CAV antikor varlığı belirlendi. Aşı damızlıkların 3 haftalık 8 ticari broyler sürüsünün % 25'inde, 4 haftalık 8 ticari broyler sürüsünün % 37.5'inde, 5 haftalık 16 ticari broyler sürüsünün % 37.5'inde VP1 ve VP2 gen varlığı belirlendi. Aşısız broyler damızlıkların ticari broyler sürülerinde ise CAV antikor ve VP1 ile VP2 gen varlığı tespit edilmedi.

Anahtar sözcükler: Antikor, broyler, PCR, tavuk anemi virüs

The investigation of chicken anemia virus and its antibody existence in commercial broiler and broiler breeder flocks

Summary: The goals of this study were to investigate the antibody existence of chicken anemia virus (CAV) in vaccinated and non-vaccinated broiler breeder flocks and to monitor the course of CAV maternal antibody, to investigate the existence of anti-CAV antibody, CAV VP1 and VP2 genes in commercial broiler flocks which were the progenies of broiler breeder flocks. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR) were used in the study. Between June 2008 and February 2009, 218 blood serum samples were obtained from 6 vaccinated and 6 non-vaccinated broiler breeder flocks with different ages. A total of 2074 serum and 1916 tissues samples were also obtained from 32 commercial broiler flocks. The vaccinated and non-vaccinated broiler breeder flocks were CAV seropositive and mean antibody titers of vaccinated and non-vaccinated broiler breeder flocks were not statistically different. In commercial broiler flocks, the rates of maternal antibodies were detected between 98 – 100 % , 5 – 60 % , and 0 – 15 % in flocks with a day and a week old, with two weeks old, and with three weeks old, respectively. The anti-CAV antibody existence were detected at the rate of 62.5 and 93.8 % in 8 commercial broiler flocks with four weeks old and 16 commercial broiler flocks with five weeks old of vaccinated broiler breeder flocks, respectively. CAV VP1 and VP2 genes were detected in 25 % of three weeks old, 37.5 % four weeks old flocks of 8 commercial broilers and in 37.5 % of five weeks old flocks of 16 commercial broilers of vaccinated broiler breeder flocks. However, no CAV antibody, CAV VP1 and VP2 genes were detected in 8 commercial broiler flocks of non-vaccinated broiler breeder flocks.

Key words: Antibody, broiler, chicken anemia virus, PCR

Giriş

Tavuk anemi hastalığı (chicken infectious anemia-CIA), tavuk anemi virüsünün (chicken anemia virus-CAV) neden olduğu immüno-supresif viral bir hastalıktır. Hastalık aşı bağışıklığını olumsuz etkilemesi, subklinik seyretmesi, virüsün vertikal ve horizontal yolla bulaşması, dezenfeksiyona dirençli olması ve 6 haftalıktan önce

uygulanacak ticari aşının olmaması nedeniyle önemlidir (21). Tavuk anemi virüs *Circoviridae* familyasının *Gyrovirus* genusunda yer alan, tek iplikli DNA genomuna sahip, zarfsız bir virüstür. Virüs VP1, VP2 ve VP3 olarak isimlendirilen 3 viral proteine (VP) sahiptir (5). Gen sekansı belirlenen izolatlardan CAA 82-2 hariç hepsi VP1, VP2 ve VP3 proteinleri için 3 parçalı üst üste

* Birinci yazarın doktora tezinden özetlenmiştir. Bu tez Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No: 2007/1) tarafından desteklenmiştir.

binmiş açık okuma alanı (Open Reading Frame-ORF) kod parçalarına sahiptir. ORF 1 (pozisyon 853-2200nt), VP1 (51.6kDa, 499AA) yapısal kapsid proteinini kodlar, ORF2 (pozisyon 380-1028 nt) kapsid oluşumu ile ilişkili olan VP2 (24kDa, 216AA) proteinini kodlar, ORF3 (pozisyon 486-849nt) yapısal olmayan VP3 (13.6kDa, 121 AA) proteinini kodlar (12, 15, 19). Noteborn ve ark. (14) apoptin olarak da isimlendirilen VP3 proteinin tavuk timositlerinde ve lenfoblastoid hücre hatlarında güçlü bir apoptozis uyarıcısı olduğunu saptamışlardır.

Tavuk sürülerinde CIA hastalığının araştırılmasında enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) ile polymerase chain reaction (PCR) testi sıklıkla kullanılmaktadır (21, 23). Önceki araştırmalarda PCR testi için farklı hedef gen dizileri seçilmişse de, genellikle CAV'nin Cuxhaven-1 izolatının ORF1 ve ORF3 gen dizileri primer seçim bölgesi olarak tercih edilmiştir. Fakat bu primerlerin tüm izolatların PCR ile teşhisinde yeterli olmayacağı bildirilmiştir (9, 13, 21).

Bu çalışmada, CIA hastalığına karşı aşı ve aşısız farklı yaşlardaki broyler damızlık sürülerinde CAV antikor varlığının, damızlık yaşının damızlıklardaki antikor titresi ve civcivlere aktarılan maternal antikor titresi üzerine etkisinin, ayrıca ticari broyler sürülerinde maternal antikor seyri ile antikor ve CAV DNA varlığının araştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metot

Örneklerin toplanması: Araştırma Haziran 2008 ve Şubat 2009 tarihleri arasında Marmara bölgesindeki CIA hastalığına karşı CAV 26P4 suşu ile aşı ve İç Anadolu bölgesindeki aşısız broyler damızlık sürüleri ve bu damızlıklardan elde edilen ticari broyler sürülerinde yapıldı. Marmara bölgesindeki aşı 6 broyler damızlık sürüden (27, 32, 35, 45, 47, 54 haftalık) 120 adet kan serumu elde edildi. Bu damızlıkların her birine ait 4 ticari broyler sürüden (toplam 24 sürü, sürü no: A1-A24) belirli aralıklarla (günlük, 1, 2, 3, 4 ve 5 haftalıkken) alınan örneklerle, 1432 adet kan serumu ve 1376 adet doku örneği (344 timus, 344 karaciğer, 344 dalak, 344 kemik iliği) elde edildi. İç Anadolu bölgesindeki aşısız 6 damızlık sürüden (31, 35, 38, 40, 42 ve 60 haftalık) 98 adet kan serumu elde edildi. 40 ve 60 haftalık damızlıkların her birine ait 4 ticari broyler sürüden (toplam 8 sürü, sürü no B1-B8) günlük, 2, 3 ve 5 haftalıkken alınan örneklerle, 642 adet kan serumu ve 540 adet doku (135 timus, 135 karaciğer, 135 dalak, 135 kemik iliği) elde edildi. Kan örnekleri her bir sürüden rastgele seçilen 20-23 hayvanın kanat altı venasından ve günlük civcivlerden kesim yöntemiyle alındı. Doku örnekleri (timus, karaciğer, dalak ve kemik iliği) ise her bir sürüden rastgele seçilen 3-6 hayvana nekropsi yapılarak alındı.

ELISA ile serum CAV antikorlarının belirlenmesi: Araştırmada Tavuk Anemi Virüs Antikor Test Kiti

(Idexx, USA) kullanıldı. Kit kullanım talimatına göre, damızlık serumları antikor titresini hesaplamak amacıyla 1/100 oranında, ticari broyler serumları maternal antikor ve antikor varlığını belirlemek amacıyla 1/10 oranında sulandırıldı. Hazırlanan pleytler ELISA okuyucusunda 650 nm'lik referans dalga boyunda okutuldu ve veriler X Check programı kullanılarak kaydedildi. Antikor titre düzeyinin değerlendirilmesinde ELISA kiti üretici firmanın kriterleri kullanıldı.

PCR ile viral DNA'nın belirlenmesi: Her bir ticari broyler sürüsünden alınan doku örnekleri steril koşullarda havanda homojenize edildi. Homojenattan 25mg alınarak QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Science, USA) kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapıldı. Pozitif kontrol olarak ticari aşı suşları (CAV 26P4- Netherlands ve Cux-1- Germany) kullanıldı. Elde edilen DNA ekstraktlarında CAV genlerinin belirlenmesi için sıklıkla kullanılan VP1 ve VP2 geni primer seçim bölgesi olarak tercih edildi. Bu amaçla 675 bp'lik ürün oluşturan VP1(F) 5'GAC TGT AAG ATG GCA AGA CGA GCT C 3', ve VP1 (R) 5'GGC TGA AGG ATC CCT CAT TC 3'(24) ile 387 bp'lik ürün oluşturan VP2 (F) 5'CAA GTA ATT TCA AAT GAA CG 3' ve VP2 (R) 5'TTG CCA TCT TAC AGT CTT AT 3' (4) primerleri (Biomers GmbH, Germany) kullanıldı. Bu genlerin çoğaltılması amacıyla, 2 µl DNA ekstraktları son konsantrasyonu 50 µl olacak şekilde PCR buffer (16 mM (NH₄)₂SO₄, 50 mM Tris HCl, 1.75 mM MgCl₂, % 0.1 Triton x-100) (Vivantis), 400 µM dNTPs, 10 pmol/µl primer, 1.25 TaqDNA polymerase içeren PCR karışımı ile karıştırıldı. Hazırlanan PCR karışımları, 94°C 3dk ilk denatürasyon, 35 siklus 94°C 1dk. denatürasyon, 59°C 1dk bağlanma, 72°C 2dk uzama ve 72°C 5dk son uzama olacak şekilde ayarlanmış termal cykler'a yerleştirilerek CAV DNA'sı çoğaltıldı (27). Çoğaltılan CAV DNA'sı elektroforez işleminden sonra UV görüntüleme sistemi ile incelenerek kaydedildi.

İstatistikî analizler: Veriler 'SPSS 13.0' paket programı kullanılarak, tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA), Chi-Square testi ve T testi ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar $X \pm S_x$ (ortalama \pm standart hata) olarak verildi.

Bulgular

Aşılı broyler damızlık sürülerinin ELISA bulguları: Marmara bölgesindeki aşı broyler damızlık sürülerinin tamamının seropozitif olduğu, bu damızlıklardan elde edilen toplam 120 serumun % 40'ının yüksek, % 59.2'sinin orta düzeyde antikor titresine sahip olduğu ve % 0.8'nin de CAV'a karşı antikor taşımadığı belirlendi. Farklı yaşlardaki aşı broyler damızlık sürülerinin antikor titre grupları tablo 1'de verilmiştir.

Farklı yaşlardaki damızlıkların ortalama antikor titrelerini karşılaştırdığımızda, en yüksek antikor titresine 27 haftalık damızlıkların, en düşük antikor titresine 54

Tablo 1. Farklı yaşlardaki aşılı broyler damızlık sürülerin antikor titre grupları
Table 1. Antibody titer groups of different ages vaccinated broiler breeders flocks

Yaş (hafta)	Serum (n)	0 grup* (Titre<1000)		1 grup** (1000-2460)		2 grup** (2461-5050)		3 grup** (5051-8660)		4 grup*** (Titre>8660)	
		(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
27	20	0	0.0	1	5.0	2	10.0	7	35.0	10	50.0
32	20	0	0.0	1	5.0	6	30.0	4	20.0	9	45.0
35	20	0	0.0	1	5.0	2	10.0	8	40.0	9	45.0
45	20	0	0.0	0	0.0	6	30.0	6	30.0	8	40.0
47	20	0	0.0	0	0.0	4	20.0	11	55.0	5	25.0
54	20	1	5.0	3	15.0	4	20.0	5	25.0	7	35.0
Toplam.	120	1	0.8	6	5.0	24	20.0	41	34.2	48	40.0

*Negatif **Orta düzeyde titre ***Yüksek düzeyde antikor titre

haftalık damızlıkların sahip olduğu belirlendi. Damızlık yaşı ile antikor titresi arasındaki ilişkiyi belirlemek için yapılan tek yönlü varyans analizi sonucunda, gruplar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmadı. Farklı yaşlardaki aşılı broyler damızlık sürülerinin ortalama antikor titreleri tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Farklı yaşlardaki aşılı broyler damızlık sürülerin ortalama antikor titreleri
Table 2. Protective mean antibody titers of different ages vaccinated broiler breeders flocks

Yaş (hafta)	Serum (n)	X	±	S _x
27	20	7164.75	±	482.02
32	20	6534.20	±	548.76
35	20	6999.20	±	468.05
45	20	6434.30	±	503.42
47	20	6519.75	±	460.95
54	20	6137.55	±	637.54
Toplam	120	6631.63	±	210.37

X: Ortalama S_x: Standart hata

Aşısız broyler damızlık sürülerinin ELISA bulguları: İç Anadolu bölgesinde CIA hastalığına karşı aşısız broyler damızlık sürülerin tamamının seropozitif olduğu, bu damızlıklardan elde edilen 98 serumun % 48.6’sının yüksek, % 51.4’nün orta düzeyde antikor

titresine sahip olduğu belirlendi. Farklı yaşlardaki aşısız broyler damızlık sürülerin antikor titre grupları tablo 3’de verilmiştir.

Farklı yaşlardaki broyler damızlık sürülerinin ortalama antikor titreleri karşılaştırıldığında 42 haftalık damızlıkların en yüksek antikor titresine sahip olduğu 60 haftalık damızlıkların ise en düşük antikor titresine sahip olduğu belirlendi. Fakat damızlık yaşı ile antikor titresi arasındaki ilişki incelendiğinde, gruplar arasında istatistik olarak önemli bir fark bulunmadı. Farklı yaşlardaki aşısız broyler damızlık sürülerin ortalama antikor titreleri tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Farklı yaşlardaki aşısız broyler damızlık sürülerin ortalama antikor titreleri
Table 4. Protective mean antibody titers of different ages non vaccinated broiler breeders flocks

Yaş (hafta)	Serum (n)	X	±	S _x
31	18	6966.11	±	508.91
35	17	6310.53	±	594.75
38	16	6735.94	±	593.41
40	16	6139.00	±	443.27
42	16	7346.06	±	508.22
60	15	5939.07	±	444.77
Toplam	98	6572.79	±	219.66

X:ortalama S_x: standart hata

Tablo 3. Farklı yaşlardaki aşısız broyler damızlık sürülerin antikor titre grupları
Table 3. Antibody titer groups of different ages non vaccinated broiler breeders flocks

Yaş (hafta)	Serum (n)	0 grup* (Titre<1000)		1 grup** (1000-2460)		2 grup** (2461-5050)		3 grup** (5051-8660)		4 grup*** (Titre>8660)	
		(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
31	18	0	0.0	0	0.0	5	27.8	3	16.7	10	55.5
35	17	0	0.0	1	5.9	5	29.4	3	17.6	8	47.0
38	16	0	0.0	0	0.0	5	31.3	2	12.5	9	56.3
40	16	0	0.0	1	6.3	3	18.7	3	18.7	9	56.3
42	16	0	0.0	0	0.0	3	18.7	4	25.0	9	56.3
60	15	0	0.0	0	0.0	7	46.7	5	33.3	3	20.0
Toplam	98	0	0.0	2	2.0	28	28.8	20	20.6	48	48.6

*Negatif **Orta düzeyde titre ***Yüksek düzeyde antikor titre

Aşılı ve aşısız broyler damızlıkların antikor titrelerinin karşılaştırılması: Aşılı ve aşısız damızlıkların ortalama antikor titreleri karşılaştırıldığında her iki grubun da orta düzeyde antikor titresine sahip olduğu ve yapılan T testine göre iki grup arasındaki farklılığın istatistikî olarak önemli olmadığı belirlendi. Aşılı ve aşısız broyler damızlıkların ortalama antikor titreleri tablo 5’de verilmiştir.

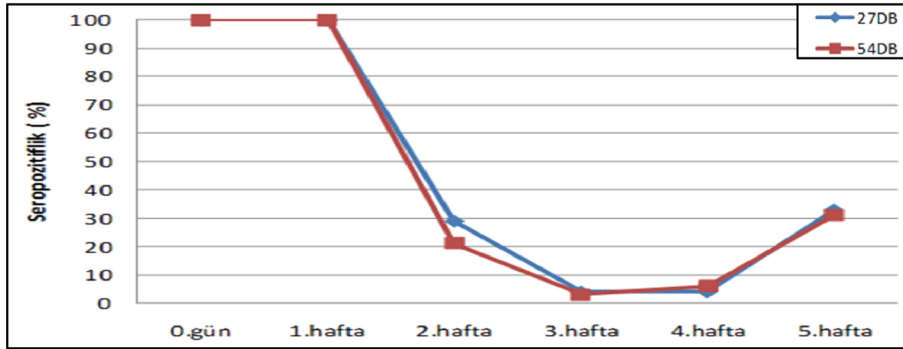
Tablo 5. Aşılı ve aşısız broyler damızlıkların ortalama antikor titreleri

Tablo 5. Protective mean antibody titers of vaccinated and non vaccinated broiler breeders flock

Broyler Damızlık	Serum (n)	X	±	S _x
CAV aşılı	120	6631.62	±	210.36
CAV aşısız	98	6572.79	±	219.65

X:ortalama S_x: standart hata

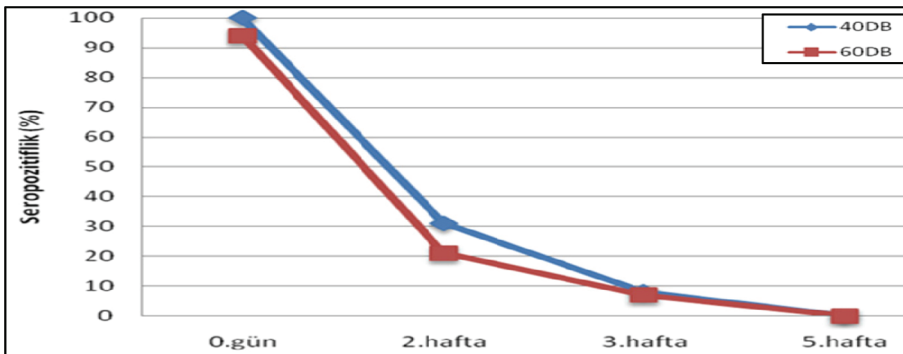
Aşılı damızlıkların ticari broyler sürülerinde ELISA bulguları: Aşılı broyler damızlıklardan elde edilen 24 ticari broyler sürünün, günlük ve 1 haftalıkken % 100, 2 haftalıkken % 9-50, 3 haftalıkken % 0-5, 4 haftalıkken % 0-14 ve 5 haftalıkken % 5-94 arasında seropozitiflik oranına sahip oldukları saptandı. Aşılı 27 ve 54 haftalık damızlıkların ticari broyler sürülerinin haftalara göre ortalama seropozitiflik oranları grafik 1’de verilmiştir.



27DB: 27 haftalık damızlıkların ticari broyler sürüleri,
54DB: 54 haftalık damızlıkların ticari broyler sürüleri

Grafik 1. Aşılı 27 ve 54 haftalık broyler damızlıkların ticari broyler sürülerinin haftalara göre ortalama seropozitiflik oranları

Graphic 1. Mean seropositive rates according to weeks of commercial broiler flocks which progeny of 27 and 54 weeks ages vaccinated broiler breeders.



40DB: 40 haftalık damızlıkların ticari broyler sürüleri
60DB: 60 haftalık damızlıkların ticari broyler sürüleri

Grafik 2. Aşısız 40 ve 60 haftalık broyler damızlıkların ticari broyler sürülerinin haftalara göre ortalama seropozitiflik oranları

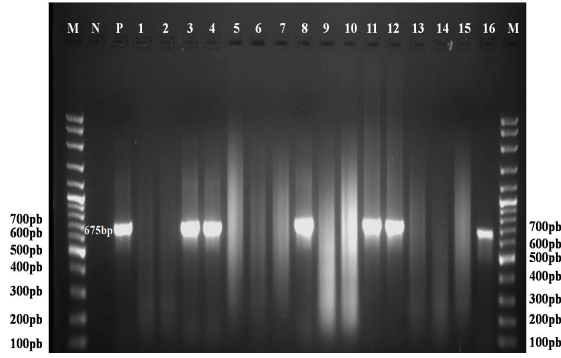
Graphic 2. Mean seropositive rates according to weeks of commercial broiler flocks which progeny of 40 and 60 weeks ages vaccinated broiler breeders.

Damızlık yaşı ile civcivlere geçen maternal antikor titresini arasında ilişki incelendiğinde 27 haftalık damızlıklardan elde edilen 91 adet günlük civcivin % 92’sinin, 54 haftalık damızlıklardan elde edilen 90 adet günlük civcivin % 66.6’sının yüksek titreye sahip olduğu belirlendi. Bu fark istatistikî olarak önemli bulundu (Chi-Square, $p < 0.05$).

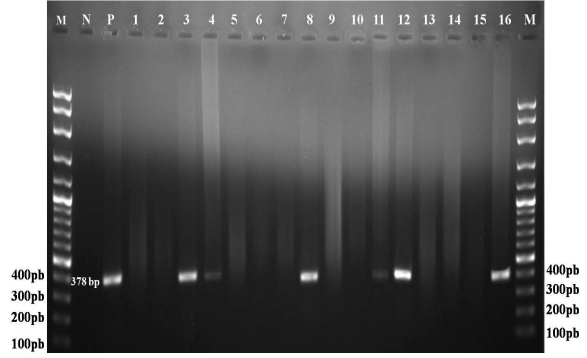
Aşısız damızlıkların ticari broyler sürülerinde ELISA bulguları: Aşısız 40 ve 60 haftalık broyler damızlıklardan elde edilen 8 ticari broyler sürünün, günlükken % 98-100, 2 haftalıkken % 5 - 60, 3 haftalıkken % 5 - 15 arasında seropozitiflik oranına sahip oldukları ve 5 haftalıkken sürülerin seronegatif olduğu belirlendi. Aşısız 40 ve 60 haftalık damızlıkların ticari broyler sürülerinin haftalara göre ortalama seropozitiflik oranları grafik 2’de verilmiştir.

Damızlık yaşı ile civcivlere geçen maternal antikor titresini arasında ilişki incelendiğinde 40 haftalık damızlıklardan elde edilen 81 adet günlük civcivin % 87.6’nın, 60 haftalık damızlıklardan elde edilen 80 adet günlük civcivin % 73.7’nin yüksek titreye yüksek titreye sahip olduğu belirlendi. Bu fark istatistikî olarak önemli bulunmadı.

Aşılı damızlıkların ticari broyler sürülerinde PCR bulguları: Marmara bölgesinde bulunan aşısız damızlıkların ticari broyler sürülerinde günlük, 1 ve 2 haftalıkken CAV



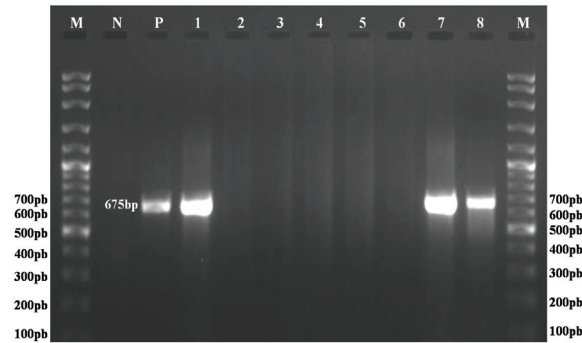
Şekil 1A



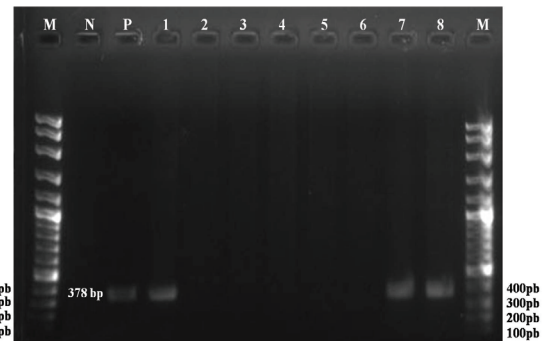
Şekil 1B

Şekil 1. Aşılı 27 ve 54 haftalık damızlıkların 4 ve 5 haftalık ticari broyler sürülerinin doku örneklerinde A) CAV VP1 (675bp) ve B) CAV VP2 (378bp) gen varlığı. M: 100bp DNA size marker, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol, 1, 2, 3, 4: 27 haftalık damızlıkların sırasıyla A1, A2, A3, A4 nolu 4 haftalık ticari broyler sürüleri, 5, 6, 7, 8: 54 haftalık damızlıkların sırasıyla A5, A6, A7, A8 nolu 4 haftalık ticari broyler sürüleri, 9, 10, 11, 12: 27 haftalık damızlıkların sırasıyla A1, A2, A3, A4 nolu 5 haftalık ticari broyler sürüleri, 13, 14, 15, 16: 54 haftalık damızlıkların sırasıyla A5, A6, A7, A8 nolu 5 haftalık ticari broyler sürüleri.

Figure 1. A) CAV VP1 (675bp) and B) CAV VP2 (378bp) genes in the tissue samples of 4- 5 weekly commercial broiler flocks which progeny of 27 and 54 weeks ages breeders. M: 100bp DNA size marker, N: Negative control, P: Positive control, 1, 2, 3, 4: 4 weekly commercial broiler flocks (respectively flock no: A1, A2, A3, A4) of 27 weeks ages vaccinated breeder, 5, 6, 7, 8: 4 weekly commercial broiler flocks (respectively flock no: A5, A6, A7, A8) of 54 weeks ages vaccinated breeder, 9, 10, 11, 12: 5 weekly commercial broiler flocks (respectively flock no: A1, A2, A3, A4) of 27 weeks ages vaccinated breeder, 13, 14, 15, 16: 5 weekly commercial broiler flocks (respectively flock no: A5, A6, A7, A8) of 54 weeks ages vaccinated.



Şekil 2A



Şekil 2B

Şekil 2. Aşılı 32, 35, 45 ve 47 haftalık damızlıkların 5 haftalık ticari broyler sürülerinden alınan doku örneklerinde CAV A) VP1 (675bp) ve B) VP2 (378bp) gen varlığı. M: 100bp DNA size marker, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol, 1, 2: 32 haftalık damızlıkların sırasıyla A9 ve A10 nolu ticari broyler sürüleri, 3, 4: 35 haftalık damızlıkların sırasıyla A13 ve A14 nolu ticari broyler sürüleri, 5, 6: 45 haftalık damızlıkların sırasıyla A17 ve A18 nolu ticari broyler sürüleri, 7, 8: 47 haftalık damızlıkların sırasıyla A21 ve A22 nolu ticari broyler sürüleri.

Figure 2. A) CAV VP1 (675bp) and B) CAV (378bp) VP2 genes in the tissue samples of 5 weekly commercial broiler flocks which progeny of 32, 35, 45 and 47 weeks ages breeders. M: 100bp DNA size marker, N: Negative control, P: Positive control, 1, 2: commercial broiler flocks (respectively flock no: A9, A10) of 32 weeks ages vaccinated breeder, 3, 4: commercial broiler flocks (respectively flock no: A13, A14) of 35 weeks ages vaccinated breeder, 5, 6: commercial broiler flocks (respectively flock no: A17, A18) of 45 weeks ages vaccinated breeder, 7, 8: commercial broiler flocks (respectively flock no: A21, A22) of 47 weeks ages vaccinated.

genleri belirlenmedi. Fakat 27 ve 54 haftalık damızlıkların 3 haftalık 8 sürünün 2'sinde, 4 haftalık 8 sürünün 3'ünde CAV genleri belirlenirken, 5 haftalık 16 sürünün 6'sında CAV VP1 ve VP2 genleri belirlendi. Aşılı broyler damızlıkların 4 ve 5 haftalık ticari broyler sürülerinin doku örneklerinde CAV gen varlığı PCR görüntüleri şekil 1 ve şekilde 2'de verilmiştir.

Aşısız damızlıklardan elde edilen ticari broyler sürülerinin PCR bulguları: İç Anadolu bölgesinde CIA hastalığına karşı aşısız 40 ile 60 haftalık broyler

damızlıkların 8 ticari broyler sürüsünden günlük, 2, 3 ve 5 haftalıkken alınan doku örneklerinde CAV VP1 ve VP2 genleri belirlenmedi.

VP1 ve VP2 gen primerleri kullanılarak yapılan PCR sonuçlarının karşılaştırılması: Marmara ve İç Anadolu bölgesindeki ticari broyler sürülerinden elde edilen doku homojenatlarında CAV genlerinin belirlenmesi amacıyla VP1 ve VP2 primer setleri kullanılarak yapılan PCR sonucunda her iki primer seti arasında farklılık belirlenmemiştir.

Tartışma ve Sonuç

Çalışmada aşı ve aşısız 12 broyler damızlık sürününün tamamı seropozitif belirlenirken, sürülerde seropozitiflik oranının % 95-100 arasında değiştiği belirlendi. Aşı broyler damızlık sürülerde seropozitiflik beklenen bir sonuçken, aşısız broyler damızlık sürülerde belirlenen seropozitiflik, bu sürülerin hayatlarının bir döneminde CAV ile enfekte olduğunu göstermektedir. Seropozitif aşısız damızlıkların günlük civcivlerinde CAV spesifik genlerin belirlenmemesi, bu aşısız damızlıkların örnekleme yapılan dönemden daha önce CAV ile enfekte olduğunu düşündürmüştür. Bu araştırmada damızlıklarda belirlenen CAV seropozitif sürü oranları çeşitli çalışmalarda belirlenen seropozitif sürü oranlarıyla uyumlu bulunmuştur (1, 2, 3, 6, 25).

Araştırmada aşı ve aşısız broyler damızlık sürülerinin ortalama antikor titreleri arasında istatistiki olarak bir fark olmadığı belirlendi. Bu sonuç Canal ve ark. (3)'ün aşı damızlıklarının % 99'unun, aşısız damızlıklarının % 52'sinin yeterli düzeyde antikor titresine sahip olduğunu bildirdikleri çalışma sonuçlarından farklılık göstermiştir. Bu farklılık, araştırmacıların örnekleme yaptığı sürüde serokonversiyonun tam oluşmamasından kaynaklanabileceği gibi konak, çevre ve etken gibi pek çok sebepten kaynaklanabilir. Araştırmacılar da bu farklılığı saha enfeksiyonunun oluşan antikor düzeyinde çeşitlilik oluşturabileceğini bildirerek açıklamışlardır.

Araştırmada damızlık yaşının artmasıyla antikor titresinin azalabileceği fakat bu azalmanın önemli olmadığı belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar daha önce yapılan çalışma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir (3, 4, 7, 10, 17).

Araştırmada genç damızlıkların civcivlerinin yaşlı damızlıkların civcivlerine göre daha yüksek düzeyde maternal antikor titresine sahip olduğu belirlendi. Bu sonuçlar Pages ve ark. (18)'nin, CIA hastalığına karşı 20 haftalıkken aşılanmış bir damızlık sürüden 30, 40, 50 ve 60 haftalık yaşlarda elde edilen günlük civcivlerde CAV maternal antikor titresinin damızlık yaşının artmasıyla azalsa da hastalığa karşı koruyucu düzeyde olduğunu bildirdikleri çalışma sonuçlarıyla uyumlu bulundu.

Günlük ve 1 haftalık ticari broyler sürülerin tamamında yüksek düzeyde maternal antikor saptanırken, 2 haftalıktan sonra sürülerde maternal antikor titresinin ve varlığının hızla azaldığı belirlendi. Bu araştırmada belirlenen maternal antikorların varlığı ve seyri bazı çalışma sonuçlarıyla uyumlu bulunurken (16, 20), maternal antikor varlığı ve koruyuculuğunun 3-4 haftalığa kadar devam edebileceğini bildiren çalışma sonuçlarından farklılık göstermiştir (8, 11, 18, 22, 29). Bu farklılık araştırmacıların çalışmalarında örnekleme yaptıkları damızlık sürülerin antikor titrelerinin yüksek olmasıyla ilişkili olabilir.

Çalışmada, Marmara bölgesinde bulunan aşı broyler damızlıklardan elde edilen 4 haftalık 8 ticari

broyler sürününün % 62.5'inde, 5 haftalık 16 ticari broyler sürününün % 93.8'inde antikor varlığı ELISA ile tespit edildi. PCR çalışmaları sonucunda Marmara bölgesindeki ticari broyler sürüleri 3, 4 ve 5 haftalıkken CAV VP1 ve VP2 genleri saptandı. Bu sonuçlar, Marmara bölgesindeki sürülerde CAV varlığını bildiren çalışma sonuçlarıyla uyumlu bulundu (25, 26, 27) ve Marmara bölgesinde örnekleme yapılan sürülerin CAV ile enfekte olduğu sonucuna varıldı. Bu bulaşma saha suşlarıyla veya bölgede uygulanan CAV aşı suşuyla ilişkili olabilir. Bu durumun belirlenmesi için sahadan izole edilen CAV suşlarının tiplendirilmesi ve CAV aşı suşlarıyla ilişkisinin araştırılması gereklidir. İç Anadolu bölgesindeki ticari broyler sürülerinde 3, 4 ve 5 haftalıkken CAV antikorları ve CAV DNA'sı tespit edilmedi. Bu sonuçlara göre İç Anadolu bölgesinde örnekleme yapılan ticari broyler sürülerinin CAV ile enfekte olmadığı sonucuna varıldı. VP1F/VP1R primerleri ile pozitif bulunan örnekler VP2F/VP2R primerleri ile de pozitif bulundu (11 pozitif, 93 negatif). Bu sonuç Nogueira ve ark. (13) ve Kumar'ın (9) bildirdiği sonuçlardan farklı bulunmuştur. Bu farklılık seçilen primerler ve/veya virüs suşuyla ilişkili olabilir.

Yapılan bu araştırma sonucunda, hem aşı hem de aşısız broyler damızlık sürülerinde CAV antikorlarının belirlendiği, uzun süre koruma sağladığı (en az 60 hafta) ve ortalama antikor titreleri arasında fark olmadığı belirlendi. Damızlık yaşının artmasıyla antikor titresinde az da olsa bir düşüşün gözlemlendiği ve civcivlere geçen maternal antikor titresinin de azaldığı tespit edildi. Civcivlere aktarılan maternal antikorların 2. haftadan itibaren bulunmadığı veya çok düşük titrede olduğu gözlemlendi. Ayrıca 3. haftadan itibaren CAV genlerinin ve 4 haftadan itibaren CAV antikorlarının belirlendiği saptandı. Elde edilen bilgiler ışığında, maternal antikorların azalmasına bağlı olarak tavuk sürüleri 2 haftalıktan itibaren CAV ile enfekte olabilir. Bu durumda birçok damızlık sürünün de yumurtlama periyodu öncesi, hatta aşılanmanın en erken yapılacağı 6. haftadan önce seropozitif olacağı dikkate alınmalı ve seropozitif sürülerde aşı uygulaması yapılmamalıdır.

Kaynaklar

1. **Brentano L, Lazzarin S, Bassi SS, Klein TAP, Schat KA** (2004): *Detection of chicken anemia virus in the gonads and in the progeny of broiler breeder hens with high neutralizing antibody titers.* Vet Microbiol, **105**, 65-72.
2. **Brentano L, Silva BG, Sayd S and Flores SW** (2000): *Antibodies to chicken anemia virus (CAV) in broiler breeder flocks in Brazil.* Revta Bras Cienc Avic, **2**,157-179.
3. **Canal WC, Ferreira DJ, Macagnan M, Fallavena LCB, Moraes HLS and Wald VB** (2004): *Prevalence of antibodies against chicken anaemia virus (CAV) in broiler breeders in Southern Brazil.* Pesq Vet Bras, **24**, 89-92.

4. **Cardona CJ, Lucio B, O'Connell P, Jagne J, and Schat KA** (2000a): *Humoral immune responses to chicken infectious anemia virus in three strains of chickens in a closed flock.* Avian Dis, **44**, 661-667.
5. **Chandratilleke D, Connell P, and Schat KA** (1991): *Characterization of proteins of chicken infectious anemia virus with monoclonal antibodies.* Avian Dis, **35**, 854-862.
6. **Hadimli HH, Erganiş O, Güler L, Uçan US** (2008): *Investigation of Chicken Infectious Anemia Virus Infection by PCR and ELISA in Chicken Flocks.* Turk J Vet Anim Sci, **32**, 1-5.
7. **Imai K, Mase S, Tsukamoto K, Hihara H, Matsumura T, and Yuasa N** (1993): *A long term observation of antibody status to chicken anaemia virus in individual chickens of breeder flocks.* Res Vet Sci, **54**, 392-396.
8. **Kapetanov M, Orlic D, Velhner M, Kosarcic S and Lazić S** (2003): *Clinical and serological examination of a parental flock latently infected with chicken anemia virus.* Acta Vet (Beograd), **53**, 239-248.
9. **Kumar A** (2007): *Detection and molecular characterization of chicken infectious anaemia virus from poultry.* Master of Veterinary Science, Veterinary Microbiology of Anand Agricultural University, Gujarat State, India.
10. **Mahzounieh M, Karimi I and Salehi TZ** (2005): *Serologic evidence of chicken infectious anemia in commercial chicken flocks in Shahrekord, Iran.* Int J PoulSci **4**, 500-503.
11. **McNulty MS, Connor TJ, and McNeilly F, Kirkpatrick KS, and McFerran JB** (1988): *A serological survey of domestic poultry in the United Kingdom for antibody to chicken anaemia agent.* Avian Pathol, **17**, 315-324.
12. **Miller MM, Jarosinski KJ and Schat KA** (2005): *Positive and negative regulation of chicken anemia virus transcription.* J Virol, **79**:2859-2868.
13. **Nogueira EO, Brentano L, Ferreira AJP** (2005): *A VP3/VP1 gene polymerase chain reaction assay for detection of chicken anemia virus in broiler samples.* Arq Bras Med Vet Zootec, **57**,131-140.
14. **Noteborn MHM, Todd D, Verschuere CAJ, De Gauw HWFM, Curran WL, Veldkamp S, Douglas AJ, McNulty MS, Van Der Eb AJ, and Koch G** (1994): *A single chicken anemia virus protein induces apoptosis.* J Virol, **68**:346-351.
15. **Noteborn MHM, Kranenburg O, Zantema A, Koch G, De Boer GF, and Van Der Eb AJ** (1992): *Transcription of the chicken anemia virus (CAV) genome and synthesis of its 52-kDa protein.* Gene, **118**:267-271.
16. **Otaki Y, Saito K, Tajima M, Nomura Y** (1992): *Persistence of maternal antibody to chicken anemia agent and its effect on the susceptibility of young chickens.* Avian Pathol. **21**, 147-151.
17. **Owoade AA, Oluwayelu DO, Fagbohun OA, Ammerlaan W, Mulders MN, Muller CP** (2004): *Serologic evidence of chicken infectious anemia in commercial chicken flocks in southwest Nigeria.* Avian Dis, **48**, 202-205.
18. **Pages A, Saubi N, Artigas C, and Espuna E** (1997): *Experimental evaluation of an inactivated vaccine against chicken anaemia virus.* Avian Pathol, **26**, 721-729.
19. **Phenix KV, Meehan BM, Todd D, McNulty MS** (1994): *Transcriptional analysis and genome expression of chicken anemia virus.* J Gen Virol, **75**: 905-909.
20. **Roussan AD** (2006): *Serological Survey on the Prevalence of Chicken Infectious Anemia Virus in Commercial Broiler Chicken Flocks in Northern Jordan.* Int J Poul Sci, **5**, 544-546.
21. **Schat KA** (2003): *Circovirus infections, chicken infectious anemia.* In: Y. M. Saif, H. J. Barnes, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald, and D. E. Swayne (Eds), Diseases of poultry. 11th ed, Iowa State University Press, Ames, IA. pp 182-202.
22. **Sommer F and Cardona C** (2003): *Chicken Anemia Virus in Broilers: Dynamics of the Infection in Two Commercial Broiler Flocks.* Avian Dis, **47**, 1466-1473.
23. **Todd D, Mackie DP, Mawhinney KA, Connor TJ, McNeilly F, and McNulty MS** (1990): *Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect serum antibody to chicken anemia agent.* Avian Dis, **34**, 359-363.
24. **Todd D, Mawhinney KA, and McNulty MS** (1992): *Detection and differentiation of chicken anemia virus isolates by using the polymerase chain reaction.* J Clin Microbiol, **30**, 1661-1666.
25. **Türkyılmaz S, Mısırlıoğlu OZ** (2004): *İzmir ve Bandırma yörelerinde chicken infectious anemia virus antikorlarının ELISA ile saptanması.* Pendik Vet Mikrobiol Derg, **35**, 13-19.
26. **Yılmaz H, Özgür NY, Turan N, Akay Ö** (1999): *Tavuk anemi virusunun polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması.* VIV Uluslararası Tavukçuluk Fuarı, Yutav 99, İstanbul, 555-561.
27. **Yılmaz H, Turan N, Özgür NY, Helps CR, Akay Ö** (2001): *Detection of chicken anemia virus DNA in the thymus of naturally infected chicks in Turkey.* Avian Dis, **45**, 529-533.
28. **Yuasa N, Imai K, and Tezuka H** (1985): *Survey of antibody against chicken anaemia agent (CAA) by an indirect immunofluorescent antibody technique in breeder flocks in Japan.* Avian Pathol, **14**, 521-530.
29. **Yuasa N, Noguchi T, Furuta K, and Yoshida I** (1980): *Maternal antibody and its effect on the susceptibility of chicks to chicken anemia agent.* Avian Dis, **24**, 197-201.

Geliş tarihi: 18.04.2010 / Kabul tarihi: 25.01.2011

Yazışma Adresi:

Şinasi Aşkar
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
71451, Yahşihan/Kırıkkale.
E-mail: sinasia@gmail.com