

İnfeksiyöz bursal hastalığının immunofloresan tekniği ile teşhisi*

Mehmet AKAN, Müjgan İZGÜR, Barış SAREYYÜPOĞLU

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Özet: Bu çalışmada, infeksiyöz bursal hastalığının (IBD) teşhisinde immunofloresan tekniğinin kullanılması, standardizasyonu ve bu teknikte kullanılacak konjugatın hazırlanması amaçlandı. İmmunize edilen tavuk ve tavşan serumları florescin izotiosiyanat ile işaretlendi. Konjugat standardizasyonu için deneysel infekte ve kontrol grubundan hazırlanan preparatlarla yapılan testlerde optimal konjugat sulandırmasının 1:16 olduğu belirlendi. Ayrıca standardizasyon çalışmaları sonrasında indirekt floresan antikor tekniğinin (IFAT) relatif olarak direkt floresan antikor tekniğine (FAT) üstünlüğü saptandı. AGID testinde kontrol grubuna ait örnekler negatif, aşılı ve saha suşu ile infekte edilen gruplara ait örnekler ise pozitif sonuç verdi. AGID'e göre FAT ve IFAT'ın spesifite ve sensitivitesinin %100 olduğu hesaplandı. Saha çalışmalarında, IBD şüpheli 27 kümesin 23'ünde (%85.13) pozitiflik saptandı. Sonuçta, immunofloresan tekniğinin IBDV infeksiyonlarında kullanılabilirliği ortaya konuldu.

Anahtar sözcükler: Gumboro, IBDV, immunofloresan, tavuk

Diagnosis of infectious bursal disease infection by immunofluorescence technique

Summary: In this study, use and standardization of immunofluorescence technique for the diagnosis of infectious bursal disease (IBD) infection and preparation of the conjugate that will be used in the technique were aimed. Immunized chicken and rabbit sera were labelled with fluorescein isothiocyanate. In the standardization of the conjugate dilution, optimal ratio was determined as 1:16 after the evaluation of smears prepared from the bursa Fabricius of the control and experimentally infected groups. Indirect fluorescent antibody technique was found to be relatively superior to the direct fluorescent antibody technique after the standardization tests. In the field studies, 23 out of 28 (85.13%) IBDV infected broiler flocks were detected to be positive by immunofluorescence technique. As a conclusion, immunofluorescent antibody technique (IFAT) was found to be useful for diagnosis of the IBDV infections.

Key words: Chicken, Gumboro, IBDV, immunofluorescence.

Giriş

İnfeksiyöz bursal hastalık (IBD, Gumboro), özellikle piliçlerde primer lenfoid organları etkileyen viral bir hastalıktır. Hastalığın akut formunda depresyon ve ölüm, sublinik formda ise immunsupresyon şekillenmektedir. Hastalıkta oluşan ölüm ve gelişme bozukluğuna bağlı önemli ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır (12, 16).

Hastalığın etkeni *Birnaviridae* familyasında yer almaktadır. İnfeksiyöz bursal hastalık virusu (IBDV), 58-60 nm çapında, zarfsız-ikozahedral bir simetriye sahiptir ve genomu çift sarmallı RNA yapısındadır. IBDV'nin iki serotipi bulunmaktadır ve bunlardan sadece serotip 1 tavuklarda hastalık oluşturmaktadır (1, 3, 12, 15, 16).

Hastalığın kesin teşhisi virus izolasyonu ile yapılmaktadır. IBDV'nin bazılarının doku kültürlerine zor adapte olmaları ve embriyolarda ölüm yapmamaları nedeniyle virus izolasyonu zaman alıcı ve pahalı olmaktadır. Tavuklarda hastalık oluşturan etkenlerin farklı patojenik tipleri olmasına karşın, antijenik yapılarının

benzerliği nedeniyle teşhiste pratik yöntemlerin kullanılması tercih edilmektedir (2, 5, 11). Bu teknikler arasında en sık kullanılanları, agar jel immunodifüzyon (AGID), immunofloresan (IF) ve immunoperoksidaz (IP) teknikleridir. AGID hastalığın teşhisinde altın standart kabul edilen bir teşhis yöntemidir (3). İmmunofloresan ve immunoperoksidaz tekniklerinin de hastalığın teşhisinde yüksek spesifiteye sahip olduğu farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (2, 4, 9, 13, 14). Bu tekniklerin seçiminde teşhis laboratuvarlarının altyapısı ve uzman kadrosu etkili faktörler olarak gösterilmektedir. Pratikte büyük yarar sağlayan bu tekniklerin birbirlerine karşı bazı avantaj ve dezavantajları olduğu fakat hastalığın kesin ve çabuk teşhisinde IF ve IP testinin de oldukça güvenilir olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda IF tekniği ile, agar jel immunodifüzyon ve dot-blot hibridizasyon bulguları arasında büyük bir korelasyon olduğu da bildirilmiştir (3, 5, 9).

* Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü (Proje No 2000-08-10-003) tarafından desteklenmiştir.

Genel olarak immunofloresan tekniği birçok hastalığın teşhisinde kullanılan bir testtir. Test kanatlı hayvan hastalıkları teşhis laboratuvarlarında, IBD'nin yanısıra Newcastle, infeksiyöz bronşitis, infeksiyöz laringotrahitis ve Marek gibi birçok hastalıkta kullanılmaktadır. Bu tekniğin en büyük avantajı, teşhisin materyal alımını takiben 2-3 saat gibi bir sürede yapılabilir olmasıdır. Bu durum, özellikle hastalıkla ilgili olarak alınan temel koruyucu önlemler, biyogüvenlik ve aşılama programları için avantaj sağlamaktadır.

Bu çalışmada, tavukçuluk sektöründe oldukça önemli ekonomik kayıplara neden olan infeksiyöz bursal hastalığın kısa sürede kesin teşhisi için immunofloresan tekniğinin kullanılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Deneme hayvanları

Çalışmada 100 adet SPF broiler civciv (Ross 308) kullanıldı. Bu civcivler, IBDV spesifik antikor üretimi, tavuk IgG eldesi ve deneysel infeksiyon oluşturma amacıyla kullanıldı. Anti-tavuk IgG eldesi için 2 adet tavşandan yararlanıldı.

Virus

Sahadan izole G41 (Tavuk Hastalıkları Araştırma Enstitüsü, Manisa) suşu ile canlı IBD aşı suşu (D78, Intervet) kullanıldı.

Deneysel infeksiyon

Civcivler, 3 haftalık yaşa geldiğinde 20 adetten oluşan üç gruba ayrıldı. Birinci gruptaki civcivler kontrol grubuna ayrıldı. İkinci gruptaki civcivler D78 aşı suşu üçüncü gruptaki civcivler ise saha suşu (G41) ile intraoküler yolla infekte edildiler.

Konjugat hazırlanması

Konjugat hazırlanması için aşağıdaki işlemler yürütüldü.

IBDV antiserumu eldesi: Çalışmada, spesifik IBDV-antiserumu hazırlamak amacıyla 3 haftalık 20 adet SPF broiler civciv (Ross 308) kullanıldı. Bu işlem için, civcivlere D78 aşısı 10^5 virus/ml dozda (Intervet) 15 gün ara ile iki kez kas-içi yolla verildi. Son inokulasyondan 15 gün sonra hayvanların kanları toplandı ve serumları çıkarıldı. Serum örnekleri immunoglobulin purifikasyon kolonundan (Econopac, Biorad) geçirildikten sonra FITC ile işaretlenene kadar $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

Tavşan anti-tavuk IgG hazırlanması: İndirekt floresan antikor tekniğinde (IFAT) kullanılacak konjugatın hazırlanması amacıyla, tavuk serumunun immunoglobulin purifikasyon kolonundan (Econopac, Biorad) geçirildikten sonra ayrılan tavuk IgG fraksiyonu, tavşanlara inkomple Freund adjuvanı ile birlikte (1/1 hacimde) iki hafta ara ile üç kez deri altı olarak inokule edildi. Son inokulasyonu takiben 2 hafta sonra

tavşanlardan kan alındı ve serumları çıkarıldı. Bu serumlar FITC ile işaretlenene kadar $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

FITC ile işaretleme: Serum örneklerinin protein içerikleri belirlenmesinden sonra fosfat buffer solüsyonu (PBS) ile 20 mg/ml olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırılan serum örnekleri ile FITC (30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) karıştırıldı ve bir gece karanlıkta ve buzdolabında bekledi. Bu solüsyon daha sonra Sephadex G-25 kolonundan geçirildi ve elde edilen konjugat PBS'ye karşı buzdolabında bir gece dializ edildi. Dializ işleminden sonra santrifüj edildi ve süpernatant 1 ml hacimlerde ependorf tüplere ayrılarak kullanılmaya kadar $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı (7, 8).

IFT konjugatının standardizasyonu: Direkt ve indirekt floresan testi için hazırlanan konjugatların standardizasyon çalışmaları, kontrol, aşı suşu (D78) ve saha suşu ile infekte edilen civcivlere ait bursa Fabricius'lerden hazırlanan preparatlarla gerçekleştirildi. Ayrıca hazırlanan tavşan anti-tavuk (indirekt floresan testi) konjugatının standardizasyonu, ticari tavşan anti-tavuk konjugatı (Sigma F 8888) ile karşılaştırılarak yapıldı.

Floresan antikor testi (FAT)

Deneysel infekte, kontrol grubu ve hastalıklı kümeslerdeki piliçlerden alınan bursa Fabricius örneklerinden sürme preparatlar hazırlandı. Preparatlar havada kurutuldu ve kullanılmaya kadar absolut aseton içinde $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı (6).

İndirekt yöntem: Hazırlanan preparatlar önce PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı. Bu işlemi takiben primer antikor (pozitif serum) ile 30 dakika bekledi. Yıkama işlemi takiben konjugat ilave edilerek 30 dakika inkube edildi. Bu işlemlerin sonunda tekrar yıkama işlemi yapıldı ve preparatlar floresan mikroskopunda incelendi. Sonuçlar, negatif ve boyanma düzeyine göre '+'dan ++++'ya kadar pozitif olarak değerlendirildi (10).

Direkt yöntem: Hazırlanan preparatlar önce PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı. Bu işlemi takiben FITC ile işaretli IBDV spesifik konjugat ilave edildi ve 30 dakika inkubasyona bırakıldı. Sonuçlar indirekt yöntemde olduğu gibi değerlendirildi.

Agar gel immunodiffüzyon (AGID) testi

Bu test saha örnekleri ile yapılan direkt ve indirekt floresan antikor tekniği sonuçlarının doğrulanması amacıyla kullanıldı (3). Sahadan toplanan tavuklara ait bursa Fabricius'lar steril makas ve bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı ve antijen (IBDV) aranmak üzere kullanıldı. Pozitif serum olarak bu çalışmada hazırlanan serum kullanıldı. Test, %1,25 agar içeren ortamda gerçekleştirildi ve sonuçlar $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 48 saat sonra oluşan presipitatlara göre değerlendirildi. Negatif kontrol amacıyla, kontrol grubuna ait hayvanların bursa Fabricius'ları kullanıldı.

Saha Örnekleri

Ankara çevresindeki IBD şüpheli 27 kümese ait toplam 224 broilerin bursa Fabricius'u materyal olarak incelendi. İncelenen saha örnekleri %1-4 ölüm görülen ve yaşları 17-41 gün arasında değişen kümeslerden toplandı.

Bulgular

Deneysel infeksiyon

Deneysel infeksiyon sonrasında saha suşu ile infekte edilen hayvanlarda durgunluk, tüylerde kabarma, beyaz ishal ve iştah kaybı gözlemlendi. Deneysel infeksiyonu takiben her üç gruptaki hayvanların tamamına nekropsi yapıldı ve bursa Fabricius'ları preparat hazırlama amacıyla alındı. Nekropside saha suşu ile infekte edilen tüm civcivlerin bursa Fabricius'larının ödemli ve kanamalı olduğu gözlemlendi. Aşı suşları ile infekte edilen civcivlerin bursa Fabricius'larında ise hafif ödem bulgularına rastlandı. Bulgular, kontrol grubundaki hayvanların bursa Fabricius'ları ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

IFT konjugatlarının standardizasyonu

Hazırlanan konjugatlar iki katlı olarak sulandırıldı. Her sulandırmadaki konjugatlar, kontrol ve saha suşu ile infekte gruplara ait bursa Fabricius'lardan hazırlanan preparatlarla test edildi. Konjugat standardizasyon çalışmalarından sonra, konjugatların en uygun sulandırmasının 1:16 olduğu saptandı. Bu aşamadan sonra yapılan tüm testlerde konjugat 1:16 olarak sulandırıldı.

Hazırlanan konjugatlar, kontrol gruplarına ait civcivlerin bursa Fabricius'larından hazırlanan preparatlarla reaksiyon vermezken, aşı ve saha suşları ile infekte edilen gruplara ait civcivlerin bursa Fabricius'larından hazırlanan preparatlarla pozitif sonuç verdi. Aşılı grupta reaksiyon ++, +++ olarak belirlenirken saha suşu ile infekte edilenlerde +, ++, +++'lük reaksiyon gözlemlendi. Ticari konjugat kullanılarak gerçekleştirilen testler ile laboratuvarında hazırlanan konjugat ile yapılanlar arasında herhangi bir fark bulunamadı.

Floresan antikor testi

Kontrol ve deneysel infeksiyon (D78 ve G41) gruplarına ait civcivlerden hazırlanan preparatlarda gerçekleştirilen direkt ve indirekt IF test bulguları Tablo 1.de sunulmuştur. Testlerde kontrol grubundaki hayvanlara ait preparatlarda reaksiyon gözlenmezken, aşı ve saha suşu ile deneysel infekte edilen gruplara ait hayvanların tümünde pozitif reaksiyon saptandı. Aşı suşu ile infekte edilen civcivlerde ++ ve +++'lük reaksiyon belirlenirken saha suşu ile infekte edilen gruptaki hayvanlarda +, ++, +++'lük bir reaksiyon belirlendi. Ayrıca, IFAT'ta belirlenen reaksiyonun direkt IF'ye göre relatif olarak daha belirgin olduğu saptandı.

Tablo 1. Kontrol ve deneysel infekte civcivlere ait materyallerin direkt ve indirekt floresan antikor test bulguları
Table 1. Direct and indirect fluorescent antibody test results of materials obtained from experimentally infected and control group chicks

| Gruplar/Testler | Direkt FAT | İndirekt FAT | |
|-----------------|------------|--------------|-----------------|
| | | Konjugat* | Ticari Konjugat |
| Kontrol | 0/20 | 0/20 | 0/20 |
| D78 | 20/20 | 20/20 | 20/20 |
| G41 | 20/20 | 20/20 | 20/20 |

* : Laboratuvarında hazırlanan tavşan anti-tavuk konjugat

Tablo 2. Materyal alınan kümeslere ait bilgiler ve IFAT bulguları
Table 2. Data and IFAT results of flocks sampled

| Kümes | Yaş | İnfeksiyon süresi (gün)* | İshal | Kaslarda kanama | bursa Fabricius | IFAT |
|-------|-----|--------------------------|-------|-----------------|-----------------|------|
| 1 | 23 | 4 | Var | Var | ödemli | +++ |
| 2 | 18 | 5 | Var | Var | ödemli | +++ |
| 3 | 34 | 3 | Var | Var | ödemli | +++ |
| 4 | 19 | 3 | Var | Yok | ödemli | +++ |
| 5 | 37 | 12 | Yok | Var | atrofik | - |
| 6 | 27 | 6 | Yok | Var | atrofik | + |
| 7 | 25 | 3 | Var | Var | ödemli | +++ |
| 8 | 28 | 4 | Var | Var | ödemli | +++ |
| 9 | 34 | 4 | Var | Var | ödemli | +++ |
| 10 | 26 | 6 | Yok | Var | atrofik | ++ |
| 11 | 17 | 3 | Var | Var | ödemli | ++++ |
| 12 | 37 | 6 | Yok | Var | atrofik | + |
| 13 | 21 | 3 | Var | Var | ödemli | +++ |
| 14 | 38 | 13 | Yok | Var | atrofik | - |
| 15 | 31 | 4 | Var | Var | ödemli | +++ |
| 16 | 34 | 5 | Var | Var | ödemli | +++ |
| 17 | 28 | 3 | Var | Var | ödemli | ++++ |
| 18 | 30 | 7 | Yok | Var | atrofik | + |
| 19 | 41 | 10 | Yok | Yok | atrofik | - |
| 20 | 37 | 14 | Yok | Var | atrofik | - |
| 21 | 23 | 6 | Yok | Var | atrofik | + |
| 22 | 21 | 3 | Var | Var | ödemli | ++++ |
| 23 | 36 | 5 | Yok | Var | atrofik | ++ |
| 24 | 37 | 4 | Var | Var | ödemli | +++ |
| 25 | 26 | 6 | Yok | Var | atrofik | + |
| 26 | 37 | 3 | Var | Var | ödemli | ++++ |
| 27 | 35 | 5 | Var | Var | ödemli | +++ |

* : Anamnez bilgilerine göre belirlenmiştir.

AGID testi

Direkt ve indirekt floresan antikor tekniği sonuçlarının doğrulanması için AGID testi gerçekleştirildi. AGID testinde kontrol grubuna ait örnekler negatif, aşılı ve saha suşu ile infekte edilen gruplara ait örnekler ise pozitif sonuç verdi. AGID'e göre FAT ve IFAT'ın spesifite ve sensitivitesinin %100 olduğu hesaplandı.

Saha rnekleri

Saha materyalleri, deneysel infeksiyon ve standardizasyon çalışmaları sonrasında standardize edilen laboratuvarda hazırlanan tavşan anti-tavuk konjugatı ile incelendi. Saha materyallerinin incelenmesinde IFAT kullanıldı. Materyal alınan kümelere ait bilgiler ve bulgular Tablo 2' de bildirilmiştir.

Çalışmada klinik olarak IBDV infeksiyonu geçirmiş 27 kümesin 23 (%85,13)'nde pozitif reaksiyon saptandı. Negatif sonuç alınan kümelere ait bursa Fabricius'ların atrofik olduğu ve vakaların görülmesinin üzerinden uzun süre (10-14 gün) geçtiği tespit edildi.

Hastalığın klinik olarak görüldüğü en erken yaş 17 gün olarak belirlendi. Klinik ve nekropsi sonuçları değerlendirildiğinde, hastalığın klinik olarak gözlenmesi sonrasında ilk günlerde (1-4.günler) ishalin yanısıra nekropside bursa Fabricius'larda demnin görülmesi dikkati çekti. Bu vakalarda IFAT'inde +++ ve ++++'lık reaksiyon belirlendi. Hastalığın ileri döneminde (5.günden sonra), piliçlerin bursa Fabricius'larının atrofik bir durum aldığı gözlendi ve bu materyallerden hazırlanan preparatlarda + ve ++'lık pozitiflik saptandı.

Tartışma ve Sonuç

Genç piliçlerde görülen ve önemli ekonomik kayıplara neden olan Gumboro (IBD) saha koşullarında klinik ve nekropsi bulguları ile teşhis edilebilmektedir. Ancak özellikle infeksiyonun subklinik seyrettiği durumlarda teşhis için laboratuvar muayenelerine gereksinim duyulmaktadır. Laboratuvar koşullarında hastalığın teşhisinde, virus izolasyonu, agar jel immunodifüzyon, histopatoloji, immunoperoksidaz ve moleküler teknikler kullanılmaktadır. Bu tekniklerden özellikle virus izolasyonun zaman alıcı ve bazı saha suşlarının üretilmesinin zor olması nedenleriyle kısa sürede sonuç veren teknikleri ihtiyaç duyulmaktadır. Bu alışmada, IBDV infeksiyonlarının teşhisinde immunfloresan tekniklerinin kullanılması amaçlanmıştır.

Çalışmada, laboratuvarda hazırlanan konjugatlarla ve ticari konjugatla gerçekleştirilen IF testlerinde aşı ve saha suşu ile infekte edilen gruplara ait civcivlerin bursa Fabricius'larından hazırlanan tüm örneklerde pozitif sonuç saptandı. Saha suşu ile infekte edilen gruba ait preparatlardaki reaksiyonun, aşılı gruptaki civcivlere ait örneklerdeki reaksiyondan daha yoğun olduğu belirlendi. Ayrıca, IFAT'ta belirlenen reaksiyonun direkt IF'ye göre

relatif olarak daha belirgin olduğu saptandı. Bu sonuç, IF sonuçlarının virus patojenitesine bağlı olarak farklılık gösterdiği belirlenen çalışmalarda (2, 11, 14) elde edilen bulgularını destekler niteliktedir. Bu alışmada IFAT'ta belirlenen reaksiyonun direkt IF'ye göre relatif olarak daha belirgin olması, saha koşullarında toplanan örneklerin incelenmesinde IFA tekniğinin kullanılmasına neden olmuştur. Ayrıca, özellikle saha materyallerinin bu teknikte incelenmesinde, aşı suşlarının da pozitif reaksiyon vermesi nedeniyle tavukların IBD aşı programlarının bilinmesi gerekliliği ortaya kmıştır.

Çalışmada klinik olarak IBDV infeksiyonu geçirmiş 27 kümesin 23 (%85,13)'nde pozitif reaksiyon saptandı. Hastalığın klinik olarak görüldüğü en erken yaş 17 gün olarak belirlendi. Hastalığın klinik olarak gözlenmesinin 1-4. günlerde ödemli olduğu saptanan bursa Fabricius'lardan hazırlanan preparatlarda, IFAT'inde +++ ve ++++'lık reaksiyon belirlenirken, hastalığın ilerlediği dönemde (5.günden sonra), atrofik bursa Fabricius'lardan hazırlanan preparatlarda + ve ++'lık pozitiflik saptandı. Negatif sonuç alınan kümelere ait bursa Fabricius'ların atrofik olduğu ve vakaların görülmesinin üzerinden uzun süre (10-14 gün) geçtiği tespit edildi. Pala ve Tre (14), Gumboro şüpheli kümeslerden toplanan bursa Fabricius'ları IBD yönünden, IF ve IP tekniği ile incelemişler ve sonuçta incelenen kümeslerde %90,9 oranında pozitiflik saptamışlardır. Araştırmacılar, eski vakalarda pozitif boyanan hücre sayısının ve boyanmanın derecesinin düştüğünü belirtmişler ve infeksiyonun 3-5. günlerinde alınan materyallerde yüksek pozitiflik saptadıklarını bildirmişleridir. Kumar ve Rao (11), deneysel infekte edilen civcivlerin bursa Fabricius'larında IF ile IBD virusunu belirlemişler ve pozitiflik oranının infeksiyonun ilk dönemlerinde ve virusun patojenitesinin yüksek olduğunda arttığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada elde edilen bulgular, diğer çalışmalarda elde edilen bulgularla uyumludur. Elde edilen sonuçlara göre, özellikle ishal, bursa Fabricius'da dem ve kaslarda kanama olduğu dönemlerde alınan materyallerde IF tekniğinin hastalığı saptamada daha etkin olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada, standardizasyon aşamasında aşı ve saha suşu ile deneysel infekte materyallerle negatif örneklerde IFAT tekniğinin bulguları, IBDV infeksiyonunu belirlemede standart bir yöntem olan AGID (3) ile karşılaştırılmalı olarak belirlendi. FAT ve IFAT'ın, AGID'e göre spesifite ve sensitivitesinin %100 olduğu hesaplandı. Allan ve ark (2), IBD'nin teşhisinde bursa Fabricius'tan hazırlanan preparatlarda direkt immunfloresan tekniğini, direkt elektron mikroskopi (EM), embriyolu tavuk yumurtaları (ETY) ve civciv embriyo fibroblast (CEF) kültürlerinde virus izolasyonu ile karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar, virulent bir suşla

yapılan deneysel enfeksiyonda, immunfloresan tekniğinin, virus izolasyonu ve EM tekniğinden daha sensitiv olduğunu; avirulent suşla yapılan deneysel enfeksiyonda ise immunfloresan tekniği ile virus izolasyonunun eşit oranda sensitiv olduğunu ve bu iki yöntemin EM tekniğinden daha sensitiv olduğunu bildirmişler ve saha enfeksiyonlarında ise, immunfloresan tekniğinin, virus izolasyonu ve EM tekniğinden daha sensitiv ve ayrıca histopatolojik teşhise iyi bir korelasyonunun saptandığını açıklamışlardır. Pala ve Türe (14), bursa Fabricus'lardan hazırlanan tuşe ve sürme preparatlarda IF ve IP ile hastalığın teşhisini gerçekleştirmişler ve sonuçta preparat hazırlama ve teşhis yöntemleri arasında bir fark bulamamışlardır. Bu çalışmada, diğer araştırmacıların karşılaştırma amacıyla kullanıldıkları teknikler kullanılmadığından dolayı herhangi bir değerlendirme yapılmamıştır. Ancak, bu çalışmada elde edilen bulgular, diğer araştırmacılarının sonuçlarında elde ettikleri IF tekniğinin, IBDV enfeksiyonlarını saptamada etkin bir yöntem olduğu bulgularını destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, IBD'nin çabuk teşhisinde direkt ve indirekt FAT'nin güvenle kullanılabilmesi ortaya konuldu. Bu tekniklerin teşhis laboratuvarlarında kullanılması ile klinik IBD'nin teşhisinin yanısıra özellikle önemli ekonomik kayıplara neden olan ve immunsupresif seyirli subklinik IBD vakalarının saptanmasında avantajlar sağlayacaktır. Bu çalışmada ticari konjugat ve laboratuvarlarda hazırlanan konjugat ile gerçekleştirilen IFAT arasında herhangi bir fark bulunamadı. Bu sonuç, altyapısı uygun olan laboratuvarlarda hazırlanacak konjugatlarla IBD teşhisinin daha ucuz maliyetle gerçekleştirilebileceğini gösterdi.

Kaynaklar

1. **Akan M** (2002): *İnfeksiyöz bursal hastalık*. 169-178. In: Kanatlı Hayvan Hastalıkları. İzgür M, Akan M. (Eds), Medisan Yayınevi, Ankara.
2. **Allen, GM, McNulty MS, Connor TJ, McCracken RM, McFerran JB** (1984): *Rapid diagnosis of infectious bursal disease infection by immunofluorescence on clinical material*. Avian Pathol, **13**, 419-427.
3. **Anonim** (1996): *Infectious bursal disease (Gumboro disease)*. Chapter 3. 6. 1. In: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. OIE Lists A and B diseases of mammals, birds and bees. 3th edition, Paris.
4. **Cho BR, Synder DB, Lana DP, Marquardt WW** (1987): *An immunoperoxidase monoclonal antibody stain for rapid diagnosis of infectious bursal disease*. Avian Dis, **31**, 538-545.
5. **Cruz-Coy JS, Giambrone JJ, Panangala VS** (1993): *Production and characterization of monoclonal antibodies against variant A infectious bursal disease virus*. Avian Dis, **37**, 406-411.
6. **Goldman M, Carver RK** (1957): *Preserving fluorescein isocyanate for simplified preparation of fluorescent antibody*. Science, **126**, 839-840.
7. **Goldman M** (1968): *Fluorescent Antibody Methods*. Biogenetics Research. Academic Press, USA.
8. **Harlow E, Lane D** (1988): *Labelling antibodies with fluorochrome antibodies*. A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory.
9. **Henderson KS, Jackwood DJ** (1990): *Comparison of the dot blot hybridization assay with antigen detection assays for the diagnosis of infectious bursal disease virus infections*. Avian Dis, **34**, 744-748.
10. **Jeffrey IS** (1982): *Fluorescence microscopy*. Int Lab, **12**, 46-52.
11. **Kumar A, Rao, AT** (1993): *Immunofluorescent studies on infectious bursal disease in chickens*. Indian Vet J, **15**, 26-29.
12. **Lukert PD, Saif YM** (1991): *Infectious bursal disease*. 648-668. In: Disease of Poultry. Calnek BW (Ed). 9th ed. Iowa State University Press. Ames, Iowa. USA.
13. **Maestrone G, Coffin DL** (1964): *Study of Newcastle disease by means of fluorescent antibody technique*. Am J Vet Res, **25**, 217-223.
14. **Pala HH, Türe O** (1996): *Gumboro hastalığının immunperoksidaz ve immunfloresan teknikleri ile teşhisi*. Bornova Vet Kont Araş Enst Md Derg, **21**, 161-175.
15. **Rosales GA, Villegas P, Lukert D, Fletcher JO, Brown J** (1989): *Immunosuppressive potential and pathogenicity of a recent isolate of infectious bursal disease virus in commercial broiler chickens*. Avian Dis, **33**, 724-728.
16. **Van der Berg TP, Etteradossi N, Toquin D, Meulemans G** (2000): *Infectious bursal disease (Gumboro disease)*. Rev Sci Tech Off Int Epiz, **19**, 527-543.

Geliş tarihi: 08.06.2006 / Kabul tarihi: 05.02.2007

Yazışma adresi

Prof. Dr. Mehmet Akan
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
06110, Dışkapı/Ankara.
e-mail: akan@veterinary.ankara.edu.tr