

# Türkiye’de saptanan infeksiyöz bursal hastalık virus suşlarının RFLP ile tiplendirilmesi\*

Barış SAREYYÜPOĞLU<sup>1</sup>, Müjgan İZGÜR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

**Özet:** Bu çalışmada, Türkiye’de İnfeksiyöz Bursal Hastalığa (IBD) neden olan virusların agar jel immunodifüzyon testi (AGID) ve reverz transkripsiyon/polimeraz zincir reaksiyonu (RT/PCR) ile saptanması ve IBDV suşlarının RFLP (restriction fragment length polymorphism) analizi ile moleküler tiplendirilmesi amaçlandı. Bu amaçla, çeşitli bölgelerdeki 24 sürüye ait toplam 122 adet bursa Fabricius materyali IBDV antijenlerinin varlığı yönünden AGID testi, IBDV viral RNA’sının varlığı yönünden ise RT/PCR testi ile değerlendirildi. RT/PCR sonucunda pozitif olduğu belirlenen virus örneklerinin moleküler tiplendirilmesi, *Bst*NI, *Mbo*I ve *Ssp*I enzimlerinin kullanıldığı RFLP tekniği ile yapıldı. AGID testleri sonucunda incelenen 24 sürüye ait toplam 122 adet örneğin 102 (% 83.6)’si IBDV yönünden pozitif bulundu. Bursa Fabricius örneklerinden izole edilen RNA’lara uygulanan RT/PCR testi sonucunda, 24 sürüye ait toplam 122 adet materyalin 47 (% 38.5)’sinde viral genetik materyal saptandı. RT/PCR testiyle saptanan IBDV suşlarının RFLP analizi sonucunda birbirinden farklı moleküler yapı gösteren iki farklı virus suşu belirlendi. Bu suşların *Ssp*I enzimi ile incelenmesi sonucunda bunların Avrupa’da gözlenen yüksek virulensteki suşlarla benzer moleküler yapıya sahip oldukları ortaya kondu. Sonuç olarak, AGID testinin IBDV suşlarının rutin identifikasyonu için uygun bir test olduğu, RT/PCR-RFLP testinin ise IBDV viruslarının tiplendirilmesinde kullanılabileceği belirlendi.

Anahtar sözcükler: AGID, IBDV, moleküler tiplendirme, RT/PCR-RFLP.

## RFLP typing of infectious bursal disease virus strains detected in Turkey

**Summary:** In this study, identification of IBDVs encountered in Turkey by agar gel immunodiffusion (AGID) and reverse transcription/polymerase chain reaction (RT/PCR) test and molecular typing of IBDV strains by restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay were aimed. For this reason, a total of 122 bursa Fabricii from 24 flocks showing the symptoms of IBD, reared in the restricts of Adana, Bolu, Bursa, Çorum and Eskişehir were investigated for the existance of viral antigens and the viral RNAs by AGID and RT/PCR tests, respectively. Molecular typing of RT/PCR positive IBDV samples by RFLP analysis using *Bst*NI, *Mbo*I and *Ssp*I restriction enzymes was performed. After AGID tests, 102 (83.6 %) of 122 bursal samples from 24 flocks were found to have IBDV antigens. After RT/PCR tests, 47 (38.5 %) out of 122 bursa samples were found to have IBDV RNA while 75 (61.5 %) were not. Following RFLP analysis of RT/PCR positive samples, two different molecular patterns were detected. Following the restriction endonuclease analysis performed with *Ssp*I enzyme, these were found to have similar molecular patterns with the European very virulent IBDVs (vvIBDVs). As a conclusion, AGID test was found to be an appropriate test for the routine identification of IBDV strains from bursa samples and RT/PCR-RFLP test could be used for the molecular typing of IBDV virus strains in Turkey.

Key words: AGID, IBDV, molecular typing, RT/PCR-RFLP.

## Giriş

İnfeksiyöz Bursal Hastalık (IBD), tüm dünyada genç yaştaki tavuklarda depresyon, ölüm ve immun-supresyona neden olan önemli viral bir hastalıktır. Hastalıkta ortaya çıkan ekonomik kayıpların boyutları, özellikle, immunsupresif seyirli formda sekonder etkenlerin de işe karışmasıyla ortaya çıkan ölüm, aşı yetersizlikleri ve verim kayıpları nedeniyle daha dikkat çekicidir. Türkiye’de IBD tüm dünyada olduğu gibi önemli kayıplara neden olmaktadır.

IBDV suşlarının moleküler karakterizasyonunda RFLP’nin kullanıldığı birçok çalışma bulunmaktadır (9, 10, 17, 25, 29). Bu çalışmaların çoğunda VP2 geni hedef

alınmasına karşın, amplifiye edilen VP2 geni bölgeleri farklılık göstermektedir. VP2 proteininin IBDV suşları arasında görülen varyasyonların çoğundan sorumlu olduğu bilinmektedir (2). Özellikle, VP2 geni üzerinde, IBDV suşlarının genetik gruplara ayırt edilmesine olanak sağlayan 762-1151. nukleotidler arasında yer alan çok değişken bölge belirlenmiştir (3, 8). Son yıllarda, Jackwood ve Sommer (11), bu çok değişken bölgeyi de içeren 743 bp’lik bir bölgenin RT/PCR ile amplifikasyonunu takiben RFLP’sine dayanan ve IBDV suşları arasında moleküler tiplendirmeye olanak sağlayan bir metot geliştirmiştir. Amplifiye edilen bu bölge *Bst*NI ve *Mbo*I enzimlerine spesifik birden fazla retsriksiyon böl-

\* Aynı başlıklı doktora tezinden (Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü) özetlenmiştir.

geleri içermektedir. Bu nedenle de yapılan RE analizleri sonucunda farklı bant paternleri oluşmakta ve böylelikle de IBDV'lerin RFLP yöntemi ile tiplendirilmesi mümkün olmaktadır (20). Bu çalışmada, Türkiye'de IBDV'ye neden olan virusların (IBDV) AGID testi ve RT/PCR ile saptanması ve IBDV suşlarının RFLP analizi ile moleküler tiplendirilmesi amaçlandı.

## Materyal ve Metot

### Test materyali

Çalışmada, klinik olarak hastalık semptomları gösteren ticari tavukçuluk işletmelerine ait hayvanlardan toplanan ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kanatlı Hayvan Hastalıkları Rutin Teşhis Laboratuvarı'na gönderilen bursa Fabricus'lar ve ticari IBDV aşı suşları (D78, Intervet, Hollanda ve Bursine-2, Fort Dodge, ABD) test materyali olarak kullanıldı. Çalışmada kullanılan örnekler en az bir IBDV canlı aşısı ile aşılanmış sürülerden elde edildi. Ancak, anamnez verilerine göre, aşı uygulamasından en az 7 gün sonra IBD klinik semptomlarını gösteren hayvanlara ait örnekler çalışmada kullanılmak üzere seçildi.

### Agar jel immunodiffuzyon (AGID) testi

*Saha örneklerinden AGID test antijenlerinin hazırlanması:* IBDV antijeni, Takase ve ark. (24)'nin bildirdiği metoda göre hazırlandı. Laboratuvara gönderilen örneklerden, steril fosfat tamponu (PBS) ile eşit hacimde (w/v) olacak şekilde cam homojenizatörler kullanılarak bursal homojenatlar hazırlandı. Bursal homojenatlar üç kez dondurulup çözülürldükten sonra 3000 devirde 30 dakika santrifüj edildi. Supernatantlar toplanarak eşit hacimlere bölündü kullanılmaya kadar  $-40^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

*Testin uygulanması:* AGID testi, OIE'nin protokolünde bildirilen metoda (21) göre gerçekleştirildi. Daha önceden hazırlanmış olan agar (Sodyum klorür (80 g) ve fenol (5 g), Noble Agar (12.5 g), Oxoid), içeren petrilere, 6 mm çapında ve birbirinden 3 mm uzaklıkta hazırlanan gözlerden ortadaki göze bilinen pozitif antiserum (Gumboro standart AGID antiserumu, Rhone Merieux, Fransa), çevredeki gözlerle ise pozitif, negatif kontroller (Gumboro standart AGID antijenleri, Rhone Merieux, Fransa) ve de test edilecek bursal doku homojenatları eklendi. Petrilere, nemli ortamda,  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat inkube edildi. Test materyali ile pozitif serum arasında oluşan presipitat pozitif olarak değerlendirildi.

### Reverz transkripsiyon / polimeraz zincir reaksiyonu (RT/PCR)

*RNA eldesi (ekstraksiyon):* RNA izolasyonu için bursal örnekler, TNE buffer [(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA (etilendiamintetraasetikası)) içerisinde 1/10 oranında (w/v) homojenize edildikten sonra TRIAxis solüsyonu (Genaxis) ile üretici

fırma tarafından önerilen prosedüre göre muamele edildi. Örnekler 1'er ml solüsyon eklenerek homojenizatör yardımıyla homojenize edilerek vortekslendi ve örnekler oda sıcaklığında 5 dakika tutuldu. Daha sonra 200 µl kloroform eklendi, 15 saniye vortekslendi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda örnekler faz separasyonu için, soğutmalı santrifüjda,  $4^{\circ}\text{C}$ 'de, 12000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında karışım kırmızı renkli alt (fenol-kloroform fazı), beyaz renkli ara faz ve de renksiz üst sıvı faz olarak ayrıldı. Üstteki sıvı faz yeni hazırlanmış steril ependorf tüpleri içine alındı. Örnekler 0.5 ml izopropanol ilave edildi ve oda sıcaklığında 10-15 dakika kadar tutulduktan sonra 10 dakika,  $4^{\circ}\text{C}$ 'de, 12000 devirde santrifüj edilerek RNA presipite edildi. İzopropanol supernatantı dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra tüpün dibinde ve yan tarafında jel benzeri bir presipitat oluşturan RNA peleti iki kez % 75'lik etanol ile vortekslenip santrifüj edilerek yıkandı. Vakum altında ya da havada kurutmak suretiyle RNA peleti 5-10 dakika kurutuldu ve 100 µl % 90'lık dimetil sülfoksit solüsyonu içerisinde pipete edilerek çözdürüldü. RT/PCR'da kullanılmaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

*Aşı örneklerinden viral RNA izolasyonu:* Liyofilize halde bulunan aşı virusları üzerlerine 5 ml TNE solüsyonu ilave edilerek çözdürüldü. Vortekslenerek karıştırıldıktan sonra 100 µl hacim alınarak yukarıda bildirildiği şekilde TRIAxis solüsyonu kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirildi (11).

*Reverz transkripsiyon/polimeraz zincir reaksiyonu (RT/PCR):* RT/PCR prosedürü daha önceden Jackwood ve Nielsen (10)'in bildirdiği metot modifiye edilerek gerçekleştirildi. RT/PCR testinde MasterAmp RT-PCR kiti (Epicentre Technologies, Madison, WI) kullanıldı. Kiti üreten firmanın önerdiği prosedür doğrultusunda iki premiks hazırlandı. İlk premiks, DNase ve RNase enzimlerinden arı, steril bir ependorf tüpüne, örnek başına, 10 µl steril RNase ve DNase'dan arı su, 2.5 µl 20xRT-PCR buffer, 6 µl 25 Mm  $\text{MgCl}_2$ , 5 µl MasterAmp 10xPCR enhancer, 1 µl 25 Mm  $\text{MnSO}_4$  ve 0.5 µl RetroAmp RT DNA polimeraz enzimi eklenerek; ikinci premiks ise başka bir ependorf tüpüne, örnek başına, 15 µl steril su, 8 µl 2.5 mM'lık dNTP karışımı, IBDV'nin VP2 geninin 743 bp (baz çifti)'lik bölümünü spesifik olarak amplifiye eden 700-5' ve 700-3' primerlerinden (Dr. Daral Jackwood, Ohio State University, ABD) 0.125 µl primer 1 (700-5'), 0.125 µl primer 2 (700-3') eklenerek hazırlandı. Daha sonra PCR tüplerine 25 µl hacimde premiks 1 ve 23.25 µl hacimde premiks 2 eklendi. RT/PCR karışımı bu şekilde hazırlandı. Son olarak % 90'lık dimetil sülfoksit solüsyonu içerisinde süspanse halde bulunan, 1.750 µl'lik hacimlik viral RNA bu karışımına eklendi. Thermal cycler (Genius, Techne)  $60^{\circ}\text{C}$ 'ye ısıtıldıktan sonra örnekler konuldu.  $60^{\circ}\text{C}$ 'de 21

dk'lık reverz-transkripsiyon (RT) aşamasını takiben polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'na geçildi. PCR inkubasyon sıcaklıkları ve süreleri sırasıyla, 95°C'de 30 s denatürasyon, 52°C'de 30 s primer bağlanması ve 72°C'de 60 s ekstansiyon şeklinde toplam 35 siklusa gerçekleştirildi. Son siklusu takiben 72°C'de 7 dk'lık bir son ekstansiyon aşamasının ardından örnekler agaroz jel elektroforezinde inceleninceye kadar 4°C'de, daha uzun süreli kullanım için ise -20°C'de saklandı. RT/PCR amplikonlarına, % 1.5'lük agaroz jelde 100 volt'ta 80 dk elektroforez işlemi uygulandı. Jeller UV-transilluminatör'da incelenerek UV-filtreli polaroid fotoğraf makinası (Kodak) ile fotoğraflandı.

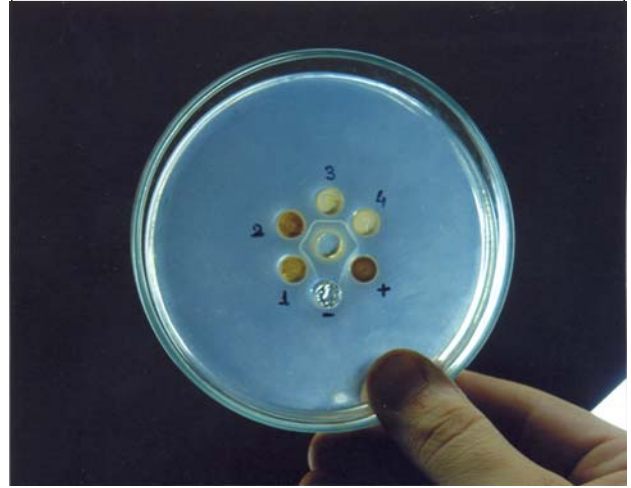
### Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analizi

RT/PCR ürünleri *Bst*NI (New England BioLabs, İngiltere), *Mbo*I ve *Ssp*I (Fermentas, Litvanya) restriksiyon enzimleriyle (RE) kesilerek incelendi. *Bst*NI ve *Mbo*I enzimleri virüsleri moleküler gruplara ayıracak olan RFLP paternlerinin oluşturulması için kullanılırken, *Ssp*I enzimi ise IBDV'larının çok virulent (very virulent IBDV, vvIBDV) suşlarının belirlenmesinde kullanıldı (11). RT/PCR ile spesifik olarak amplifiye edilen fragmentlerin RE'ler ile kesiminde, öncelikle her bir örnek için, 1 µl RE enzimi, 2 µl 10x RE buffer ve 9 µl DEPC'li steril sudan oluşan RE karışımı hazırlandı. Hazırlanan RE karışımları DNase ve RNase enzimleri içermeyen PCR tüplerine 12'şer µl'lik hacimlerde dağıtıldı. Üzerlerine, 8 µl RT/PCR ürünü eklendi (26). RE'ler ile enzimatik kesimin gerçekleşmesi için tüpler 1 saat 37°C'de inkube edildi. Daha sonra örnekler 20 dk 65°C'de inkube edilerek enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi. RE'lerden *Bst*NI, karışım içerisine bovine serum albumin (BSA) suplementi katılmasını gerektirmesi, bu enzim ile enzimatik kesimin 60°C'de gerçekleşmesi ve ısı inaktivasyonuna gereksinim göstermemesi açısından diğer enzimlerden farklı bir metotla hazırlandı. RE'lerle muamele sonrasında, 10 µl'lik hacimdeki örnekler, ethidium bromide içeren % 2.5'lük agaroz jelde (Basica Le Agarose, Prona) 100 volt (V)'ta 1.5 saat koşturularak oluşan restriksiyon fragmentleri görüntüldü.

## Bulgular

### Agar jel immunodiffüzyon test sonuçları

IBD şüpheli hayvanlardan toplanan 122 adet bursa Fabricius örneğinde IBDV antijenlerini belirlemeye yönelik yapılan AGID testleri sonucunda incelenen 24 sürüye ait toplam 122 adet örneğin 102'si (% 83.6) IBDV yönünden pozitif bulundu. Yirmi (% 16.4) örnekte ise viral antijene rastlanmadı (Şekil 1). Sürü bazında ele alındığında, 24 adet sürünün 20'sinde (% 83.3) IBDV saptanırken, 4 sürüde (% 16.7) ise IBDV antijenine rastlanmadı.



Şekil 1. AGID testinde pozitif saha örneklerine ait presipitat çizgileri. -, Negatif kontrol, +, Pozitif kontrol, 1-4. Bursa bölgesine ait saha örneklerinden hazırlanan antijenler.

Figure 1. Precipitate lines of IBDV positive field samples in AGID test. -, Negative control, +Positive control, 1-4. Antigens prepared from field samples from Bursa region.



Şekil 2. RT/PCR testi sonuçları. M. Moleküler ağırlık marker (phiX174 DNA-Hae III Digest, New England BioLabs, İngiltere) -. Negatif kontrol, +, Pozitif kontrol, 11, 12, 13, 14, 15. Bursa bölgesine ait sürülerden elde edilen RNA'ların RT/PCR sonuçları.

Figure 2. RT/PCR test results. M. DNA ladder (phiX174 DNA-Hae III Digest, New England BioLabs, UK) -. Negative control, +, Positive control, 11, 12, 13, 14, 15. RT/PCR results of RNAs obtained from flocks in Bursa region.

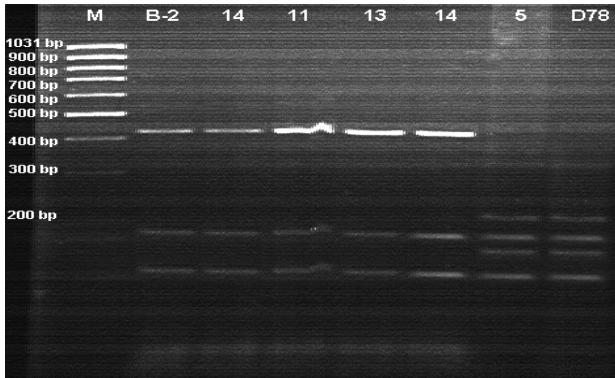
### RT/PCR test sonuçları

Çalışmada, 24 sürüye ait toplam 122 adet materyalin 47'sinde (% 38.5) viral genetik materyal saptandı. Yetmiş beş (% 61.5) örnek ise IBDV RNA'sı yönünden negatif bulundu. Sürü bazında ele alındığında, 24 adet sürünün 9'unda (% 37.5) IBDV viral RNA'sı saptanırken, 15'inde (% 62.5) IBDV viral RNA'sına rastlanmadı (Şekil 2).

AGID testi ile RT/PCR test sonuçları tablo 1'de gösterilmiştir. Tablo incelendiğinde, AGID testi ile 20 sürüye ait örneklerde viral antijene rastlanırken, RT/PCR testi ile 9 sürünün IBDV RNA'sını içerdiği bulundu. İncelemeye alınan sürülerden 4 tanesinin hem AGID testi

Tablo 1. AGID ve RT/PCR test sonuçları.  
Table 1. AGID and RT/PCR test results.

Sürü No.	Örneklerin gönderildiği bölge	Alınan örnek sayısı	Yetiştirme Tipi (broiler, yumurtacı, damızlık)	Yaş (gün)	AGID Test Sonuçları	RT/PCR Test Sonuçları
1	Bolu	5	broiler	33	+	-
2	“	5	“	30	+	-
3	“	5	“	30	+	-
4	“	5	“	30	-	-
5	“	5	“	30	+	+
6	“	5	“	33	+	-
7	“	5	“	28	+	-
8	“	5	“	26	+	-
9	“	5	“	32	-	-
10	“	5	“	22	+	+
11	Bursa	5	“	34	+	+
12	“	5	“	18	+	-
13	“	5	“	24	+	+
14	“	5	“	26	+	+
15	“	5	“	30	+	-
16	“	5	“	25	+	+
17	“	5	“	21	+	-
18	“	5	“	22	+	+
19	“	5	“	24	+	+
20	“	5	“	30	+	-
21	Adana	7	broiler	32	+	+
22	Çorum	5	yumurtacı	22	+	-
23	Eskişehir	5	broiler	30	-	-
24	Eskişehir	5	broiler	30	-	-



Şekil 3. Saha ve aşı suşlarının *Bst*NI enzimi kullanılarak elde edilen RFLP paternleri. M. moleküler ağırlık marker (GeneRuler, 100bp DNA Ladder, Fermentas Litvanya), B-2. Bursine-2 aşı suşu, D78. D78 aşı suşu, 11, 13, 14. Bursa bölgesinde saptanan saha suşları, 5. Bolu bölgesinde saptanan saha suşu.

Figure 3. RFLP patterns of field and vaccine strains after *Bst*NI digestion. M. GeneRuler, 100bp DNA Ladder, Fermentas Lithuania, B-2. Bursine-2 vaccine strain, D78. D78 vaccine strain, 11, 13, 14. Field strains detected in Bursa 5. Field strain detected in Bolu.

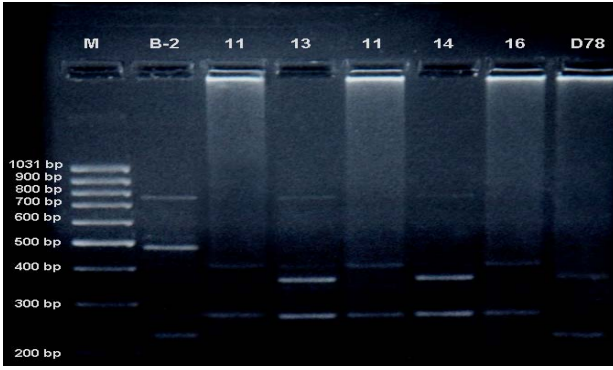
hem de RT/PCR testi ile IBDV antijeni ve IBDV RNA'sı yönünden negatif olduğu belirlendi.

#### Virusların RFLP ile moleküler karakterizasyon sonuçları

Adana bölgesinden sağlanan ve RT/PCR testiyle IBDV RNA'sı içerdiği belirlenen örnekler RFLP için yeterli yoğunlukta nukleik asit içermediklerinden dolayı değerlendirmeye alınmadı.

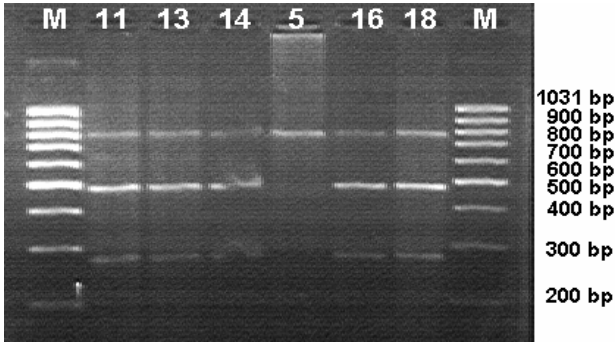
*Bst*NI ile gerçekleştirilen enzimatik kesim sonucunda, Bursa yöresindeki sürülere ait örneklerden amplifiye edilen RT/PCR ürünlerinden sırasıyla, 424, 172 ve 119 baz çiftlik (bp) bantlar elde edildi. Aşı örneklerinden, Bursine-2 aynı büyüklükte bantlar oluştururken, Bolu bölgesindeki 5 ve 10 no'lu sürülerde belirlenen saha suşları ve D78 suşu ise sırasıyla 209, 172, 154, 119 bp'lik 4 bant oluşturdu (Şekil 3).

*Mbo*I ile gerçekleştirilen enzimatik kesim sonucunda, Bursa'daki sürülere ait örneklerden RFLP analizi sonucunda farklı bant paternleri elde edildi. Onbir ve 16 no'lu sürüye ait örneklerde 403 ve 269 bp'lik 2 bant oluştu. Onüç, 14, 18, ve 19. sürülere ait ürünlerde ise 362 ve 269 bp büyüklüğünde 2 bant elde edildi. Aşı suşlarının



Şekil 4. Saha ve aşı suşlarının *MboI* enzimi kullanılarak elde edilen RFLP paternleri. M. moleküler ağırlık marker (GeneRuler, 100bp DNA Ladder, Fermentas Litvanya), B-2. Bursine-2 aşı suşu, D78. D78 aşı suşu, 11, 13, 14, 16. Bursa bölgesinde saptanan saha suşları.

Figure 4. RFLP patterns field and vaccine strains after *MboI* digestion. M. GeneRuler, 100bp DNA Ladder, Fermentas Lithuania, B-2. Bursine-2 vaccine strain, D78. D78 vaccine strain, 11, 13, 14, 16. Field strains detected in Bursa region.



Şekil 5. Saha suşlarının *SspI* enzimi kullanılarak elde edilen RFLP paternleri. M. moleküler ağırlık marker (GeneRuler, 100bp DNA Ladder, Fermentas Litvanya), 11, 13, 14, 16, 18. Bursa bölgesinde saptanan saha suşları, 5. Bolu bölgesinde saptanan saha suşu.

Figure 5. RFLP patterns field strains after *SspI* digestion. M. GeneRuler, 100bp DNA Ladder, Fermentas Lithuania, B-2. Bursine-2 vaccine strain, D78. D78 vaccine strain, 11, 13, 14, 16, 18. Field strains detected in Bursa region. 5. Field strain detected in Bolu region.

dan Bursine-2'ye ait ampliconların enzimatik analizinde 480 ve 229 bp'lik 2 adet bant oluşurken, D78 suşu 362 ve 229 bp'lik 2 bant oluşturdu (Şekil 4). Bolu bölgesine ait 5 ve 10 no'lu sürülere ait örnekler ise *MboI* enzimi ile RFLP sonucunda D78 aşı suşuyla benzer bant paternleri gösterdi.

Bursa yöresindeki, 11, 13, 14, 16, 18 ve 19 nolu sürülere ait saha örneklerinin *SspI* ile gerçekleştirilen enzimatik kesimi sonucunda, 470 bp'lik ve 273 bp'lik 2 fragment şekillendi. Oluşan bant paternleri incelendiğinde saha suşları arasında bir farklılık gözlenmedi. Bolu bölgesindeki 5 ve 10 no'lu sürülere ait örneklerde ise *SspI* enzimine spesifik bölgeye rastlanılmadı. Bu bulgulara göre incelenen Bursa orijinli IBDV saha suşlarının yüksek virulense sahip olduğu (vvIBDV) belirlendi (Şekil 5).

RT/PCR ile saptanan IBDV suşlarına ait RFLP paternleri tablo 2'de topluca gösterilmiştir.

Tablo 2'deki RT/PCR-RFLP sonuçları incelendiğinde, Bursa bölgesinden alınan örneklerin RT/PCR-RFLP analizi sonucunda, bölgede birbirinden farklı iki saha suşunun bulunduğu belirlendi. Bu suşlar *BstNI* enzimi ile yapılan RE analizi sonucunda benzer bant paternleri gösterirken, *MboI* enzimi ile gerçekleştirilen enzimatik kesim sonucunda oluşan bantlar iki suşun birbirinden ayırt edilmesini sağladı. Her iki saha virusunun da vvIBDV suşlarında görülen fenotipi belirlemeye yarayan *SspI* enzim bölgesi içerdiği yapılan enzimatik analiz sonrasında ortaya kondu. Bursa bölgesinden elde edilen örnekler yaygın olarak kullanılan aşı viruslarından farklı moleküler yapı gösterdi. Ayrıca bu iki saha suşu aynı metotla daha önce yurtdışında incelenen diğer saha izolatlarından farklı moleküler yapı ortaya koydu. Bolu bölgesine ait sürülerden sağlanan örneklerin RT/PCR-RFLP sonuçları incelendiğinde D78 aşı suşuyla benzer paternleri görüldü. Bu saha suşunun *SspI* enzimi ile gerçekleştirilen RE analizi sonrasında *SspI*'e spesifik restriksiyon bölgesine rastlanılmadı.

Tablo 2. RT/PCR pozitif saha örnekleri ve aşı suşlarının RFLP paternleri.

Table 2. RFLP patterns of RT/PCR positive field and vaccine strains after *BstNI*, *MboI* and *SspI* digestion.

Virüslerin Kaynağı	RT/PCR-RFLP Sonuçları											
	<i>BstNI</i>				<i>MboI</i>				<i>SspI</i>			
	424	209	172	154	119	480	403	362	269	229	470	273
11. ve 16. sürü	X		X		X		X		X		X	X
13. ve 18. sürü	X		X		X			X	X		X	X
14. ve 19. sürü	X		X		X			X	X		X	X
5. ve 10. sürü		X	X	X	X			X		X	-	-
D-78 (aşı)		X	X	X	X			X		X	-	-
Bursine-2 (aşı)	X		X		X	X				X	-	-

### Tartışma ve Sonuç

Dünyada IBD'nin teşhisinde, IBDV spesifik viral antijenlerin saptanmasında AGID testi, direkt fluoressan antikor tekniği, immunperoksidaz boyama tekniği, monoklonal antikorların kullanıldığı antigen-capture ELISA kullanılırken, viral genomun belirlenmesinde ise P<sup>32</sup>, biotin ve digoxigenin ile işaretli proplar, RT/PCR testinden faydalanılmaktadır (18, 23, 27, 28). Türkiye'de ise, embriyolu yumurta, hücre kültürü, AGID ve elektron mikroskopi, (EM) immunperoksidaz (IP) ve immunfloresan (IF) gibi tekniklerle IBDV'ler teşhis edilmiş (4, 6, 22), serolojik olarak sahada AGID, nicel AGID (QAGPT) ve enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) testlerinden yararlanılmıştır (1).

Bu çalışmada, AGID testi sonucunda, 18-34 günlük broiler ve yumurtacı sürülerden sağlanan 122 adet örneğin 102'si (% 83.6) IBDV antijeni yönünden pozitif bulundu. Sürü bazında ele alındığında, 24 sürünün 20'sinde (% 83.3) IBDV saptandı. Çöven ve Çarlı (5)'nin yaptıkları çalışmada, Manisa, İzmir, Bursa, İstanbul, Ankara ve Konya yörelerindeki işletmelerde klinik olarak Gumboro hastalığından şüpheli 174 sürünün 143'ü (% 82.1) AGID testi ile IBD yönünden pozitif bulunmuştur. Araştırmacılar, hastalığın, 12-55 günlük ticari broiler ve yumurtacı sürülerde görüldüğünü bildirmişlerdir. McFerran ve ark. (19)'nın yaptığı bir çalışmada D78 antiserumu kullanılarak yapılan AGID testi ile incelenen 174 sürünün 139 (% 79)'unda bursa Fabricius'ta viral antijenin varlığı saptanmıştır. Tez kapsamında sunulan bu çalışmada, AGID test bulguları diğer araştırmacıların bulgularıyla paralellik göstermektedir.

RT/PCR testi Jackwood ve ark. (14)'nin bildirdiği yöntemle göre gerçekleştirildi. RT/PCR testi sonucunda, incelemeye alınan 13 sürüye ait toplam 122 adet materyalin 47'sinde (% 38.5) viral genetik materyal saptandı. Sürü bazında ele alındığında, 24 adet sürünün 9'unda (% 37.5) IBDV viral RNA'sı saptandı. Jackwood ve Nielsen (10), RT/PCR testi ile, klinik olarak IBD şüphesi gösteren hayvanlardan sağlanan 151 adet örneğin 48'inde (% 31.7) IBDV RNA'sı saptamışlardır. Araştırmacılar, pozitif örneklerin 3. ve 4. haftalardaki sürülerden olduğunu bildirmişler ve bu bulguyu bu yaştaki hayvanlarda maternal antikor düzeylerindeki azalma olarak açıklamışlardır. Bu çalışmada ise, RT/PCR testi ile 22-34 günlük piliçlere ait bursa Fabricius'larda IBDV RNA'sı saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar, hastalığa karşı yaş duyarlılığı açısından daha önce yapılan çalışmalara benzerlik göstermiştir.

Bu çalışmada, BsrNI ile gerçekleştirilen enzimatik kesim sonucunda, Bursa yöresinden gönderilen saha örnekleri ve Bursine-2 aşı suşu arasında şekillenen bant paternleri yönünden farklılık saptanmadı. D78 aşı suşunun moleküler incelenmesinde ise 172 ve 119 bp'lik

bantlar diğer suşlarla benzerlik gösterirken 424 ve 119 baz çiftlik farklı iki bant yapısı görüldü. Bolu bölgesindeki iki sürüye ait bant paternlerinin D78 suşu ile aynı yapıyı göstermesi, sahada hastalık vakalarından elde edilen suşların da aynı moleküler yapıya sahip olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada, saha suşları ve aşı suşlarının *MboI* restriksiyon enzimi ile muamelesi sonrasında, Bursa yöresindeki sürülere ait örneklerden amplifiye edilen RT/PCR ürünlerinin RFLP analizi sonucunda farklı bant paternleri elde edildi. Oluşan RFLP paternleri incelendiğinde, Bursa yöresindeki 6 sürüden 4'ünün (13, 14, 18 ve 19 nolu sürüler) benzer bant paternleri gösteren saha suşlarıyla infekte olduğu söylenebilir. Bu, aynı saha suşunun sürülerden birinden diğerine bulaştığını göstermektedir. Onbir ve 16 no'lu sürülere ait örneklerin bant paternleri incelendiğinde ise bu sürülerde farklı bir suşun infeksiyona yol açmış olabileceği görülmektedir. Bu bulgular, aynı bölgede birbirinden farklı 2 virus suşunun bulunduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, aşı suşlarının saha suşlarından farklı moleküler yapı göstermesi bu suşlarla gerçekleştirilen aşılama çalışmalarının hayvanları mevcut saha suşlarına karşı korumada etkisiz kalabileceğini düşündürmektedir. Türe ve ark. (26)'nın, ABD'de gerçekleştirdikleri çalışmada, Türkiye'de izole edilen 2 saha suşuna (OA, OE) ait moleküler yapı (*MboI* enzimi ile 362 ve 229 bp'lik 2 bant oluşumu) Bursa bölgesindeki saha izolatlarından farklılık göstermiştir. *SspI* enzimi ile gerçekleştirilen RE analizi sonrasında ise OA ve OE suşlarının vIBDV olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada da Bursa bölgesindeki sürülerden sağlanan örneklerin incelenmesi sonucunda da *SspI* pozitif suşlar belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, Türkiye'de Avrupa'da sıkça saptanan yüksek virulense sahip suşların bulunduğu verilerini doğrular niteliktedir.

Jackwood ve Sommer (11), serotip 1 viruslarından olan, 13 adet aşı ve 5 IBDV suşunu RT/PCR-RFLP analizi ile inceleyerek 5 farklı moleküler gruba ayırmıştır. Aynı araştırmacıların takip eden çalışmasında, RT/PCR-RFLP testi ile 38 aşı ve laboratuvar suşu 5 farklı moleküler gruba ayrılmıştır. Bu çalışmada, ABD'nin çeşitli eyaletlerinde gözlenen IBD salgınlarında toplanan bursa Fabricius örnekleri de incelemeye alınmıştır. Araştırmacılar, ABD saha suşlarının moleküler karakterizasyonu sonucunda ülke çapında, 5 moleküler gruptan farklı 19 değişik RFLP profili (farklı moleküler yapılar) belirlemişlerdir (12). Sunulan bu çalışmada, Bursa bölgesinde birbirinden farklı iki moleküler yapı belirlendi. Bu yapılar Jackwood ve Sommer (12)'in çalışmasındaki, Texas, Arkansas ve Arizona'da belirlenen suşlara ait yapılar ile benzerlik (Texas'takiler Bursa 11 ve 16 nolu sürülere ait örneklerle, Arkansas ve Arizona'dakiler Bursa 13, 14, 18 ve 19 nolu sürülere ait örneklerle) göstermiştir. Ancak

*SspI* enzimi ile gerçekleştirilen RFLP sonuçları karşılaştırıldığında, ABD'deki suşlar *SspI* negatif iken Türkiye'de saptananların *SspI* pozitif olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, Türkiye'de saptanan IBDV suşları vvIBDV'lerde rastlanan *SspI* RE bölgesi içermelerinden dolayı yeni ve farklı moleküler yapı göstermiştir. ABD'de yüksek virulense sahip suşların görülmemesi, bunların Avrupa, Ortadoğu, Asya ve Afrika'da görülmesi bu bulguları desteklemektedir.

Jackwood ve Sommer'ın (12, 13) izleyen çalışmaları sonucunda moleküler grup sayısı 6'ya çıkmıştır. Altıncı gruptaki IBDV'ler, vvIBDV'lerden oluşmaktadır. Yüksek virulense sahip olan IBDV suşlarının hepsinde *SspI* restriksiyon bölgesi bulunduğu farklı araştırmacılar tarafından daha önce de bildirilmiştir (9, 16). Ancak, bazı vvIBDV'lerde (88180 ve HK406) bu bölge saptanmamıştır (7, 15). Bu çalışmalar sonucunda, *SspI* bölgesi, yüksek virulens gösteren suşların belirlenmesinde bir genetik marker olarak düşünülmektedir. Ancak, IBDV suşlarının bu özelliği in vivo çalışmalarla konfirme edilmelidir. Sunulan çalışmada, Türkiye'de saptanan virusların *SspI* enzimi ile vvIBDV oldukları belirlenmesine karşın, RFLP paternleri daha önce bildirilen bu 6 gruptaki viruslarla karşılaştırıldığında tüm viruslardan farklı moleküler yapılar gösterdikleri belirlendi.

Bu çalışmada, bursa Fabricius'larda IBDV'lerin saptanmasında iki farklı yöntem olan AGID ve RT/PCR testleri kullanıldı. Bu iki testin kullanım amaçlarının farklı olması nedeniyle bu çalışmada AGID ve RT/PCR test sonuçları karşılaştırılmamıştır. AGID testi daha çok sürü taramalarında, enfeksiyona yol açan IBDV'lerin laboratuvar teşhisinde kullanılan ve OIE tarafından önerilen bir testtir (21). Bu çalışma sonucunda AGID testiyle gönderilen örneklerin çoğunda (% 83.6) IBDV antijenlerinin saptanması bu öneriyi doğrular niteliktedir. RT/PCR ise daha çok gelişmiş laboratuvarlarda IBDV'lerin direkt teşhisinde ve tiplendirilmesinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, RT/PCR testiyle bursa Fabricius'larda IBDV'lere ait viral genetik materyalin saptanma yüzdesi AGID sonuçlarına göre düşük (% 38.5) bulunmuştur. Ancak, RT/PCR testini etkileyen birden çok faktör (bazı dokularda RT/PCR'ı inhibe eden faktörlerin olması, RNA izolasyon yönteminin etkinliği, kullanılan enzimler, örnek kontaminasyonu, örneklerin alınma ve laboratuvara gönderilme şekli, örneklerdeki viral RNA miktarı vb.) bulunmaktadır. Bu çalışma sonucunda elde edilen bulgulara dayanarak, uygulama kolaylığı ve maliyeti de düşünüldüğünde AGID testinin IBDV'lerin rutin teşhisi yönünden uygun bir test olduğu düşünülmektedir. RT/PCR testi ise rutin teşhisten daha çok moleküler tiplendirme çalışmaları (RE analizi, RFLP, nukleotid sekans analizleri, southern blotting, vb.) için başvurulacak bir test niteliğindedir.

## Kaynaklar

1. **Ası Y, İyisan AS** (1991): *İnfeksiyöz bursal disease'e (IBD, Gumboro) karşı aşıli etçi piliçlerde ELISA yöntemi ile antikor düzeyinin saptanması ve QAGP yöntemi ile karşılaştırılması*. Pendik Hay Hast Merk Araşt Enst Derg, **22**, 107-121.
2. **Bayliss CD, Spies U, Shaw K, Peters RW, Papageorgion A, Müller H, Bournnell MEG** (1990): *A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2*. J Gen Virol, **71**, 1303-1312.
3. **Brown MD, Green P, Skinner MA** (1994): *VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical strains'*. J Gen Virol, **75**, 675-680.
4. **Çöven F** (1995): *Broyler ve Yumurtacı Tavuklarda Gumboro (Infectious Bursal Disease) Hastalığının İnsidensi ve Virus İzolasyonu*. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Doktora Tezi. s. 66.
5. **Çöven F, Çarlı T** (1997): *Türkiye'de broiler ve yumurtacı tavuklardan infectious bursal disease virusunun izolasyon ve identifikasyonu*. Pendik Vet Mikrobiyol Derg, **28**, 141-152.
6. **Ergün A** (1995): *Klinik ve Subklinik Gumboro Vakalarından Virus İzolasyonu ve Serotiplendirilmesi*. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Doktora Tezi. s. 72.
7. **Etteradossi N, Arnauld C, Tekai F, Toquin D, Le Coq H, Rivallan G, Guittet M, Domenech J, van den Berg TP, Skinner MA** (1999): *Antigenic and genetic relationships between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate*. Avian Pathol, **28**, 36-46.
8. **Heine H, Haritou M, Failla P, Fahey K, Azad A** (1991): *Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains*. J Gen Virol, **72**, 1835-1843.
9. **Hoque MM, Omar AR, Chong LK, Hair-Bejo M, Aini I** (2001): *Pathogenicity of SspI-positive infectious bursal disease virus and molecular characterization of the VP2 hypervariable region*. Avian Pathol, **30**, 369-380.
10. **Jackwood DJ, Nielsen CK** (1997): *Detection of infectious bursal disease viruses in commercially reared chickens using the reverse transcriptase/polymerase chain reaction endonuclease assay*. Avian Dis, **41**, 137-143.
11. **Jackwood DJ, Sommer SE** (1997): *Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses*. Avian Dis, **41**, 627-637.
12. **Jackwood DJ, Sommer SE** (1998): *Genetic heterogeneity in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses detected in commercially reared chickens*. Avian Dis, **42**, 321-339.
13. **Jackwood DJ, Sommer SE** (1999): *Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States*. Avian Dis, **43**, 310-314.
14. **Jackwood DJ, Jackwood RJ, Sommer SE** (1997): *Identification and comparison of point mutations associated in classic and variant infectious bursal disease viruses*. Virus Res, **49**, 131-137.

15. **Lim BL, Cao Y, Yu T, Mo CW** (1999): *Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2*. J Virol, **73**, 2854-2862.
16. **Lin Z, Kato A, Otaki Y, Nakamura T, Sasmaz E, Ueda S** (1993): *Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan*. Avian Dis, **37**, 315-323.
17. **Liu HJ, Giambone JJ, Dormitorio T** (1994): *Detection of genetic variations in serotype I isolates of infectious bursal disease virus using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis*. J Virol Methods, **48**, 281-291.
18. **Lukert PD, Saif YM** (1997): *Infectious bursal disease*. 721-738. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM (Eds.): *Diseases of Poultry*. 10th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
19. **McFerran JB, McNulty MS, McCillop E, Corner TJ, McCracken RM, Collins DS, Allan G** (1980): *Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks, demonstration of a second serotype*. Avian Pathol, **9**, 395-404.
20. **Meir R, Jackwood DJ, Weisman Y** (2001): *Molecular typing of infectious bursal disease virus of Israeli field and vaccine strains by the reverse transcription/polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism assay*. Avian Dis, **45**, 223-228.
21. **Office International Des Epizooties (OIE)** (2000): *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. 4th Ed. OIE, Paris.
22. **Pala HH, Türe O** (1996): *Gumboro hastalığının immunperoksidaz ve immunfloresan teknikleri ile teşhisi*. Bornova Vet Kontr Araşt Enst Md Derg, **21**, 161-175.
23. **Rosenberger JK** (1989): *Infectious bursal disease*. 165-166. In: HG Purchase, LH Arp, CH Dommermuth, JE Pearson (Eds.): *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens* 3rd Ed. Kennett Square, American Association of Avian Pathologists.
24. **Takase K, Uchimura T, Katsuki N, Yamamoto M** (1993): *Agar gel precipitin line patterns and pathogenicity of infectious bursal disease viruses*. J Vet Med Sci, **55**, 137-139.
25. **Tham KM, Young LW, Moon CD** (1995): *Detection of infectious bursal disease virus by reverse-transcription-polymerase chain reaction amplification of the virus segment A gene*. J Virol Meth, **53**, 201-212.
26. **Türe O, Saif YM, Jackwood DJ** (1998): *Restriction length polymorphism analysis of highly virulent strains of infectious bursal disease viruses from Holland, Turkey, and Taiwan*. Avian Dis, **42**, 470-479.
27. **Van den Berg TP** (2000): *Acute infectious bursal disease in poultry: a review*. Avian Pathol, **29**, 175-194.
28. **Van den Berg TP, Etteradossi N, Toquin D, Meulemans G** (2000): *Infectious Bursal Disease (Gumboro Disease)*. Rev Sci Tech Off İnt Epiz, **19**, 527-543.
29. **Zierenberg K, Nieper H, van den Berg TP, Ezeokoli CD, Vob M, Müller H** (2000): *The VP2 variable region of African and German isolates of infectious bursal disease virus: comparison with very virulent, "classical" virulent, and attenuated tissue culture-adapted strains*. Arch Virol, **145**, 113-125.

Geliş tarihi: 28.09.2005 / Kabul tarihi: 25.10.2005

**Yazışma adresi:**

Dr. Barış Sareyyüpoğlu  
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,  
06110 Dışkapı/Ankara.  
e-mail: sareyyup@veterinary.ankara.edu.tr