



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TÜRKİYE’DE İNFEKSİYÖZ BRONŞİTİS VİRUSLARININ RT-PCR İLE SAPTANMASI VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Elif Macide ARAL

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU**

**ANKARA
2016**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE’DE İNFEKSİYÖZ BRONŞİTİS VİRUSLARININ
RT-PCR İLE SAPTANMASI VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Elif Macide ARAL

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU**

**ANKARA
2016**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Türkiye'de İnfeksiyöz Bronşitis Viruslarının RT-PCR ile Saptanması ve Moleküler Karakterizasyonu" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uyarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

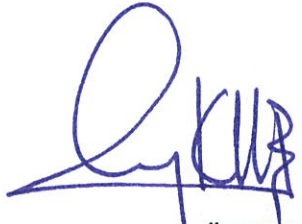
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda

Elif Macide ARAL tarafından hazırlanan "Türkiye'de Enfeksiyöz Bronşitis Viruslarının RT-PCR ile Saptanması ve Moleküler Karakterizasyonu" adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul edilmiştir

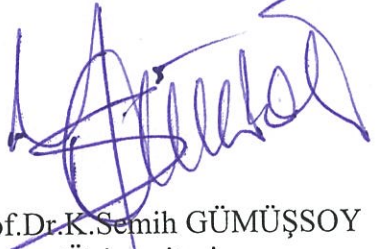
Tez Savunma Tarihi: 14.07.2016


Prof. Dr. Mehmet AKAN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Aykut ÖZKUL
Ankara Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Murat YILDIRIM
Kırıkkale Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU
Ankara Üniversitesi
Danışman


Prof. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY
Erciyes Üniversitesi
Raportör

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi

1. GİRİŞ

1.1. Tarihçe	2
1.2. Etiyoloji	5
1.3. Epidemiyoloji	11
1.4. Patogenez	15
1.5. Teşhis	18
1.5.1. IBV Laboratuvar Teşhisi	18
1.5.1.1. Virüs İzolasyonu	18
1.5.1.2. IBV Antijenlerinin Saptanmasına Dayalı Konfirmasyon	20
1.5.1.3. IBV'nin Moleküler Yöntemlerle Konfirmasyonu	21
1.5.1.4. IBV'nin Tiplendirilmesi	22
1.5.1.4.1. Serolojik Yöntemler	23
1.5.1.4.2. Genetik (Moleküler) Yöntemler	23
1.5.1.5. Serolojik Tanı	24
1.5.1.6. Ayırt Edici Tanı	25
1.6. Sağaltım	25
1.7. Koruma ve Kontrol	
1.7.1. Koruma	26
1.7.2. Aşılama ile Kontrol	26
1.7.2.1. İnaktif, Altünite ve Vektör Aşılar	28

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç	29
2.1.1. Test Materyali ve Pozitif Kontroller	29
2.1.2. Testlerde Kullanılan Tampon Solüsyonlar, Çözeltiler ve Kitler	30
2.1.3. Testlerde Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	31
2.1.4. Embriyolu Tavuk Yumurtasına (ETY) Ekilerek Kullanılan Materyaller	31

2.1.5. RT-PCR Testinde Kullanılan Primer Çiftleri	32
2.1.6. IBV Pozitif RT-PCR Ürünlerinin Dizi Analizi	32
2.1.7. Testlerde Kullanılan Pozitif Kontroller	33
2.2. Yöntem	33
2.2.1. Örneklem	33
2.2.2. Embriyolu Tavuk Yumurtasına (ETY) Ekim Yöntemi	35
2.2.3. Nested RT-PCR	36
2.2.3.1. RNA Ekstraksiyonu Öncesi Örneklerin Hazırlanması	36
2.2.3.2. RNA Eldesi (Ekstraksiyonu)	36
2.2.3.2.1. Saha Örneklerinden Viral RNA Eldesi	37
2.2.3.2.2. Aşı Örneklerinden Viral RNA İzolasyonu	38
2.2.3.3. Reverse Transkripsiyon Aşaması	38
2.2.3.4. Nükleik Asitlerin Nested-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Nested-PCR) ile Çoğaltılması	38
2.2.3.5. Nükleik Asitlerin Görüntülenmesi	42
2.2.3.5.1. Agaroz Jel Elektroforezi	42
2.2.3.5.2. Jelin Görüntülenmesi	42
2.2.4. RT-PCR Ürünlerinin Dizilendirilmesi	43
2.2.5. Dizi ve Filogenetik Analiz	45
3. BULGULAR	
3.1. ETY'ye İnokulasyon Sonuçları, Viral RNA İzolasyonu ve Primerlerin Seçimi	47
3.2. Tek Basamaklı Nested RT-PCR Test Sonuçları	48
3.3. PCR Ürünlerinin Dizilendirilmesi ve Filogenetik Analiz Bulguları	50
3.3.1. Filogenetik Analiz Bulguları	51
4. TARTIŞMA	54
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	60
ÖZET	61
SUMMARY	62
KAYNAKLAR	63
EKLER	75
Ek-1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	75
ÖZGEÇMİŞ	77

ÖNSÖZ

İnfeksiyöz Bronşitis (IB), tüm dünyada yaygın olarak görülen, akut seyirli ve bulaşıcı bir viral hastalıktır. *Coronaviridae* familyasında bulunan *Gammacoronavirus*'lerden İnfeksiyöz Bronşitis Virüsü (IBV), tavuklarda belirgin solunum sistemi semptomları yaratır ayrıca nefropatojenik suşları böbreklerde nefritise neden olur. Özellikle yumurtacı ve damızlıklarda ovidukt infeksiyonları meydana getirerek yumurta veriminde düşme, yumurta iç ve dış kalitesinde bozulmalar ve kuluçka performansında düşme görülür. Hastalık broyler sürülerde mortalitede artış ve yemden yararlanmada azalma ile ıskarta karkas oranında artışa neden olarak tavukçuluk sektöründe önemli ekonomik kayıplar yaratır. Yoğun aşılamalara rağmen sahada farklı IB virüslerinin bulunması, aşı suşlarıyla bölgesel varyant suşlar arasında çapraz koruma sağlanamaması ve virüsün yüksek mutasyon kabiliyeti virüsle mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Günümüzde tüm dünyada IB infeksiyonları yaygın olarak bulunmaktadır. Bu durum coğrafik bölgelere göre değişiklik gösteren varyant suşlara yönelik aşı programlarının oluşturulması veya yeni aşılarda üretiminin gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Kümeslerin kontrolünde sürü takibi amaçlı ve/veya aşı titrelerinin belirlenmesinde serolojik yöntemler uygulanmaya devam etmektedir ancak IBV suşlarının teşhis ve tiplendirilmesinde serolojik yöntemler yerini günümüzde genotiplendirmeye dayalı metotlara bırakmıştır.

Ülkemizde tavukçuluk yapılan her bölgede IB karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada Türkiye'nin broyler yetiştiriciliği yapılan tüm bölgelerinden örneklemeler yapılarak, şüpheli materyallerden IB'nin varlığı tek basamaklı nested-RT-PCR yöntemi ile ortaya konulup, tespit edilen virüslerin genetik materyalleri dizilendirilip moleküler olarak tiplendirilerek ülkemize ait varyant virüs suşlarının varlığını ortaya koymak amaçlanmıştır.

Doktora tez çalışmam sırasında büyük desteklerini gördüğüm danışman hocam Prof. Dr. Barış Sareyyüpoğlu ve tez izleme komitesindeki hocalarım Prof. Dr. Mehmet Akan ve Prof. Dr. Aykut Özkul başta olmak üzere, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın saygı değer öğretim üyeleri Prof. Dr. Müjgan İzgür'e, Prof. Dr. K. Serdar Diker, Prof. Dr. Hakan Yardımcı' ya, Yrd. Doçent Dr. H. Kaan Müştak'a, diğer doktora ve yüksek lisans yapan arkadaşlarıma, idari personeline teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım boyunca katkılarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim üyesi Araş. Gör. Dr. Özlem Şahan Yapıcıer'e, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Araş. Gör. Dr. Nüket Bilgen'e ve son olarak doktora sürecinde maddi manevi her türlü destekleriyle hep yanımda olan sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

AGP	Agar Gel Precipitation
APV	Avian Pneumovirus
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CRD	Chronic Respiratory Disease
DNA	Deoksiribonükleic Asid
dNTP	Deoxynucleoside Triphosphate
ddNTP	Dideoxyribonucleoside Triphosphate
E	Envelope
EDS	Egg Drop Syndrome
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ExoN	Exoribonuclease
ETY	Embriyolu Tavuk Yumurtası
FAT	Fluorescent Antibody Test
HE	Hemagglutinin Esteraz
HI	Hemagglutination Inhibition
HVR	Hyper Variable Region
IBV	Infectious Bronchitis Virus
IB	Infectious Bronchitis
ICVT	International Committee on Taxonomy of Viruses
IPA	Immunoperoxidase Assay
IU	International Unit
kDa	Kilodalton
ILT	Infectious Laringotraheitis
M	Membran
Mass	Massachusetts
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
mM	Milimolar
ND	Newcastle Disease
µl	Mikrolitre

μM	Mikromolar
ml	Mililitre
mRNA	Messenger Ribonükleic Asid
N	Nükleokapsid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nsp	Non-structural Protein
OIE	Office International des Epizooties
ORF	Open Reading Frame / Açık Okuma Alanları
PBS	Phosphate Buffered Saline
PLpro	Papain Like Protein
Rep	Replicase
RdRp	RNA depended RNA polimerase / RNA bağımlı RNA Polimeraz
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT-PCR	Reverse Transcription / Polymerase Chain Reaction
s	Saniye
S	Spike
SPF	Spesific Pathogen Free
TBE	Tris Borate EDTA
TOK	Trakeal Organ Kültürü
TCoV	Turkey Coronavirus
UTRs	Untranslated Regions
VN	Virus Neutralization

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. IBV Genom Yerleşimi, Mutasyona Açık Bölgeleri ile Viral Spike Glikoproteini ve Nükleoproteininde Meydana Gelen Değişimlerle İlişkisi.	7
Şekil 3.1. Referans Suşlar ve Bölgelerden İzole Edilen IBV Suşlarının Benzerliğini Gösteren Filogenetik Ağaç.	53



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Kullanılan Tampon Solüsyonlar, Çözeltiler ve Kitler	30
Çizelge 2.2. Testlerde Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	31
Çizelge 2.3. Kullanılan Primer Çiftleri	32
Çizelge 2.4 Kullanılan Pozitif Kontroller	33
Çizelge 2.5. Örneklenen İşletmelerin Bölge Olarak Dağılımı, Kümes Sayısı, Örnek Türü ve Pozitif Bulunan Kümes Sayısı	34
Çizelge 2.6. İki Basamaklı Reverse Transkripsiyon Bileşenleri	39
Çizelge 2.7. RT-Reaksiyon Bileşenleri ve Miktarları	40
Çizelge 2.8. RT-Reaksiyon Koşulları	41
Çizelge 2.9. Dizileme PCR Reaksiyonu Bileşenleri	44
Çizelge 3.1. IBV Pozitif Bulunan Sürülere Ait Bilgiler	49
Çizelge 3.2. Bölgelere Göre İşletmelerin Dağılımı Pozitiflik Sayıları/Materyal Sayıları ve Oranları	50
Çizelge 3.3. Örneklere ait BLAST sonuçları	51

1. GİRİŞ

İnfeksiyöz Bronşitis Virüsü (IBV), evcil kanatlıların daha çok tavukların Coronavirüsü olarak bilinir. Dünya çapında kanatlı endüstrisinde ekonomik kayba neden olan hastalıklardan birisidir. Tavuklar en önemli doğal konakçısıdır ve her yaştan tavuk etkilenmektedir. Özellikle etçi, yumurtacı ve damızlık tavuklarda solunum sistemi infeksiyonları, yumurta verim kayıpları, ovidukta fonksiyon bozukluklarına bağlı yumurta kalitesinde bozulmalara ve böbrek hasarına bağlı ölümlere sebep olmaktadır (Cavanagh, 2005; Sareyyüpoğlu, 2012; Sumi ve ark., 2012).

Hastalık, broylerlerde yavaş büyüme performansı ve yüksek mortaliteye, damızlık ve yumurtacılar yumurta veriminde düşüslere, renal hasara bağlı kayıplar ile tüm üretim şekillerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır. İnfeksiyöz bronşitis (IB) infeksiyonunun negatif etkisinden aşılama ve biyogüvenlik uygulamalarına uyarak korunmak mümkündür (Anonim).

Virüs üst solunum sistemi epiteli dışında alt solunum yollarındaki dokular, sindirim sistemi, sekal tonsiller, bursa Fabricius, ovidukt, testis ve böbrek gibi organları da etkilemektedir (Jackwood ve ark., 2012). IBV'nin bağırsak epitelinde çoğalması klinik olarak hastalık oluşturmaz, ancak hastalığın yayılmasında rol oynar. Son dönemde IBV'nin tavuklardan başka kanatlıları da infekte edebildiğini gösteren kanıtlar vardır. Hindi, sülün, bıldırcın ve kırmızı keklık gibi diğer türlerden IBV ile yakın ilişkili Coronavirüs'ler de izole edilmiştir. Ayrıca birçok farklı serotip aynı anda aynı bölgede birlikte sirküle olabilmektedir. Bazıları tüm dünyada görülürken bazıları kısıtlı coğrafik alanlarda görülmektedir. Örneğin bazı serotipler sadece Avrupa'da gözlenirken; diğerleri sadece Amerika'da bulunmaktadır (Cavanagh, 2007).

Altı haftadan küçük tavuklarda hastalığa ait tüm semptomlar gözlenir. Morbidite oranı oldukça yüksektir. Mortalite immunsupresyona, mikoplazma infeksiyonuna ve bu infeksiyona eşlik edebilen *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale* ve *Bordetella avium* gibi diğer sekonder bakteriyel infeksiyonlara bağlı olarak artış gösterebilmektedir (Cavanagh ve Gelb, 2008). İleri yaştaki tavuklarda IBV infeksiyonu hafif solunum semptomlarının yanısıra yumurtacılarda ve damızlıklarda yumurta üretiminde kayıplar meydana getirmektedir (Kameka, 2014).

Hastalık oldukça bulaşıcıdır ve kısa sürede sürü içinde yayılabilmektedir. Bulaşma sıklıkla aerosol yolla, direkt temasla ve indirekt mekanik yollarla meydana gelmektedir. IBV ile yumurtaların yüzey kontaminasyonları sonucu virus kuluçkahane ve yumurta paketleme ünitelerinde de yayılabilmektedir, ancak vertikal olarak bulaşmamaktadır (Bozkurt, 2009; Esendal 2006).

1.1. Tarihçe

İlk bildirimi 1931 yılında Schalk ve Hawn tarafından Amerika, Kuzey Dakota'da solunum semptomları gösteren 2 günlükten 3-4 haftalığa kadar yaş aralığındaki genç civcivlerde hızla bulaşan (%40-90 mortalite) bir hastalık olarak yapılmıştır. Kuşlarda üst solunum yollarında meydana gelen patolojik değişimler dikkat çekicidir. Bu yüzden hastalık genç tavukların infeksiyöz bronşiti olarak adlandırılmıştır (Schalk ve Hawn, 1937). Bundan 5 yıl sonra hastalığa neden olan ajanın virüs olduğunu Beach ve Schalm (1936) kanıtlamış ve etken infeksiyöz bronşitis virüsü olarak isimlendirilmiştir. İlk IBV izolatı Beaudette suşu, Beaudette ve Hudson tarafından 1937'de izole edilmiştir. Kuzey Dakota'da serolojik olarak Beaudette suşuyla ilişkili M41 suşunu 1975'te Bracewell izole etmiştir (Awad ve ark., 2014). Uzun bir süre ilk IBV varyant suşunun Amerika'da 1950'lerde ortaya çıktığı düşünülmüştür. Jungherr ve ark. (1956) yapmış oldukları çalışmada, 1951 yılında izole edilmiş olan Connecticut (Conn) izolatının orijinal Massachusetts

(Mass) izolatıyla çapraz ilişkili ya da çapraz nötralizasyonu bulunmadığını ortaya koymuştur. Jia ve ark. (2002) yapmış oldukları retrospektif çalışmada, 1940'lı yılların başında Amerika'da Mass-tipi IBV'lerden farklı suşların varlığını monoklonal antikör testi ve Spike (S) glikoproteininin S1 alt ünitesinin moleküler analizi sonucunda ortaya koymuştur (de Wit ve ark., 2010). Hastalığa bağlı ekonomik kayıpların fazla olması nedeniyle hastalıktan korunmaya yönelik çalışmalar 1941 yılında van Roekel tarafından başlatılmış ve bu aşılama programlarının başlangıcı olmuştur (Akan ve ark., 2002).

Sonrasında birçok IBV vakası Amerika'da farklı yıllarda Jungherr ve ark. (1956); Hitchner ve ark. (1966); Johanson ve ark.(1973); Snyder ve Marquardt (1984); Fabricant (1998); Hitchner (2004) gibi araştırmacılar tarafından tanımlanmıştır. O zamanlardan günümüze dünya genelinde pek çok farklı IBV serotipi ve genotipi belirlenmiştir (de Wit ve ark., 2010; Jackwood, 2012).

Avian infeksiyöz bronşitis Avrupa'da da tüm yaşta tavuklarda ekonomiyi ve refahı etkileyen hastalıklar içinde tavukların en önemli hastalıklarından birisidir. Yüksek kalitede aşıların bulunmasına karşın, IB Avrupa'nın birçok bölgesinde problem olmaya devam etmektedir. Avrupa'daki IBV varyantlarının prevalansı 1960'dan beridir sorun olarak tanımlanmaktadır. Ortaya çıkan varyantlar sırasıyla D207 (D274) ve D212 (D1466) Hollanda'da, 1990'larda yeni varyant olarak 4/91 (793B) Avrupa'da tanımlanmıştır. Dünyada temel bir patojen olan bu varyanta karşı canlı attenüe aşılar geliştirilmiştir. Son dönemde Avrupa'da en çok görülen 793/B ve CR88 olarak da adlandırılan 4/91 ayrıca It-02, QX, D274 ve Arkansas suşlarıdır (Cook ve ark., 2012; Worthington ve ark., 2008).

Avustralya, coğrafik olarak izole konumu nedeniyle IBV'nin durumu tüm ülkelerden farklı bir gelişim göstermiştir. Bin dokuz yüz altmış beşlerin başından beri birçok farklı IBV varyantı izole edilmiş (Cumming, 1963) ve bu varyantlara uygun korunma çalışmaları yapılmıştır (Ignjatovic ve ark., 1997 ve 2006; Klieve ve Cumming, 1988).

Asya'da da birçok farklı ülkede IBV izole edilmiştir. İlk izolasyon 1967'de Malezya'da yapılmıştır. İlk varyant 1979'da bildirilmiştir. Yu ve ark. (2001) yapmış olduğu epidemiyolojik bir araştırmada, Singapur ve Malezya'dan izole edilen IBV'lerin Mass tipi olduğunu, diğer suşların Çin ve Tayvan'dan izole edilen IBV'lere benzer olduğunu bildirmiştir (de Wit ve ark., 2010). Japonya'da Mase ve ark. (2008) yapmış oldukları çalışmalarda, 3 farklı temel genetik grubun varlığını bildirmiştir. Bölgesel suşların yanı sıra Çin ve Tayvan'a ait suşların varlığı ve son dönemde 4/91 serotipi izole edilmiştir (de Witve ark., 2010). Mısır'da farklı kanatlı çiftliklerinden Massachusetts, D3128, D274, D-08880, 4/91 ve yeni bir Mısır genotipi Egypt/Beni-Suef/01, Abdel-Moneim ve ark. (2002), Shebl ve ark. (1986) ve Sultan ve ark. (2004) tarafından izole edilmiştir. Ülkede ortak olarak kullanılan aşı suşu Massachusett serotipine aittir (Abd El Rahman, 2010). İsrail'de 1990'ların ortalarından itibaren varyant IBV bildirimleri olduğu görülmektedir (de Wit ve ark., 2010). Son dönemde IS/1494/06 gibi bölgesel öneme sahip IBV genotipleri Kahya ve ark. (2013) bildirdiği üzere ülkemizde de görülmeye başlanmıştır. Bunun haricinde Mısır (Abdel-Moneim ve ark., 2012), Irak (Mahmood ve ark., 2011), Libya'da da İsrail varyantları görüldüğü bildirilmektedir (Awad ve ark., 2014).

Genel olarak dünyada IBV'nin durumu böyleyken Türkiye'de özellikle 2000'li yıllardan önce yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır ve IBV'ye yönelik olarak sadece serolojik metotlar kullanılmıştır. Son 15 senelik süreçte elde edilen verilere baktığımızda Türkiye'de IBV'nin teşhisine yönelik Akan ve ark. (2002) RT-PCR ve floresan antikor tekniğini kıyaslamış ve teşhiste RT-PCR tekniğini daha etkin bulmuştur. Ayrıca hastalık etkenlerinin direkt ve/veya indirekt teşhislerinin yapılması sonrasında serotip ayırımlarının yapılarak tavuk sürüleri için uygulanan aşılama programlarının gözden geçirilmesi ve farklı serotipler var ise aşılama programlarına yeni serotip aşılının ilave edilmesi ile hazırlanmasının yararlı olacağını ifade etmiştir. Kahya ve ark. (2013), Türkiye'de ilk kez solunum sistemi belirtisi gösteren tavuklardan IBV'yi teşhis edip genotiplendirmişlerdir.

1.2. Etiyoloji

Avian infeksiyöz bronşitis virüsü *Coronavirinae* alt ailesine bağlı *Arteriviridae* ve *Coronaviridae* ailelerini kapsayan *Nidovirales* takımına aittir (Cavanagh, 1997). Bu takıma 2003 yılında *Roniviridae* ailesi (Abd El Rahman, 2010) ve International Committee for Virus Taxonomy (ICVT, 2014)' de bulunan bilgiye göre 2013 yılında *Mesoniviridae* ailesi eklenmiştir.

Nidovirales takımı altında yer alan *Coronavirinae* ve *Torovirinae* genom organizasyonu ve ekspresyonunda benzerliklere sahiptir ama genom büyüklüğü ve virion şekli olarak birbirinden farklıdırlar (Cavanagh ve Horzinek, 1993). *Coronavirus*'lar antijenik ilişkisi ve dizi benzerliğine göre 2013 yılına kadar *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus* ve *Gammacoronavirus* olarak 3 gruba ayrılmaktaydı, 2014 yılı itibariyle 4. bir grup olarak *Deltacoronavirus*'ler taksonomiye eklenmiştir. İnfeksiyöz bronşitis virüsü 3. grup olan *Gammacoronavirus*'tur (ICTV, 2014).

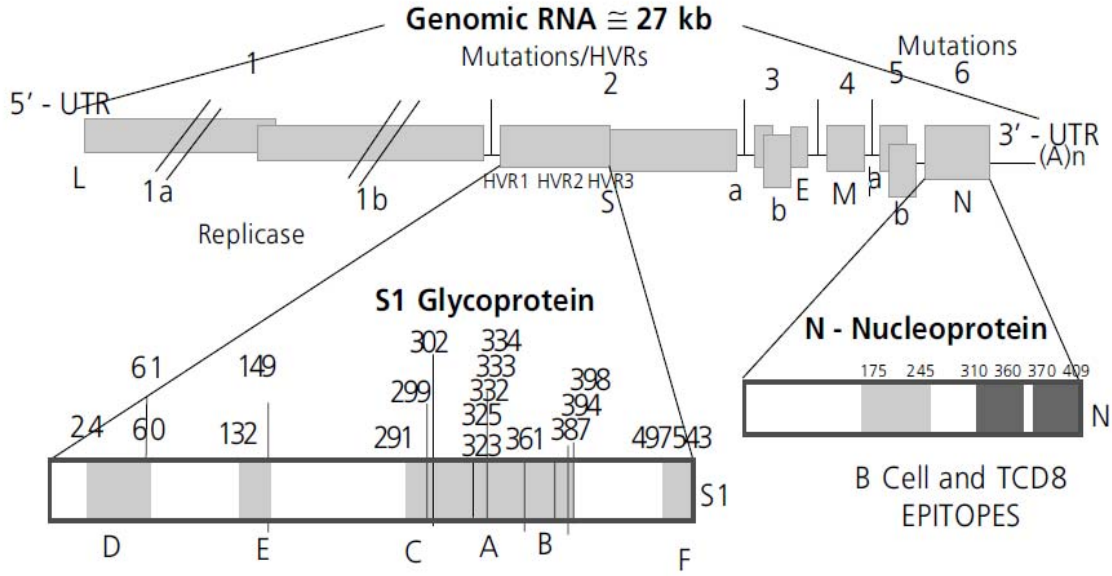
Nidovirales ismini Latin terminoloji “Nidus”un ingilizcedeki karşılığı olan iç içe anlamındaki “nest” ten almaktadır. Bu şekilde isimlendirilmesi bu takıma ait olan üyelerin kendine özgü replikasyon stratejisinden ileri gelmektedir. Bu takımdaki virüsler polysistronik (birçok farklı polipeptit zincirini kodlayan mRNA) genomun 3' proksimal bölgesinden eksprese olan kapsamlı mRNA'nın 3' co-terminal nested setinin üretimini gerçekleştirebilir. Coronavirüs transkriptleri sadece 3' co-terminal dizi bölgesini içermez ayrıca dizinin 5' ucundan elde edilen ortak 65-100 nükleotitlik 5' merdiven dizisini de içerir (Abd El Rahman, 2010; Pasternak ve ark., 2006). Bu takımdaki virüsler düz, segmentsiz, tek iplikçikli ve pozitif duyulu RNA genomuna sahiptirler (Cavanagh, 1997).

“Corona” adı bu gruptaki virüslerin etrafını saran yapının elektron mikroskopu altındaki karakteristik güneş tacı şeklindeki görüntüsünden kaynaklanmaktadır. Taç benzeri yapı Spike (S) adı verilen proteinin geniş (20 µm),

golf sopası şeklinde, ağırlıkla glikozit yüzeye sahip yapısından kaynaklanmaktadır. Coronavirüsler zarflı, pleomorfik şekilli yaklaşık 120 nm çapındadır (Abd El Rahman, 2010; Cavanagh ve Gelb, 2008). Tek iplikçikli, pozitif duyulu RNA genomu yaklaşık 27.6 kb büyüklüğündedir ve genomun poly-A kuyruğu olan 5' ve 3' çevrilmemiş [untranslated regions (UTRs)] bölgeleriyle etrafı sarılmıştır (Bournsnell ve ark., 1987; Mo ve ark., 2012; Ziebuhr ve ark., 2000). Genomun temel parçasını 20 kb'lık iki katlanma bölgesi olan açık okuma alanları (ORFs), ORF1a ve ORF1b oluşturur. ORF'ler yapısal ve yapısal olmayan viral proteinleri kodlarlar. Bu bölgeler viral replikazın (*Rep*) öncüsü olan poliproteinler 1a ve 1ab'ye ribozomal gövde değiştirme mekanizması (ribosomal frameshift mechanism) ile dönüştürülür ve bunun sonucunda 15 yapısal olmayan protein (Non-structural-protein, Nsp2-16) meydana gelir. Bu proteinleri; 3C benzeri protein, papain benzeri protein (PLpro), RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRp) ve diğer yapısal olmayan proteinler meydana getirmektedir (van Hemert ve ark., 2008). Bilinen şu ki RdRp viral genomda düşük yoğunluğa ve hataları düzeltmede sınırlı bir etkiye sahiptir. Ayrıca IBV'de dahil bütün coronavirüslerde RdRp ile ilişkili düzeltici özelliği taşıyan ekzoribonükleaz (ExoN) proteini bulunur. IBV dışındaki birçok coronavirüsün sadece bir veya birkaç farklı tipi vardır. Bu durum IBV'de çeşitliliği düzenleyen ExoN haricinde başka faktörlerin olduğunu ya da ExoN'nin çeşitliliği sınırlamadığını göstermektedir (Jackwood ve ark., 2012).

IBV genomunda 7 ile 10 arasında açık okuma alanı, bu bölgeleri kodlayan iki ek gen tanımlanmıştır. Bu bölgeler sırasıyla 3a, 3b ve 5a, 5b ek proteinlerini kodlarlar (Abro, 2013; Lai ve Cavanagh, 1997; Pasternak ve ark., 2006). Bu proteinlerin *in-vitro* replikasyonda rolü olmadığı ancak patogeneizde rol oynayabileceği düşünülmektedir (Casais ve ark., 2005; Hodgson ve ark., 2006). Genomun geriye kalanında temel yapısal proteinleri kodlayan Spike (S), zarf (envelope E), membran (M) ve nükleokapsit (N) bulunur. Sonuç olarak, tüm coronavirüslerde bu 4 yapısal protein (S,E,M ve N) bulunmaktadır. Grup 2 coronavirüsler dördüncü bir membran bağımlı hemagglutinin-esteraz proteinini içerir (Cavanagh, 2005). Genom içinde yapısal protein genlerinin sırası tüm coronavirüslerde aynı şekilde bulunmaktadır ve yerleşimi sırasıyla 5'UTR-

polimerazgenler-S-3a,b,c-(E)-M-5a,b-N-UTR 3' şeklindedir (Cavanagh, 2005; Cavanagh, 2007; Lai ve Cavanagh, 1997; Montassier, 2010).



Hücre reseptörlerine bağlanma → İnfektivite
VN antijenik bölgeler + TCD8 Epitopları

Şekil 1.1. IBV genom yerleşimi, mutasyona açık bölgeleri ile viral spike glikoproteini ve nükleoproteininde meydana gelen değişimlerle ilişkisi (Montassier, 2010).

Şekil 1.1.'de görülen yapısal olmayan proteinleri kodlayan bölgeler, ORF1a ve ORF1b'dir. Genomun yaklaşık 2/3'sini oluşturan bu bölgeler replikaz genlerini içerir. Bu genler Rep1a ve Rep1b poliproteinleri olarak ifade edilir ve replikasyon-transkripsiyon mekanizmasında görev alır (Imbert ve ark., 2008). Bu poliproteinler transkripsiyon sonrası ayrılmayarak 15 tane yapısal olmayan (Nsp2-16) proteini meydana getirmektedir. Bu proteinleri; 3C benzeri protein, papain benzeri protein (PLpro), RdRp ve diğer yapısal olmayan proteinler meydana getirmektedir (van Hemert ve ark., 2008).

S geni, IBV'ye ait dört yapısal proteinden S glikoproteinini kodlar. Bu gen bir tane ORF'ye sahiptir. S proteini eksprese olduktan sonra amino ucu S1 (92 k-Da) ve karboksil ucu S2'ye (84 k-Da) bölünmektedir. S1 alt ünitesi 535 aminoasit, S2 ucu yaklaşık 627 aminoasitten oluşmaktadır (Cavanagh, 2007). Olgunlaşmış bir virionda,

S2 proteini S1 ile bağlantılıdır ve S1 proteinini membrana sabitleyerek ikisi beraber multimerik yapıları olarak S proteinini oluştururlar (Montassier, 2010).

S glikoproteini 3 temel yapıya ayrılır; S1 ve S2 ünitelerinden oluşan geniş dış alan, transmembran alanı ve kısa karboksil-terminal alan (Lai ve Holmes, 2001). S1 dizisi daha çeşitlidir ve bu dizide meydana gelen mutasyonlar doku tropizmi ve IBV suşlarında antijeniteyle ilişkilidir (Cavanagh ve Naqi, 2003). Farklı suşlarda S1 dizisi %2-25 arasında aminoasit düzeyinde değişkenlik gösterirken, S2 dizisi daha korunumludur (Cavanagh,1997; Cavanagh ve ark., 1992; Kant ve ark., 1992; Koch ve ark., 1992). Biyolojik özelliklerine bakıldığında, S1 glikoproteini virüs nötralizasyon antikorlarının uyarılması, hücrelere tutunma, konak hücre membranıyla viral zarfın füzyonunda ve bazen de hücreden hücreye füzyonda rol almak gibi diğer önemli görevlere sahiptir (Kant ve ark., 1992; Koch ve ark., 1990a, 1990b; Lai ve Holmes, 2001). Tek iplikçikli bir RNA virüsü olması IBV'yi spontan mutasyonlar ve genetik rekombinasyonlara açık hale getirerek genetik materyalinde değişiklikler yaratır (Cavanagh ve Gelb, 2008). Bu genetik değişimler özellikle S geninin çok değişken bölgeleri olan (hypervariable regions) HVR'lerde meydana gelir ve sonucunda yeni varyantlar oluşur (Awad ve ark. 2014). S1 alt ünitesinde üç tane HVR bulunur. Bunlar sırasıyla (HVR1) 38-67, (HVR2) 91-141 ve (HVR3) 274-387'nci aminoasit dizilerinde bulunurlar. Bu bölgeler virüs nötralizasyonu ile ilişkilidir ve bu bölgelerde meydana gelen varyasyonlar serotip çeşitliliğini meydana getirir (Mahmood, 2009).

Zarf proteini (E), virionun zarfıyla ilişkili küçük integral membran proteinidir IBV E proteini yaklaşık 10 kDa ağırlığında ve 108 aminoasitten oluşmuştur (Lai ve Holmes, 2001). Virüsün bir araya toplanmasını sağlayan temel bir yapıdır. E proteini aminoasit dizisinde meydana gelen bir mutasyon virüsün hücrelerde bir arada toplanmasını etkiler (Abro, 2013).

Virüsün en büyük bölümünü oluşturan integral membran proteini (M), çift katmanlı yağ tabakası içinde yerleşmiş olup virüsü yapısal olarak sağlamlaştıran bir

proteindir. M proteini diğerk yapısal proteinlerle bağlantılar kurarak virüs parçalarını birarada tutar ve düzenler (Abro, 2013).

N geni ise nükleokapsit proteinini kodlayan bir tane ORF'ye sahiptir (Collison ve ark., 1992). Bu protein oldukça korunumludur ve farklı IBV izolatları arasında sadece %2-6 oranında aminoasit düzeyinde farklılık gösterebilir. Virüsün S ve N proteinleri biyolojik ve immunolojik fonksiyonlarla ilişkilidir. Nükleokapsid proteini 409 aminoasitten oluşan hücresel immünite için oldukça önemli olan ve birçok IBV suşunda iyi korunmuş bir fosfoproteindir (Seo ve ark, 1997; Seo ve Collison, 1997). Viral RNA'yı koruyucu bir paket gibi sarar ve viral RNA replikasyonunda ve transkripsiyonunda görev aldığı düşünülür. Bu özel paketleme sayesinde viral genetik materyal belli nükleotid sekansın nükleokapsid proteini tarafından tanınmasını sağlar (Fan ve ark., 2005; Montassier, 2010).

Böylece S1 ve N genlerinin özellikle immünite ve virüs replikasyonundaki rolleri düşünüldüğünde varyantların oluşumunda kritik bir öneme sahip olduğuna inanılmaktadır (Montassier, 2010).

Virüs hücre membranını aşmak için membran füzyon proteinlerini kullanır. S proteini hücreye girişte görev alan viral membran proteinlerinden sorumludur. Hedef hücre üzerindeki reseptörlere bağlanır ve virüs hücre füzyonunu yönetir. Casais ve ark. (2005)'ları yapmış oldukları deneysel bir çalışmada, IBV S proteininin virüsün hücre tropizminde temel bir rolü olduğunu göstermişlerdir. Virüs genellikle epiteliotropik özellik gösterir ve viropeksis ile epitelyal hücrelere girer (Dhinaker Raj ve Jones, 1997). Hücreye bağlanma sonrası füzyonla hücreye giren virüsün yapılarından kurtulup (uncoated) genomik RNA'sını konak sitoplazmasına nasıl bıraktığı tam olarak bilinmemektedir. Virüsün penetre olması ve yapılarından kurtulması için hücresel faktörlere gereksinimi olabilir (Lai ve Holms, 2001).

Virüs hücre içine girip nükleokapsidini serbest bırakmasının ardından bilinen en geniş replikaz proteinini (741kDA) sentezler. Olgun proteinlerin proteolitik olarak

işlenmesini sağlamakla görevli olan bu proteinler içerisinde RNA'ya bağlı RNA polimeraz (RdRp) da bulunmaktadır. Bu enzim ilk olarak çoklu alt-genomik RNA'lar ve genomun tüm kopyasında kalıp olarak kullanılan negatif zincirli RNA'ların sentezinde görev alır. Çoklu alt-genomik mRNA'ların varlığı coronavirüsler için karakteristik bir özelliktir (Lai ve Holms, 2001).

Genellikle sentezlenen her RNA parçasının sadece 5' proksimal ORF'si bir yapısal proteine dönüştürülür. Ayrıca yapısal proteinlerin yanısıra tüm poliproteinini sentezlemek için ribozomal frame shift mekanizmasını kullanan polimerazlar ORF'lerde kodlanmıştır (Boursnell ve ark., 1987).

Virüsle infekte hücrede gerçekleşen RNA sentezi ve kapsid oluşumu sonrası kapsid oluşumunda gerekli olan N proteininin kümelenmesi, RNA replikasyonu sırasında transkripsiyonla RNA sentezinin dengelenmesinde etkilidir. Sitoplazmada yeni sentezlenen genomik RNA'lar N proteiniyle etkileşerek helikal şekilli nükleokapsidin oluşumunu sağlar. M ve E proteinleri endoplazmik retikulumun içine girerek golgi cisimciğine yerleşir. N proteini ve RNA etkileşimleri sonucu oluşan helikal nükleokapsid ilk olarak M proteiniyle endoplazmik retikulum ve golgi cisimciği arasında bulunan tomurcuklanma bölgesine gelir. E ve M proteinleri arasında meydana gelen etkileşim sonrasında helikal nükleokapsidli virionlar tomurcuklanarak açığa çıkar. Golgi cisimciğinde bulunan S ve hemagglütinin esterasez (HE) yapısal proteinleri golgiyle birlikte endoplazmik retikulumun içine girer ve golgi kompleksine taşınarak membran bağlanma polisomlarına dönüşür. Bu protein taşınımı süresince bazı S ve HE proteinleri M proteinleriyle etkileşime girer ve virionun olgunlaşmasını sağlar. Virionla birleşmeyen S ve HE proteinleri hücre yüzeyine giderek burada hücre-hücre füzyonu veya hemadsorbsiyonun düzenlenmesinde görev alabilir (Lai ve Holms, 2001).

Coronavirüslerde genlerdeki özellikle de HVR'lerde meydana gelen seçici baskı ve mutasyonlar, virüsün türler arasında geçiş yapabilmesini sağladığı ve yeni konak türlerine adapte olarak viral evrimleşmeye katkıda bulunduğu düşüncesi pek

çok araştırmacı tarafından desteklenmektedir (Abro 2013; Liu ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2006). Zaman içerisinde IBV serotiplerinin sayısında meydana gelen artış özellikle S1 geni üzerinde yapılan incelemeler doğrultusunda ne kadar hızlı mutasyon geçirdiğini göstermektedir (Cavanagh, 2005; Farsang ve ark., 2002; Lee ve ark., 2003). Oluşan bu yeni virüslerin çoğu endemik olmasına karşın dünya geneline yayılmış serotiplerde bulunmaktadır. Cavanagh (2001), ortaya çıkan bu yeni serotiplerin düzenli bir şekilde kayıt altına alınması için isimlendirme sisteminin biran önce oluşturulması gerekliliğini vurgulamıştır. Konakçı orijiniyle ilgili belirsizliklerin netleştirilmesi beklenmeden isimlendirmenin kuş türü / ülke/ bölge orijini / genotip veya serotip numarası / izolasyon yılı şeklinde yapılabileceğini gerekli görüldüğünde küçük bir değişimle tekrar düzeltilebileceğini ifade etmiştir. Örneğin pheasant/UK/438/94, kolaylıkla PhCoV/UK/438/94 olarak değiştirilebilir (Cavanagh, 2001). IBV suş nomenklatür standardizasyonu uzun bir süre tartışmalara açık kalmıştır ve halen yapılamamıştır. IBV isimlendirilmesi avian influenza virüslerinin isimlerine benzer şekilde, önerilen IBV/ kuş türü/ ülke orijini / genotip veya serotip / suş ismi / izolasyon yılı şeklindedir. Bu şemaya göre, IBV ve kuş türü (eğer tavuk ise) izolat isminden atılabilir. Ancak kuş türü tavuk değilse veya tavuk yetiştirme tipi broyler, yumurtacı, damızlık ise önemlidir ve eklenmelidir. Uluslararası virüs taksonomi komitesi coronavirüs çalışma grubu IBV'yi de içeren tüm coronavirüsler için standart bir isimlendirme çalışmalarına devam etmektedir (Cavanagh 2001; Cook ve ark., 2012).

1.3. Epidemiyoloji

IBV dünya genelinde yaygın olarak bulunmaktadır ve hastalığın kontrolü oldukça zordur çünkü virüs birçok serotip ve varyanta sahiptir. Ayrıca sürekli olarak meydana gelen genetik mutasyonlar ve rekombinasyonlar yeni varyantların oluşumuna neden olmaktadır (Montassier, 2010).

Moleküler çalışmalar yeni serotip veya varyantların virüs S proteininin S1 alt ünitesinde meydana gelen değişimlerin bu çeşitliliğe neden olduğunu göstermiştir (Cavanagh, 2007). Bu durum immünolojik baskının bir sonucu olarak ortaya çıkmış olabilir. Aşıların yaygın kullanımı, miks infeksiyonlar sonucu meydana gelen rekombinasyonlar ve yine baskın serotiplere karşı aşıların kullanılması bu sürecin oluşmasında etkilidir (Lee ve ark., 2002; Liu ve ark., 2006). Epidemiyolojik araştırmalar IBV'nin bir bölgeden veya ülkeden diğerine yayılmasında illegal olarak ticari kanatlı hareketleri, yabani kuş göçleri dışında attenüe aşıların kullanımının etkili olduğunu göstermiştir (Cavanagh, 2005; Liu ve ark., 2006).

IBV'nin evrim süreci karmaşık ve zor anlaşılan bir süreçtir. RNA polimerazın düzeltme eksikliğinden kaynaklanan replikasyon hatalarının RNA genomunda mutasyonla sonuçlanması, farklı IBV suşlarından oluşan çoklu attenüe ve canlı aşıların sürekli kullanımı ve sahada sirküle olan virüs suşlarına kısmen bağışıklık kazanmış olan kuş popülasyonunda virüsün sürekli bulunmasının yaptığı immün baskı gibi bazı faktörlerin rollerinin araştırılması ile bu evrimsel süreç incelenmeye devam edilmektedir (Montassier, 2010).

Genomik değişimler coronavirüsleri etkilemekte ve özellikle S1 ve N genleriyle bağlantılı olarak nokta mutasyonların, delesyonların, insersiyonların ve rekombinasyonların oluşmasında rol almaktadır (Cavanagh ve ark., 1992; Ignjatovic ve ark., 2006; Jia ve ark., 1995; Kusters ve ark., 1990; Lee ve Jackwood 2000; Wang ve ark., 1993). Aşılı kuşlardan izole edilen IBV'lerde S1 glikoproteininin çok değişken bölgesinde evrimsel değişim ve mutasyon oranları sırasıyla yıllık % 2,5 ve % 1,5'a ulaşmıştır (Lee ve Jackwood, 2001; Mckinley ve ark., 2008).

IBV için antijenik evrimleşme birincil olarak S1 glikoproteinini kodlayan gen dizisinde meydana gelen değişimle bağlantılıdır. Bu bölge özellikle virüsün hücre reseptörlerine bağlanması ve nötralizan antikorların üretimini uyaran gerekli epitoplarla ilişkilidir. Böylece farklı serotipler, alttipler ve antijenik varyantlar S1 geninde nükleotidlerde meydana gelen nokta mutasyonlar, insersiyonlar, delesyonlar

veya RNA rekombinasyonları sonucunda oluşur ve aşıtlı tavuk sürülerinde bile salgınlara sebep olur (Jia ve ark., 1995; Kottier ve ark., 1995; Wang ve ark., 1998; Wang ve Huang, 2000). Ayrıca bu varyantlar arasında oldukça farklı epidemiyolojik bir davranış tanımlanmıştır. Ortaya çıkan bazı virüsler coğrafik bölgelere hızla yayılıp kalıcı olurken, bazılarının çıktığı bölgede sınırlı kaldığı görülmüştür. Böylece, bu durum zamanla IBV suşlarında farklı yayılma ve adaptasyon yeteneklerini düzenleyen moleküler özelliklerin ortaya çıkabileceğini göstermiştir (Dolz ve ark., 2008). Rekombinasyon sonucu meydana gelen IBV varyantlarının aşıtlı tavuklarda bağışıklık yanıtından kaçabilme yeteneği S1 ve N genleri tarafından düzenlenebilmektedir (Montassier, 2010).

Dünyada yaygın olarak bulunan bu virüsün en önemli doğal konakçısı tavuklardır ve her yaştan tavuk etkilenmektedir. Ayrıca hindi, sülün, bıldırcın ve kırmızı keklik gibi diğer türlerden de IBV ile yakın ilişkili koronavirüsler izole edilmiştir. Altı haftadan küçük tavuklarda tüm semptomlar gözlenir. Sürü morbiditesi %100'e ulaşabilir, mortalite ikincil bir enfeksiyonun varlığına, sürünün yaşına, bağışıklık durumuna, sürü yönetimi ve çevresel faktörlere göre değişebilmektedir. Genç tavuklarda mortalite oranı %25-30 civarındadır ama suşun virülensine göre %80 kadar ulaşabilir. Tüm tavuklar etkene karşı duyarlı olsada civcivlerin daha duyarlı olduğu görülmüştür (Anonim; Cavanagh ve Gelb, 2008).

Klinik belirtiler saha suşuna (suşun virülensine ve virüsün vücuda giriş dozuna), çevresel faktörlere (toz, amonyak, stres), kümes yönetimi ve biyogüvenlik seviyesi gibi birçok faktöre bağlı olarak çeşitlilik gösterebilir (Ganapathy, 2009). Hastalığın diğer formları reproduktif sistem, renal ve gastro-intestinal sistemle ilişkilidir. Virüs semen ve testislerden izole edilmiş ve horozlarda infertiliteye neden olduğu da bildirilmiştir (Jones, 2010; Gallardo ve ark., 2010).

IB daha çok tavukları etkilemesine rağmen, diğer kuş türlerine ait koronavirüsler de tanımlanmıştır. Turkey koronavirüs (TCoV) 1995' de ortaya çıkmıştır ve genetik analizlere göre kökeni IBV' ye dayanan ve tanımlanamamış bir

coronavirüsün spike geninin rekombinasyonu ile oluşmuş bir türdür. Sülünlerde bulunan benzer coronavirüslerin moleküler analizi sonucunda sülünleri etkileyen virüs ile TCoV farklı IBV suşları kadar birbirleriyle yakın ilişkilidir. Bu IBV'nin diğer kuş türlerini infekte edebileceğini göstermektedir. Sülün ve hindilere ek olarak avian coronavirüsler; güvercin, ördek, kırmızı knot (büyük kumkuşu), kaz, çamur ördeği, ötücü kuğu, ardış kuşu ve bülbül gibi pek çok kanatlı türünde bulunmuştur (Liu ve ark, 2005; Gough ve ark., 1996). Bu virüsler belkide coronavirüs türünden farklı olduğu söylenecek kadar farklılık gösterebilir (Anonim).

IB virüsünün persiste olduğu organlardan biri böbrekler olmasına rağmen bu konu tam olarak belirlenememiştir. Son dönemde bazı çalışmalar IBV aşısı suşlarının çeşitli iç organlarda 163 gün veya daha uzun bir süre kaldığını göstermiştir (Naqi ve ark., 2003). Bu süre içinde virüs periyodik olarak dışkıyla veya nazal sekresyonla çevreye saçılım gösterir. Bu saçılım kümeden kümese ekipman veya personelle bulaşmalarda risk oluşturur. IBV aşısı veya saha suşları bağırsakta sekal tonsillerde persiste olabilir ve klinik olarak sağlıklı hayvanlar haftalarca veya daha uzun bir süre dışkılarıyla virüsü saçmaya devam ederler (Mahmood, 2009; OIE,2008). Enfeksiyon kümesinde hızla yayılır. Duyarlı kuşlar infekte tavukların olduğu ortamda bulundurulduğunda 48 saat içinde hastalık belirtileri göstermeye başlar. İnkübasyon periyodunu virüsün dozu ve inokülasyon şeklide etkiler. Ancak doğal enfeksiyonlar genellikle 36-48 saat sürmektedir (Cavanagh ve Naqi, 2003). IBV, enfeksiyondan 14 hafta sonra sekal tonsillerden ve 20 hafta sonra dışkıdan izole edilebilmiştir (Mahmood, 2009). Ayrıca semenden ve yumurtadan izolasyon vardır ancak vertikal bulaşma önemsizdir (Dhinaker Raj ve Jones, 1997). Ancak yumurta yüzeyinin IB virüsüyle kontamine olması ve bu şekilde kuluçkahaneye veya yumurta paketleme ünitelerine dağılması muhtemeldir (Awad ve ark., 2014).

Bazı ırkların etkene daha duyarlı olduğu görülmüştür. Örneğin beyaz Leghorndan hat 151 en yüksek duyarlılığa sahipken hat C oldukça dirençlidir (de Wit, 2000).

Birçok IBV suşu 56 °C’de 15 dakikada ve 45 °C’de 90 dakikada inaktif olur. IBV’nin uzun dönem -20 °C’de depolanmasının virüsün parçalanmasına neden olduğu, ilkbahar aylarında dış ortamda 12 gün ve kışın 56 güne kadar canlı kaldığı bildirilmiştir (Cavanagh ve Naqi, 2003). Zarflı virüs partikülleri ısıya dayanıksızdır, uç pH’larda yapısı bozulur. Dezenfektan, güneş ışığı ve sıcaklığa oldukça duyarlıdır (Jackwood ve ark., 2012).

1.4. Patogenez

İnfeksiyöz bronşitis virüsü öncelikle üst solunum yollarını infekte eder ve burada replike olur. Bunun sonucunda trake ve sinüslerdeki hücre hattının koruyuculuğunu etkisizleştirirler. Kısa bir viremi döneminden sonra virüs böbrekte, üreme sisteminde ve sekal tonsillerde saptanabilmektedir (Anonim). Virüsün birçok dokuda replike olması proteinlerindeki özellikle de S proteinindeki dizi çeşitliliği sonucu meydana gelir (Cavanagh, 2005).

Üst solunum yollarındaki silialı epitelyal hücreler, dişi üreme sistemindeki epitelyal hücreler ve böbrekteki tübüler epitelyal hücreler IBV için hedef dokulardır. Uzun süre virüs bağırsak fonksiyon bozukluğu ile ilişkilendirilmiştir ve yakın zamanda erkeklerde infertiliteye neden olduğu ve erkeklerden dişilere venereal bulaşmanın olduğu belirtilmiştir (Cook ve ark., 2012).

IBV’nin yumurta üretimi ve kalitesi üzerine olan olumsuz etkileri 1950’lerden beri bilinmektedir (Broadfoot ve ark. 1956; Jones ve Jordan 1971). Yumurtacılar yaşam periyodları boyunca iki kez IBV kontrolünün kritik önemi vardır; biri yumurtlama sonrası diğeri çıkım sonrası erken dönemdir (Cook ve ark., 2012). Van Roekel ve ark. 1950’lerde yapmış oldukları çalışmalarda bu hastalıkta yumurta veriminin %2-70 arasında değişen oranlarda etkilendiğini göstermiştir. Yumurta albümininde sulanma, kabuğunda incelme, çatlama veya şekilsizlik gibi kalite bozuklukları meydana getirdiği görülmüştür (Cook ve ark., 2012). Bu yıllarda baskın

IBV serotipinin nefropatojenik tip olduğu çalışmacılar tarafından ortaya konmuştur (Winterfield ve Hitchner, 1962; Cumming 1963). Bu serotipin organ tübüllerinin ürat ile dolup şişmesine, böbrek hasarı sonucu özellikle genç kuşlarda ölüm oranında artışa sebep olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür. Bu dönemde Amerika'da Holte ve Gray suşları, Winterfield ve Hitchner (1962) tarafından ortaya konmuştur. Cumming ve ark. (1969) Avustralya T suşu üzerinde çalışmışlardır. Avustralya'da 1960 yılında IBV'nin oluşturduğu en yaygın klinik tablo böbrek hasarıydı. Cumming'in yapmış olduğu araştırmalar tavukları hastalığa yatkın hale getiren önemli faktörlerin genetik hatlar, diyetteki protein kaynakları, kümes içi stres faktörleri olduğunu göstermiş ve gerekli koşullar oluştuğunda tüm IBV'lerin nefrit yapabileceğini öne sürmüştür (Dhinaker Raj ve Jones, 1997). Sonrasında nefrite bağlı ölümlerin olduğunu açıklayan Jones, Cumming'in yaptığı açıklamayı ispatlamış ve nefropatojenik Mass-tip IBV'yi immunoboyama ile böbreklerde göstermiştir (Jones, 1974; Cumming 1969). Kinde ve ark. (1991), solunum sistemi problemi ile ilgili belirtileri olan ticari bir broiler işletmesinde aynı zamanda böbrek lezyonlarına da rastlamış ve izole edilen suşu serotiplendirememişlerdir. Araştırmacılar, bu suşun SPF tavuklarda hem solunum sisteminde hem de böbreklerde bozukluklara neden olduğunu göstermişlerdir (Akan ve ark., 2002; Cook ve ark., 2012).

IBV, harderian bezinden de izole edilmiştir (Dhinaker ve Jones, 1997; Gelb ve ark.,1991; Toro ve ark., 1997) ve bezin stromasında IBV pozitif hücreler immunofloresan boyamayla gösterilmiştir (Toro ve ark., 1997). IBV'nin göze damla yoluyla aşılması plazma hücrelerinde ve lenfosit infiltrasyonunda artışla sonuçlanmıştır. Aşılamadan 14 gün sonra Harderian bezinde tübüler epitelde deskuamasyonla beraber iyileşme meydana geldiği görülmüştür (Toro ve ark.,1997). IBV aşılması sonrasında lakrimal bezdeki lenfoid dokularda gelişme, plazma hücre sayısında artış bildirilmiştir (Toro ve ark.,1996). IBV ayrıca bursa fabrisiustan izole edilmiştir. H52 ve H120 suşları ile oluşturulan deneysel enfeksiyonda geniş histopatolojik lezyonlar görülmüştür (El Houadfive ark.,1986; Ambali ve Jones, 1990). IBV karaciğer ve dalak gibi diğer dokulardan da izole edilmiştir, ancak organa fonksiyonel bir zarar verip vermediği bilinmemektedir. IBV infekte

tavukların semen ve yumurtasından izole edilmiştir (Alexander ve Gough, 1977; Ambali ve Jones, 1990; Navas ve ark., 2003; Otsuki ve ark., 1990).

IBV'nin dişi üreme sisteminde meydana getirdiği sorunlar özellikle de yumurtacılar da “sessiz veya yalancı yumurtacı sendromu” olarak tanımlanmıştır (Broadfoot ve ark., 1956; Crinian ve Hofstad, 1972). Hastalık son dönemlerde, 2000’li yılların başından itibaren Avrupa’da QX genotipiyle tekrar kendini hatırlatmıştır (Elbers ve ark., 2004; Landman ve ark., 2005). Bu varyant ilk olarak Çin’de tavuklarda proventrikülit ile kendini göstermiştir (Wang ve ark., 1998). Daha sonra Avrupa’da yayılmaya başladığında genç kuşlarda nefrite neden olduğu ve yumurtacı sürülerde sessiz yumurtacıların meydana geldiği Hollanda’da de Wit ve ark. (2010) ve Macaristan’dan Benyeda ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Etken erken dönemde infekte olan kuşlarda ovidukta kalıcı hasarlar yaratır ve yumurtalıklar normal kalsa bile yumurta oluşum sürecinde sorunlar meydana gelmektedir (Cook ve ark., 2012).

Histopatolojik olarak trakede meydana getirdiği süreç dejenerasyon, hiperplazi ve iyileşme olarak üç aşamada gelişir. Bir iki gün içinde epitellerde desiliasyon ve deskuamasyon gelişir. Mukus salgılayan hücreler ile birlikte lamina propriada hafif bir heterofil ve lenfosit infiltrasyonu izlenir. Böbreklerde ise virüsün çoğalması proksimal tübüllerde, distal tübüllerde ve toplama kanallarında görülür. Tübül epitellerinde meydana gelen yapısal değişim sıvı ve elektrolit geçişinde bozukluğa neden olarak akut renal yetmezlik ile sonuçlanır (Dhinaker Raj ve Jones, 1997). Yumurta periyodundaki hayvanlarda görülen hastalık vakalarında, ovidukta küçülme ve karın boşluğunda sulu bir yumurta sarısı görülür. Histopatolojik olarak yumurta kanalındaki epitellerde metaplazi, subepitelial dokularda monosit infiltrasyonu ve lenfoid foliküllerde proliferasyon dikkati çeker (Akan ve ark., 2002).

1.5. Teşhis

IBV'nin teşhisi; anamnez, klinik bulgular, lezyonlar, serum antikor titresinin değerlendirilmesi, antijenin saptanması, virusun doku kültürü ve embriyolu tavuk yumurtalarında izolasyonu, elektron mikroskopi ve IBV RNA'sının tespit edilmesine dayalı yöntemlerle yapılmaktadır. Ancak ne antikor-antijen saptayan yöntemler ne virüs izolasyonu ve moleküler yöntemler spesifik bir IBV saha suşunun meydana getirdiği infeksiyonun konfirmasyonunda tek başına tatmin edici değildir (Jackwood ve de Wit, 2013).

Sadece klinik ve nekropsi bulgularına bakarak IB'nin teşhisini koymak oldukça zordur. Solunum sistemi belirtileri ve bu sisteme ait saptanan makroskopik ve mikroskopik lezyonlar IB'den şüphe ettirse de, ortaya çıkan solunum sistemi belirtileri Newcastle Disease (ND), İnfeksiyöz Laringotraheitis (ILT), Avian Pneumovirus (APV), Chronic Respiratory Disease (CRD) ve infeksiyöz koriza gibi pek çok solunum sistemi hastalığı ile karışabilmektedir. Bu hastalıklar sıklıkla kendini hafif formlarda gösterebilirler bu da birini diğerinden ayırmayı imkansız hale getirir. Yumurta verim ve kalitesindeki bozukluklar başta EDS-76 olmak üzere infeksiyöz ve yönetim hataları gibi infeksiyöz olmayan faktörler tarafından da meydana getirilebilir (Anonim; Jackwood ve de Wit, 2013; Esendal, 2002).

1.5.1. IBV Laboratuvar Teşhisi

1.5.1.1. Virüs İzolasyonu

IBV hasta hayvanların trake, akciğerler, hava kesesi, sekal tonsil ve üremi formunda böbreklerinden izole edilebilir. İnfeksiyonun başlangıcından örneklemenin yapılması arasında geçen zaman önemlidir. Virüsün birincil replikasyon bölgesi üst solunum yollarıdır. Daha sonra viremi dönemiyle virüs diğer dokulara yayılır. İnfeksiyon sonrasındaki ilk 3-5 gün içinde etken trakede yüksek konsantrasyonda

bulunur. Bu dönemden sonra virüs titresi tespit edilemeyecek seviyelere düşer (de Wit, 2000). Teşhiste bir diğer önemli faktör de hangi organların ve hangi hayvanların virüsü taşıdığını doğru saptamaktır. Uzun dönemli izolasyonlarda veya virüsün tekrar saçılımını düşündüren infekte veya aşıli sürülerden çapraz infeksiyonların varlığında, virüsün persiste olduğu iki önemli bölge olan sekal tonsiller ve böbrekler değerlendirilmelidir. Bunun yanı sıra aşı suşlarının da sekal tonsillerde persiste olduğu bilinmelidir. İnfeksiyon döneminde tavukların bağışıklık durumu, örneklenen tavuk sayısı, örneklenecek organların seçimi, uygun koşullarda muhafazası ve laboratuvara ulaştırılması ayrıca kanatlıya ait genetik özellikler teşhis için önemlidir ve dikkate alınmalıdır (Villarreal, 2010; Jackwood ve de Wit, 2013).

Hastalık belirtileri klinik olarak görünür hale geldiği anda hastalığın formuna uygun olan örnekleme yapılmalıdır. Örnekler soğuk taşıma araçlarıyla veya dondurularak mümkün olduğunca çabuk bir şekilde, soğuk zinciri bozmadan laboratuvara gönderilmelidir. Akut solunum sistemi belirtileri görülen canlı hayvanların üst solunum yolundan svap örnekleri veya trakeal ve akciğer dokuları alınıp penisilin (10,000 internasyonel ünite [IU]/ml), streptomisin (10mg/ml) içeren transport medyumda soğuk zincirde ve/veya dondurularak ilgili laboratuvara gönderilir. Nefrit veya yumurta üretim problemleri görülen hayvanlardan böbrek ve oviduktlar, solunum materyallerine ek olarak örneklenmelidir. Bazı vakalarda IBV identifikasyonu, reverse-transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), virüs izolasyonu olmaksızın gerçekleştirilebilir. Bu durumlarda, solunum sisteminden veya kloakal svap örneklerinden örnekleme transport medium kullanmaksızın yapılabilir. IB ilişkili nefritis tablosundan şüphelenildiğinde, histopatolojik incelemeler ve virüs izolasyonu için böbrek örnekleri taze tavuk karkaslarından seçilmelidir. Hastalıktan akut olarak etkilenen hayvanlar ve aşıli tavukların kan örnekleri serolojik olarak incelenmelidir. Etken dışkı ve sekal tonsillerden yüksek oranda geri izole edilebilmektedir. Ayrıca, bağırsaktan izole edilen etken son veya güncel klinik infeksiyonla ilgili belirgin bir ilişkiyi göstermeyebilir. IBV izolasyonu, ticari kanatlılarla bir veya daha fazla temas halinde bulunmamış spesifik patojen ari (specific patogene free, SPF) tavukların kullanımıyla kolaylaşabilmektedir. Yumurta inokulasyonu veya doku kültür

medyumunda tavuk trakeal organ kültür (TOK) inokülasyonu için (10-20 %w/v) doku süspansiyonu steril tamponlanmış fosfat tuzu (phosphate buffered saline / PBS) veya nutrient brothta hazırlanır (Cook ve ark., 1976). Süspansiyon düşük hızlı santrifüj ile berrak hale getirilir ve bakteriyel kontaminasyonu önlemek için filtre edildikten (0.2 µm'lik filtreler kullanılarak) sonra SPF 9-11 günlük embriyolu tavuk yumurtası veya TOK'a ekim yapılır. Eğer suş hücreye adapte değilse ve aşından elde edilmediyse birinci inokulasyonda embriyoda genellikle sınırlı makroskopik etki vardır. Normalde, yumurtalardan toplanan allantoik sıvılar infeksiyondan sonraki 3-6 günden sonra toplanarak havuz haline getirilir. Bu havuz 1/5-1/10 oranında antibiyotikli sıvı içeren besiyerinde dilüe edilir. Bu şekilde toplamda 3-4 kez pasajlanır. Tipik bir saha suşu 2.-4. pasaj sonrasında embriyoda kıvrılma, tüy distrofisi, böbrekte mezonefroza ürat birikimi ve cücelik gibi görülür düzeyde değişiklikler meydana getirir. Daha sonraki pasajlarda etken yumurtaya adapte oldukça embriyoda mortalite meydana gelir (Anonim; OİE, 2013). İnfektif allantoik sıvılar -20 °C veya daha düşük sıcaklıklarda kısa süreli olarak, -60 °C'de uzun dönem veya +4 °C'de liyofilize olarak saklanabilmektedir. IBV'yi saha materyelinden direkt izole etmek için 19-20 günlük embriyolardan elde edilen TOK'lar kullanılabilir (Cook ve ark.,1976). Trakeal organ kültürünün infekte edilmesi sonrasında 24-48 saat içinde siliostazis meydana gelmektedir. Siliostazis diğer virüsler tarafından da meydana getirilebilir. Bu durum IBV'den şüphelendirir, ancak serotiplendirme ve genotiplendirme metotlarıyla onaylanmalıdır (Esendal, 2002; OİE, 2008).

1.5.1.2. IBV Antijenlerinin Saptanmasına Dayalı Konfirmasyon

IBV'nin direkt olarak saptanmasında postmortem materyaller veya embriyolu tavuk yumurtasında çoğaltılan virüsler, IBV spesifik poliklonal serumlar veya monoklonal antikorlar kullanılarak uygulanan immunofloresan, immunohistokimyasal veya immunoperoksidaz teknikleriyle incelenebilmektedir. Ancak direkt saha örneklerinden elde edilen sonuçların değerlendirilmesi spesifik olmayan reaksiyonlardan dolayı her zaman kolay değildir. Trakeal materyaller ve

allantoiksıvılar için agar jel presipitasyon (AGP) testi kullanılabilir. AGP, beklenenden daha duyarlı bir testtir çünkü infekte tavuk embriyosundaki IBV presipitan antijenin miktarı bazen düşük olabilmektedir. Ayrıca koriyoallantoik membran kesitleri veya allantoik sıvı hücre sedimenti, immunofloresan veya immunoperoksidaz testleriyle incelenebilmektedir. IBV ile infekte edilmiş trakeal organ kültürü (TOK) fıkzasyon yapmadan düşük güçte (10x) büyütmede immunofloresan tekniğiyle test edilebilmektedir. IBV ile infekte allantoik sıvılardan ve trakeal organ kültüründen indirekt olarak monoklonal antikorlarla veya antijen-capture ELISA ile serotip olarak identifiye edilebilir (de Wit, 2000; Jackwood ve de Wit, 2013).

1.5.1.3. IBV'nin Moleküler Yöntemlerle Konfirmasyonu

IBV'nin direkt olarak klinik örneklerden saptanmasında real time RT-PCR testi (kantitatif PCR/q-PCR) gittikçe daha yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Callisson ve ark., 2006). Bu test kullanılarak, kısa zaman içinde fazla sayıda materyal daha düşük maliyetli olarak incelenebilmekte ve örnekteki viral nükleik asit seviyesi belirlenebilmektedir (Jackwood ve de Wit, 2013).

Konvansiyonel RT-PCR'da ise IBV nükleik asidinin belirlenmesinde pozitif sonuç alabilmek için ETY'de virüs genetik materyalinin çoğaltılması gerekebilmektedir. RT-PCR'ın spesifitesi ve sensitivitesi örneğin türüne göre değişebilmektedir. Klinik örnekler (örneğin; trake, böbrek, dışkı vb.) spesifik olmayan inhibitörleri içerebilir ki bu durum PCR sensitivitesini düşürecektir. Bu durumda istemeyen inhibitörlerin ortadan kaldırılması için RT-PCR öncesi tercih edilecek olan RNA'nın saflaştırılması gerekmektedir. Reaksiyon performansını etkileyen diğer önemli etki ise örnek içinde bulunan Mg^{2+} ve Mn^{2+} gibi iyonların miktarıdır. Bu yüzden her teknikte olduğu gibi RT-PCR uygulamasında da bu gibi örnekler için en ideal reaksiyonun doğrulanması gerekmektedir. Ayrıca testin performansını ve olası kontaminasyonları kontrol etmek için uygun kontrollerin kullanılması gerekmektedir (Jackwood ve ark., 1997). RT-PCR'da uygun primer

seçimi test spesifitesi için esastır. Eğer grup spesifik bir uygulama gerekiyorsa çoğaltılacak gen bölgesinin tüm IBV suşlarını içeren korunmuş bir bölge olması gerekir. Eğer kullanılan primer bütün IBV'leri saptayamıyorsa yanlış negatif sonuçlar meydana gelecektir (de Wit, 2000). RT-PCR testinin temel kullanımı virüs identifikasyonu ve IBV salgınlarının epidemiyolojisinin anlaşılabilmesidir. Ancak bu test IBV tiplerini belirlemede yeterli değildir ve viral patojenite hakkında bilgi vermemektedir (de Wit, 2000; OIE, 2013; Jackwood ve de Wit, 2013).

Nested RT-PCR, konvansiyonel RT-PCR ile karşılaştırıldığında daha uzun bir bölgenin amplifikasyonunun ardından bu bölgenin içerisinde yer alan daha kısa bir bölgeye yönelik ikinci bir amplifikasyon uygulandığı için daha spesifik ve duyarlıdır (Cavanagh ve ark., 1998; Cavanagh ve ark., 1999). Bazı örneklerde viral RNA'nın az miktarda olması durumunda ancak nested RT-PCR kullanılabilir. Nested RT-PCR çok duyarlı bir test olduğu için rutin teşhiste kullanımı çapraz kontaminasyon riskine daha açık yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceği düşüncesiyle hala tartışmalıdır. Sonuç olarak, RT-PCR testinin sadece viral nükleik asidi saptayabildiği ancak IBV tiplerini belirlemede yeterli olmadığı bilinmelidir (de Wit, 2000; Jackwood ve de Wit, 2013).

1.5.1.4. IBV'nin Tiplendirilmesi

IBV saha suşlarının izolasyonu ve tiplendirilmesi virüsün evrimsel gelişimini takip etmek ve etkili aşı programlarının geliştirilmesi için önemlidir. Serotiplendirmede kullanılan HI ve VN testleri doksanlardan sonra yerini RT-PCR'a bırakmıştır. Saha suşlarının ayırımında ve identifikasyonunda immünolojik tiplendirmenin yanı sıra RT-PCR ile çoğaltılan cDNA'nın dizilendirilmesi veya restriction fragment length polymorphism (RFLP) gibi yöntemler genotiplendirmede kullanılmaktadır (Cavanagh, 1991; Jackwood ve ark., 1997; Keeler ve ark., 1998; Kusters ve ark., 1989; de Wit, 2000; Jackwood ve ark., 2005). Ayrıca viral genomun S1 gen dizilerinin karşılaştırılması son dönemde aşı çalışmalarında VN ile serotiplendirmeden daha çok umut vaat etmektedir (Cook ve ark., 2012; Landman ve ark., 2006; Mahmood, 2009).

1.5.1.4.1. Serolojik Yöntemler

Virüs serotipi Virüs nötralizasyon (VN) veya hemaglütinasyon inhibisyon (HI) testleriyle belirlenebilir. VN testi ETY veya TOK kullanılarak uygulanabilir. Test, zahmetli ve zaman alıcıdır. HI testinin dezavantajı ise spesifik olmayan çapraz reaksiyonların olabilmesidir. Günümüzde VN ve HI testlerinin yerine moleküler tabanlı testler almıştır (Jackwood ve de Wit, 2013).

1.5.1.4.2. Genetik (Moleküler) Yöntemler

IBV olarak saptanan PCR ürünleri; dizilendirme, restriction enzyme fragment length polymorphism (RFLP) veya hibridizasyon teknikleriyle tiplendirilir. Bu yöntemlerle RT-PCR reaksiyonunun spesifitesi onaylanmış olur. Örneklerde IBV tiplerini tanımlamak için S1 genine ait ampliconlar incelenmelidir. Genotiplendirme metodları, kısa sürede çok çeşitli IBV tiplerini belirlenebilmesi açısından avantajlıdır. S1 genine ait ampliconların RFLP analizi ile gene özgü elektroforez bant paternleri değerlendirilerek IBV tipleri ayrımlanabilmektedir (Kwon ve ark., 1993; Lin ve ark., 1991). Suş ya da tip spesifik primerler kullanılarak genotip spesifik RT-PCR kullanılarak Mass, Conn, Ark, JMK, DE/072/92 ve California virüsleri tiplendirilmiştir (Keeler ve ark., 1998). IBV için en çok kullanılan genetik tiplendirme metodu S1 geni veya S1 genindeki çok değişken bölgelere ait dizilerin çoğaltılıp dizilendirilmesidir. Bu bilgi herhangi bir IBV tipini belirlemek için tanı amaçlı kullanılabileceği gibi daha önceden bilinmeyen saha suş ve varyantlarının saptanmasında da kullanılabilir (Kingham ve ark., 2000; Lee ve ark., 2003; Moore ve ark., 1998; Nix ve ark., 2000). Bilinmeyen saha izolatları ve varyantların filogenetik analizlerinin referans suşlarla olan potansiyel ilişkilerini belirlemek için kullanılabilmesi dizilendirme yönteminin en önemli avantajıdır (Jackwood ve de Wit, 2013).

1.5.1.5. Serolojik Tanı

IBV'nin serolojik tanısı serumda bu virüse karşı oluşan antikorların saptanmasına dayanmaktadır. Serum örneklerinin belli zaman aralığında test edilmesi (örneğin klinik belirtilerin başlangıcı ve 2 veya 3 hafta sonra) serolojik teşhiste en ideal yaklaşımdır. Bu yöntem aynı zamanda aşı takibi ve aşı sonuçları için de kullanılır (Anonim; Esendal, 2002). Klinik tablonun oluşumuyla iyileşme dönemi arasında, IBV'ye karşı oluşmuş olan antikor titresinin tespit edilmesi IBV enfeksiyonunun tanısında kullanılmaktadır. Nükleokapsid (N), Membran (M) proteinleri ve Spike 2 (S2) proteinin korunumlu bölgesi içindeki aminoasit benzerliğiyle bağlantılı olarak tüm IBV serotiplerinde ortak epitoplara (grup spesifik antijenler) bulunmaktadır. Meydana gelen ilk IBV enfeksiyonunda oluşan tüm antikor yanıtı serotip-spesiftir. Daha sonra meydana gelen ikinci enfeksiyon aynı serotiple bile olsa, serumda daha geniş bir antikor yanıtı meydana gelir. Çünkü işletmelere ait tavukların tümü modifiye canlı aşılar ve ölü aşılarla IB'ye karşı aşılanmaktadır. Dolayısıyla sahadan elde edilen serumlar serotiplendirme için çok kullanışlı değildir. SPF tavuklar kullanılarak, deneysel olarak indüklenen serumlar serotiplendirme için kullanılmalıdır. ELISA, immunofloresan ve AGP testlerinin tümü grup spesifik antijenlere karşı oluşmuş olan antikorlara bağlandığı için serotip ayırımında kullanılamamaktadır (Jackwood ve de Wit, 2013). Günümüzde ELISA, IBV'ye karşı oluşan antikorların test edilmesinde en çok kullanılan yöntemdir. Test kısa sürede, az maliyetle fazla sayıda örneğin incelenmesine olanak sağlar (Mockett ve Derbyshire, 1981). ELISA tekniği oldukça duyarlı bir metottur. Tip veya suş spesifik olmayışı test için dezavantajdır, ancak saha koşullarında aşı titresinin belirlenmesi veya sürüdeki güncel IBV durumu ile ilgili bilgi vermesi açısından oldukça önemlidir. ELISA için ticari kitler bulunmaktadır. Bu kitler IBV antikorlarını saptamak için birçok farklı stratejiyi temel alabilir. Genellikle bu testler üretici firma tarafından geliştirilmiş ve test edilmiştir. Bu yüzden, ELISA'yı uygulayan kişinin üretici firma talimatlarına uyması oldukça önemlidir. ELISA, IBV enfekte sürülerde enfeksiyonun tespiti (broyler) için de yaygın olarak kullanılmaktadır. Eğer IB, çiftlikteki yakın sürülerde de görülürse bu durumda virüs

izolasyonu yapılmalı ve virüs RFLP veya S1 gen dizilendirme yöntemleriyle genotiplendirilmelidir (Anonim; Jackwood ve de Wit, 2013; OIE, 2013).

Bazı durumlar IBV antikor tespitini etkileyebilmektedir. Örneğin infeksiyonun meydana geldiği dönemde sürü yaşı veya aşılama durumu, infeksiyon veya aşılama sırasında maternal antikorların varlığı veya aşılama sırasında bağışıklığın olması, örneklenen tavuk sayısı (serum konversiyonunu tespit etmek için örneklenmesi gereken tavuk sayısı hastalığın prevalansına ve test sensitivitesine bağlıdır) etkili olabilmektedir. Ayrıca serotipler arası çapraz reaksiyonlar, yeni ve tahmin edilmeyen IBV tiplerinin varlığı antikor tespitini etkileyen faktörlerdendir (de Wit, 2000).

1.5.1.6. Ayırt Edici Tanı

IB'nin klinik tablosu ND, ILT, düşük-patojen avian influenza ve infeksiyöz koriza gibi diğer akut solunum sistemi hastalıklarının hafif formlarıyla karışabilmektedir. Paramyxovirus tip 1'in velojenik viserotropik veya nörotropik suşları, IBV'den daha yüksek mortalite yaratır. Lentojenik ND virüs infeksiyonlarıyla pnömotropik suşları ve avian influenzanın düşük patojeniteli suşları düşük-değişken olabilecek düşük mortaliteli solunum sistemi hastalıkları meydana getirir. Bu suşlar IB infeksiyonlarıyla karışabilmektedir. İnfeksiyöz laringotrakeitis sürüde yavaş yayılma eğilimindedir ama IB'den daha çeşitli semptomlar meydana getirir. İnfeksiyöz koriza ise IB'de sık rastlanmayan tipik bulgusu yüzde meydana gelen şişkinlikle ayrımlanabilir. IBV'de meydana gelen yumurta üretiminde düşüş ve kabuk kalitesindeki bozulmalar NDV, AI, ILT, *Haemophilus gallinarum*, kanatlı mikoplazması ve Egg Drop Sendrom (EDS) adenovirus ile benzerlik gösterir fakat EDS'de farklı olarak yumurta iç kalitesi etkilenmez (Jackwood ve de Wit, 2013).

1.6. Sağaltım

Bu hastalık için herhangi bir tedavi uygulanmamaktadır. İkincil bakteriyel infeksiyonların önüne geçebilmek için geniş spektrumlu antibiyotikler kullanılabilir.

Uygulanan biyogüvenlik, sanitasyon ve karantina önlemlerine karşı etkenin bulaşıcı karakteri genellikle bölgede bulunan tüm duyarlı kanatlıları tehdit eder. Virüse karşı bağışıklık kazanan hayvanlar infeksiyondan kurtulurlar. Virüs ısıyla ve sıradan dezenfektanlarla kolayca yok edilebilir (Esendal, 2002).

1.7. Koruma ve Kontrol

1.7.1. Koruma

İnfeksiyöz bronşitis, kanatlı yetiştiriciliğinde ekonomik kayba neden olan hastalıklardan bir tanesidir ve meydana gelen kaybın büyüklüğü pek çok faktöre bağlı olarak değişir. Virüs suşları, infeksiyon sırasında sürünün yaşı, beslenme durumu ayrıca gerek kümes içi gerekse çevre koşulları gibi faktörlere bağlı olarak hastalığın boyutu değişmektedir. Birçok kümesin bir arada olduğu çiftliklerde tavukları IBV'den korumak neredeyse imkansızdır. Virüsün yayılması karşısında biyogüvenlik önlemleri yetersiz kalacaktır. IB aşılması ile ilgili uzun yıllardır humoral bağışıklık yanıtıyla ilgili çalışmalar yapılmaktadır, ancak saha suşlarının veya aşı suşlarının hücresel bağışıklığa olan etkisiyle ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır (Cavanagh, 2007).

1.7.2. Aşılama ile Kontrol

IB'nin aşılama ile kontrolü yaklaşık yarım yüzyıldır uygulanmaktadır. Canlı aşılar genellikle et-tipi yetiştiriciliklerde kuluçkahanelerde 1 günlük civcivlere uygulanır. Deneysel koşullarda virulent homolog virüs ile yapılan aşılamalarda 3 hafta içerisinde bağışıklığı yeterli sağlamadığı görülmüştür. Bazen yakın gözetim altında yapılan çalışmalarda bile homolog suşla aşıl原因an civcivlerden %10'nunda koruyucu immün yanıtı uyatabilecek cevabın alınmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar tavuklarda IBV aşılmasında tek tip yanıt meydana gelmediğini göstermektedir (Cavanagh, 2007).

Dünya’da en yaygın kullanılan Mass serotipini içeren aşıdır. Hatta birçok ülkede izin verilmiş olan tek aşıdır, ama başka yerlerde birden fazla aşıya izin verilmiştir. Belli bir serotip veya genotipe ait aşılar normalde iyi aşılanmış olan hayvanları birden fazla suşa karşı korumaktadır. Genellikle diğer protektotiplere, serotiplere ve genotiplere karşı düşük veya yüksek kısmi bir koruma sağlamaktadır. Aşı’ya karşı şekillenen yanıt birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Cıvcivin yaşı, maternal antikor seviyesi, aşının immunojenitesi, mücadele edilen saha suşunun virülensi, aşılama ile virüsle karşılaşma arasında geçen süre, konağın bağışıklanma yeteneği aşılamayı etkilemektedir. Optimal koşullarda aşılanan tavuklar, uzun süreli bağışıklanabilir, broylerde bu durum hayat boyu sürebilir (de Wit ve ark., 2010). Ancak, bunun aksine koruma kısa süreli de olabilir. Aşılamadan sonra 9. haftada titrede düşüş başladığı bildirilmiştir. Yumurtacılar da canlı aşılarla aşılama yaşamları süresince birçok kere tekrarlanır. IBV’nin sorun olduğu bölgelerde üretim süresi kısa olan broyler yetiştiriciliklerinde bile aşılamaların tekrarı yapılabilmektedir. İzleyen aşılarda farklı serotiplerin kullanılması diğer serotiplere karşı daha geniş bir koruma sağlayabilmektedir (Cavanagh, 2007). Antijenik olarak farklı iki canlı attenüe aşı suşu ile (Mass ve 4/91 gibi) aşılama sonucunda birçok IBV tipine karşı kapsamlı bir çapraz koruma sağlandığı görülmüştür (Cook ve ark., 1999; Terregino ve ark., 2008). Bu aşılar iki hafta arayla uygulandığında ikisinin aynı anda uygulandığı durumdan daha kapsamlı bir çapraz koruma oluşur. Canlı aşı ile aşılamının etkisi saf hatlarda çeşitlilik göstermektedir. Örneğin bireyler arasındaki genetik farklılık bağışıklık yanıtının etkisini değiştirmektedir (de Wit ve ark., 2010).

Nefropatojenik IBV suşuna karşı geliştirilmiş ticari bir aşı bulunmamaktadır. Ama deneysel olarak bu aşı çalışılmıştır. Homolog attenüe suşla sprey olarak aşılamadan 4 hafta sonra saha suşuna maruz bırakılan hayvanlarda mortalite tamamen azalmıştır. Maruz bırakılan virüs immunflorasan görüntülemeyle böbreklerde incelenmiştir. Bu teknikle böbreklerinde virüs saptanan tavukların oranı homolog aşı ile aşılamayla %84 oranında düşürülebilmektedir. Aynı etki heterolog aşılamada meydana gelmemiştir (Cavanagh, 2007).

1.7.2.1. İnaktif, Altünite ve Vektör Aşılar

İnaktif yağ-emülsiyonlu IBV aşıları 1960 ve 1970’li yıllarda geliştirilmiştir. Amaçlanan, yumurtacılarda uzun süreli bağışıklama sağlayıp yumurta veriminde düşüşün önüne geçmektir. İnaktive aşıların tek sefer uygulanması yumurta verim kayıplarına karşı çok az veya hiç koruma sağlamamış, trakedeki siliar aktivite kaybına karşı hiçbir koruma oluşturmamıştır (Cavanagh, 2007).

Pürifiye inaktif IBV aşıları solunum sistemi infeksiyonlarına karşı belli derecede (genellikle < %59) bir koruma sağlamaktadır. Özellikle yumurta verimindeki kayıpların önüne geçilmesinde inaktif IBV aşılarının kullanımı başarılı olmuştur. Ancak yumurtacılarda genel uygulama iki-üç haftalık yaşta canlı aşı ile aşılama sonrasında canlı aşıların tekrarları ve yumurtlamaya başlamadan kısa bir süre önce inaktif aşı ile aşılama şeklindedir. Subunit aşılar S1 spike proteini saflaştırılıp, baculovirüslerde çoğaltılarak elde edilmiştir. Aşılama sonucunda koruyucu bağışıklık yanıtı uyarılsa da aşının birkaç tekrar gerektirmesi ve koruma sağlanan tavukların çok düşük olması bu aşının ticari bir aşı olarak kullanımı için oldukça elverişsiz bulunmuştur (Cavanagh, 2007)

S1 proteini ayrıca tavuk çiçek virüsü ve adenovirüs vektörü kullanılarak tavuklarda sentezlettirilmiştir (Johnson ve ark., 2003). S1’in tavuklarda patojen olmayan adenovirüs vektörü tek sefer verilerek çoğaltılması %90-%100 koruma sağlamıştır. Vektörün kuşlarda solunum sisteminde iyi çoğalması başarılı sonuç alınmasında etkili olmuş olabileceği öne sürülmüştür (Cavanagh, 2007).

Bu çalışmada, Türkiye'nin broyler yetiştiriciliği yapılan tüm bölgelerinde IB şüpheli sürülerde, tek basamaklı nested RT-PCR yöntemi ile tespit edilen IBV'lerin S1 geninin dizilendirilmesine dayalı moleküler karakterizasyonu ile ülkemize ait varyant virüs suşlarının varlığının ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Test Materyali ve Pozitif Kontroller

Klinik olarak hastalık semptomları gösteren 13 ticari tavuk işletmesine ait 200 küsmesten toplanan ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kanatlı Hayvan Hastalıkları Rutin Teşhis Laboratuvarı'na gönderilen trakeler, trakeal svaplar ve organ materyalleri (akciğer, ileo-sekal tonsiller, böbrek) 5-10 organ / trakeal svap olarak havuzlanarak test materyali olarak kullanıldı.

Örnekleme hastalığın klinik bulguları ortaya çıkar çıkmaz yapıldı, örnekler soğuk zincir kırılmadan laboratuvara ulaştırılıp işlendi ve hemen işleme alınmayan örnekler ise kısa süreli olarak -20°C' de, daha uzun süre bekletilen örnekler -70 °C dondurularak saklandı. Akut solunum sistemi semptomları bulunan canlı hayvanların üst solunum yollarından svaplarla veya nekropsi sonrası trakeleri alınarak örnekleme yapıldı. Nefrit problemi görülen hayvanlardan solunum sistemi materyallerine ek olarak böbrek ve ileosekal tonsiller alındı. Örneklerle ait bilgiler Çizelge 2.5'te özetlenmiştir.

Ayrıca, Türkiye'de kullanılan ticari IBV aşıları da moleküler tiplendirme ve testlerde pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere incelendi. Çalışmada IBV' ye ait H120, 4/91 ve Ma5 aşı suşları pozitif kontrol olarak kullanıldı.

2.1.2. Testlerde Kullanılan Tampon Solüsyonlar, Çözeltiler ve Kitler

Çizelge 2.1. Kullanılan tampon solüsyonlar, çözeltiler ve kitler.

No.	Tampon/ Solüsyon	Üretici Firma	Orjini
1.	Dietilpirokarbonatlı Su (DEPC-treated water)	Thermo Scientific	ABD
2.	Etanol Solüsyonu (% 75'lik)	Sigma Aldrich	ABD
3.	İzopropanol Solüsyonu	Sigma Aldrich	ABD
4.	Kloroform Solüsyonu	Sigma Aldrich	ABD
5.	Phosphate Buffered Saline (PBS) Solüsyonu	Oxoid	İngiltere
6.	Tris Borate EDTA Buffer (TBE, x10)	Thermo Scientific	ABD
7.	TRİzol® Solüsyonu	Ambion /Life Technologies	Carlsbad/ABD
8.	RNeasy Mini Kit	Qiagen	ABD
9.	QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen	ABD
10.	Agarose	Prona, Biomax	İspanya
11.	Sephadex®	GML	Altendorf/İsviçre
12.	RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific	ABD
13.	SuperScript III One Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen/ Life Technologies	ABD

2.1.3. Testlerde Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Çizelge 2.2. Testlerde kullanılan cihaz ve ekipmanlar.

No.	Ekipman	Üretici Firma	Orjini
1.	Jel Elektroforez Cihazı	Thermo Scientific	ABD
2.	Elektroforez Güç Kaynağı	Thermo Scientific	ABD
3.	Hassas Terazı	Scaltec	ABD
4.	pH Metre	Model 420A	Hollanda
5.	Santrifüj	Heraeus Pico 17 Thermo Scientific	ABD
6.	Biyogüvenlik Kabin	Thermo Scientific	Almanya
7.	Isı Bloğu	Bio TDB-100	Letonya
8.	Nano-Drop Spektrofotometre Cihazı	Thermo Scientific	ABD
9.	ThermalCycle	Thermo Scientific	ABD
10.	Güç Kaynağı	Elite 300 Plus Power Supply	ABD
11.	UV-Transilluminatör	Gene Genius, Syngene, Bio Imaging System	ABD
12.	Fotoğraf Makinesi	Digital Graphic Printer, UP-D895, Sony	ABD
13.	Vorteks	Fine Vortex	Kore
14.	TissueLyzer	Qiagen	ABD

2.1.4. Embriyolu Tavuk Yumurtasına (ETY) Ekilerek Kullanılan Materyaller

Laboratuvarımıza 2011-2012 yılları içerisinde gönderilip -70 °C’ de dondurularak muhafaza edilmiş olan 125 kümese ait organ materyalinden hazırlanan inokulumlar 9-11 günlük patojenlerden ari ETY'nin koriyoallantoik boşluğuna her örnek için 3'er adet yumurta kullanılıp, 3 kez pasajlanarak etken izolasyonu gerçekleştirildi.

SPF embriyolu tavuk yumurtaları Ankara Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi.

2.1.5. RT- PCR Testinde Kullanılan Primer Çiftleri

Çizelge 2.3. Kullanılan primer çiftleri.

Primer	Oligonükleotid Dizisi	Gen	Ürün	Referans
f-XCE1	5'-CACTGGTAATTTTTCAGATGG-3'	S1	380bp	Rimondi ve ark. (2009)
r-XCE3	5'-CAGATTGCTTACAACACC-3'			
CU2	5'-TGGTTGGCATTACAYGG-3'	S1	609bp	Rimondi ve ark. (2009)
IBVrev	5'-CCATCTGAAAAATTACCAGT-3'			
FOR1	5'-CTTTTGTTCGACTATGTAG-3'	S1	878bp	Pohuang ve ark. (2009)
RE3	5'-TAATAACCACTCTGAGCTGT-3'			
FOR2	5'-CAGTGTTTGTACACATTGT-3'	S1	400bp	Pohuang ve ark. (2009)
RE2	5'-CCATCTGAAAAATTGCCAGT-3'			
F-Oligo S15' mod	5'-TGAAACTGAACAAAAGA-3'	S1	700bp	OIE, (2008)
R - CK2	5'-CNGTRTTRTAYTGRCA-3'	S1	700bp	OIE, (2008)

2.1.6. IBV Pozitif RT-PCR Ürünlerinin Dizi Analizi

PCR ürünleri, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, ABD) üretici firma tarafından belirtilen talimatlara göre reaksiyon başına 30 ng template kullanılarak direkt olarak dizilendirildi. Dizilendirmede yöntem olarak dideoksi zincir sonlanma reaksiyonu kullanılmış olup, ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) kapiller elektroforez sistemi ile gerçekleştirildi..

2.1.7. Testlerde Kullanılan Pozitif Kontroller

Çizelge 2.4. Kullanılan pozitif kontroller.

No.	Aşı Suşu	Üretici Firma	Orijini
1.	Ma5/ Canlı Aşı	Nobilis, Intervet	Holland
2.	H120/ Canlı Aşı	Nobilis, Intervet	Holland
3.	4/91/ Canlı Aşı	Nobilis, Intervet	Holland

2.2. Yöntem

2.2.1. Örnekleme

Çalışmada, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kanatlı Hayvan Hastalıkları Rutin Teşhis Laboratuvarı'na 2011-2014 yıllarında solunum sistemi semptomları gösterip IBV şüphesiyle gönderilmiş, toplam 200 kümese ait organ veya trakeal svap örnekleri kullanıldı. Bu örneklerden 125 kümes materyali anabilim dalına 2011-2012 yıllarında gönderilmiş olup -70°C'de dondurularak muhafaza edildi. Diğer 75 kümese ait materyaller, direkt organ materyali olarak ETY'ye ekilmeden doku homojenizasyonları yapıldıktan sonra RNA izolasyonuna tabi tutuldu. Örneklenen işletmelerin bölge olarak dağılımı, kümes sayısı ve örnek türü Çizelge 2.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. Örneklenen işletmelerin bölge olarak dağılımı, kümes sayısı ve örnek türü.

İşletme	Bölge	Örneklenen Kümes Sayısı	Örnek Türü
İşletme 1	Ege	13	Trake (5-10 Hayvan-Havuz)
İşletme 2	Ege	6	Trake (5-10 Hayvan-Havuz)
İşletme 3	Ege	4	Trakeal swap (10 Hayvan-Havuz)
İşletme 4	İç Anadolu-Batı Karadeniz	50	Trake (5-10 Hayvan-Havuz), 3 kümesten Sekal Tonsil
İşletme 5	İç Anadolu-Batı Karadeniz	5	Trake (5-10 Hayvan-Havuz)
İşletme 6	İç Anadolu-Batı Karadeniz	50	Trake (5-10 Hayvan-Havuz)
İşletme 7	Marmara	19	Trake (5-10 Hayvan-Havuz)
İşletme 8	Marmara	1	Trake (5-10 Hayvan-Havuz)
İşletme 9	Marmara	3	Trake (5-10 Hayvan-Havuz)
İşletme 10	Akdeniz	3	Trake (5-10 Hayvan-Havuz)
İşletme 11	Akdeniz	31	Trake-Akciğer (5-10 Hayvan-Havuz) 1 kümesten Böbrek
İşletme 12	Doğu Anadolu	10	Trake (5-10 Hayvan-Havuz)
İşletme 13	Orta Karadeniz	5	Trake (5-10 Hayvan-Havuz)

2.2.2. Embriyolu Tavuk Yumurtasına (ETY) Ekim Yöntemi

Eksi yetmiş santigrat derecede dondurularak muhafaza edilmiş olan 125 kümese ait organ materyalinden etkenin izolasyonu ETY'ye ekilerek gerçekleştirildi. Bu amaçla Office International Epizooties Terrestrial Manual (OIE, 2008)'inde belirtilen protokol uygulandı. Trake ve ileosekal tonsillerden oluşan materyal grubu OIE' de anlatıldığı şekliyle ön muameleye tabi tutuldu. Materyaller, antibiyotik (10,000 IU/ ml penicilin, 10,000 µg/ml streptomisin) ve 25 µg/ml Amfoterisin B içeren tamponlanmış fosfat tuzuyla (phosphate-bufferedsaline, PBS) (pH 7,0 veya 7,2) %20 ağırlık/hacim oranında karıştırılarak homojenize edilip, sonrasında düşük devirli olarak santrifüje (1500 x g 15 dk.) edildi. PBS'e alternatif olarak nutrientbroth ve organ materyalleri için doku kültür medyumunu kullanılabildiği belirtilmiştir (OIE, 2008).Üst sıvı toplanarak 0,22-µm'lik-sterilpolietersülfon filtreden geçirildi. Filtre edilmiş olan üst sıvı 9-11 günlük özel patojenlerden arı (specific pathogen free, SPF) ETY'nin koriyo-allantoik boşluğuna her örnek için 3'er yumurtaya steril insülin enjektörü ile 0,2 ml miktarında inoküle edildi. Yumurtaların inkübasyonu 37 °C'de ayarlı etüvlerde altı gün boyunca her gün ooskopa canlılık kontrolleri yapılarak gerçekleştirildi. İlk 24 saat içinde meydana gelen ölümler non-spesifik olarak değerlendirildi. İkinci günden sonra ölen yumurtaların allantoik sıvıları toplanmaya başlandı, altıncı gün yumurtalar +4°C'de 4-6 saat bekletilerek inkübasyon sonlandırıldı. İnkübasyonu sonlandırılan yumurtalardan da allantoik sıvılar toplandı ve her örneğe ait allantoik sıvılar havuz yapıp antibiyotikli PBS ile 1/5 veya 1/10 oranında seyreltilerek toplamda 3 pasaj olacak şekilde ETY'de pasajlanmaya devam edildi. OIE (2008)'ye göre IBV' nin birincil izolasyonu için hücre kültürü tavsiye edilmemektedir. Tüm allantoik sıvılar kısa süre için -20 °C' de daha uzun süre depolanacak olanlar -70 °C' de muhafaza altına alındı.

2.2.3. Nested-RT PCR

2.2.3.1. RNA Ekstraksiyonu Öncesi Örneklerin Hazırlanması

ETY'ye 3 kere pasajlanmış olan 125 küme ait materyalden her birinin 1. pasaj, 2. pasaj ve 3. pasaj korio-allantoik sıvılarından RNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi ancak teşhis amaçlı olarak 3.pasaj allantoik sıvıları kullanıldı.

Diğer 75 küme ait organ materyalleri (akciğer, trake, iliosekal tonsil, böbrek) ve trakeal svaplar homojenize edildikten sonra RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Organ örnekleri PBS ile 1/10 ağırlık/hacim'i aşmayacak şekilde sulandırılıp Tissue Lyzer cihazı kullanılarak homojenize edildi. TRİzol kit protokülünde PBS'e alternatif olarak doku homojenizasyonunun TRİzol solüsyonu (1/10 w/v) ile gerçekleştirilebileceği belirtilmektedir. Geriye kalan trakeal svap örnekleri ise (10 adet/küme) havuz yapılarak 1 ml PBS ile 20-30 saniye vortekslenip, iyice karışmış olan homojenattan 100-200 µl alınıp RNA izolasyonu için kullanıldı.

2.2.3.2. RNA Eldesi (Ekstraksiyonu)

RNA izolasyonu için OIE (2008) ticari kitlerin kullanımını önermektedir. En ideal RNA izolasyonunu belirlemek için 2 farklı prensibe (spin kolon yöntemi ve guanidium tiyosiyanat fenol-kloroform ekstraksiyonu) dayanan ticari kitler kullanıldı. Bu amaçla RNeasy Mini Kit, QIAampViral RNA Mini Kit ve TRİzol® solüsyonu pozitif kontrol olarak kullanılan Ma5, H120, 4/91 aşılı suşlarının izolasyonu için üretici firma tarafından önerilen prosedürle denendi. Her üç yöntemle de RNA izole edildi. Daha sonrasında organ materyallerinden RNA izolasyonunda TRİzol solüsyonu daha etkili bulunduğu için RNA izolasyon yöntemi olarak guanidium tiyosiyanat fenol-kloroform ekstraksiyon prensibine dayalı yöntemle teze devam edildi (Kingham ve ark., 2000; Liu ve Kong, 2004).

2.2.3.2.1. Saha Örneklerinden Viral RNA Eldesi

Saha örneklerinden RNA izolasyonu amacıyla TRIzol® solüsyonu (Ambion, Invitrogen) üretici firma tarafından önerilen prosedür doğrultusunda kullanıldı. Biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilen bu prosedüre göre, homojenize edilen organ ve trakeal svap materyalleriyle toplanıp havuzlanan korio-allantoik sıvılar steril, deoksiribonukleaz (DNase) ve ribonukleaz (RNase) enzimlerinden arı ependorflar içerisine konuldu. Üzerlerine homojenizasyonda kullanılan örnek hacmi TRIzol solüsyon hacminin % 10'nunu geçmeyecek şekilde TRIzol denatürasyon solüsyonundan 1'er ml eklenerek vortekslendi ve nükleoprotein komplekslerinin ayrıştırılması için örnekler oda sıcaklığında 5 dakika tutuldu. Bu homojenizasyon koriyo-allantoik sıvılar için TRIzol ile eşit hacimde (400-500 µl) kullanıldı (Adzhar ve ark., 1997). Daha sonra örnekler üzerine 200 µl kloroform eklendi, 15 saniye vortekslendi ve oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda örnekler faz separasyonu için, soğutmalı santrifüjda, +4 °C'de, 12000 devirde 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında karışım kırmızı renkli alt faz (fenol-kloroform fazı), beyaz renkli ara faz ve de renksiz üst sıvı faz olarak ayrıldı. DNA ve proteinler ara ve alt fazda toplanırken RNA renksiz olan üst fazda toplandı. Üstteki sıvı faz yeni hazırlanmış steril ependorf tüpleri içine alındı. Bir mililitre TRIzol'e 0,5 ml izopropanol olacak şekilde örnekler ilave edildi. Örnekler oda sıcaklığında 10-15 dakika kadar tutulduktan sonra 10 dakika, +4 °C'de, 12000 devirde santrifüj edilerek RNA presipite edildi. RNA peleti tüpün dibinde ve yan tarafında jel benzeri bir presipitat oluşturdu. İzopropanol süpernatantı dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Pelet iki kez 1 ml %75'lik etanol ile vortekslenip 7500 devirde 5 dakika santrifüje edilerek yıkandı. Vakum altında ya da havada kurutmak suretiyle RNA peleti 5-10 dakika kurutuldu. RNA peleti, 50 µl % 90'lık DNase, RNase enzimlerinden arı su ile pipete edilerek çözdürüldükten sonra 55-60 °C'de 10-15 dakika inkübe edildi. RT/PCR'da kullanılıncaya kadar -20 °C'de daha uzun süreli muhafaza edilmek istenen örnekler ise -70 °C'de saklandı.

2.2.3.2.2. Aşı Örneklerinden Viral RNA İzolasyonu

Liyofilize halde bulunan aşı virüsleri Ma5, H120 ve 4/91 üzerlerine 1 ml nükleaz ari su ilave edilerek çözündürüldü. Vortekslenerek karıştırıldıktan sonra 100 µl hacim alınarak yukarıda bildirildiği şekilde TRIzol® solüsyonu kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

2.2.3.3. Reverse Transkripsiyon Aşaması

RNA izolasyonu sonrası RNA miktarları ve saflık değerleri nano-drop spektrofotometreyle ölçüldü (Nanodrop, Thermo Scientific). Adzhar ve ark. (1997)'nin önerdiği üzere RNA'lar komplementer DNA'ları (cDNA) sentezlenmeden önce 20 kat sulandırıldı.

2.2.3.4. Nükleik Asitlerin Nested-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Nested-PCR) ile Çoğaltılması

Nükleik asitlerin çoğaltılması öncesinde uygulanan RT aşaması iki basamaklı ve tek basamaklı olarak iki farklı kit prosedürü kullanılarak denendi. PCR yöntemi olarak nested PCR'a karar verildikten sonra uygulaması daha kolay olduğu için ve kontaminasyon riskini azaltmak amacıyla RT aşaması tek basamaklı olarak yapıldı.

İki Basamaklı Reverse Transkripsiyon

Bu amaçla RevertAid RT Kit (Thermo Scientific, USA) cDNA sentez kiti üretici firma talimatlarına uygun şekilde uygulandı. İlk olarak kalıp RNA (2 µl), DNase ve RNase ari su (8 µl), reverse primer (10 pmol/2 µl) toplamda 12 µl olarak her örnek için nükleaz ari ependorflara alındı. Bu karışım 65 °C'de 5 dakika kadar bekletildi sonra direkt olarak buza alındı. İkinci karışım çizelge 2.6.'teki kit bileşenleri belirtildiği miktarda eklenerek hazırlandı ve örnek başına 8 µl olacak

şekilde dağıtıldı. Örnekler vortekslendi ve kısa bir santrifüj sonrasında 42 °C’de 60 dakika cDNA sentezi için inkübasyona bırakıldı. Reaksiyonu sonlandırmak için 70 °C’de 5 dakika ısı bloğunda bekletildi. Elde edilen kalıp cDNA bir sonraki aşama olan nested-PCR’ da hemen kullanıldı ya da daha sonra kullanılmak üzere -20 °C’de kısa süreli olarak muhafaza edildi.

Çizelge 2.6. İki basamaklı reverse transkripsiyon bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
5x Reaksiyon Buffer	4 µl
RiboLockRNase İnhibitörü (20 U/µl)	1 µl
10mM dNTP karışımı	2 µl
ReverAid RT (200 U/ µl)	1 µl
Toplam	8 µl

Elde edilen kalıp cDNA’nın çoğaltılmasında uygulanan nested-PCR yönteminin I. aşamasında 878 bazlık bölgeyi çoğaltan forward FOR1 ve reverse RE3 primer çifti kullanıldı. PCR reaksiyonunun final hacmi 25µl olup, karışım örnek başına 10x PCR buffer 2,5 µl, 25 mM MgCl₂ 3µl, 10 mM dNTP 0,5 µl, forward primer 1 µl, reverse primer 1 µl, taq DNA polimeraz 0,2 µl, nükleaz ari su 14,8 µl olarak hazırlandı. Kalıp cDNA 2 µl olarak reaksiyona sokuldu. Reaksiyon karışımlarının hazırlanması süresince kuru buz üzerinde çalışıldı. Kalıp DNA’nın çoğaltılması aşaması önceden programlanmış olan thermal cycler’da 94 °C 3 dakikalık ön denatürasyonu takiben her biri 94 °C 1 dakika denatürasyon, 54 °C primer bağlanması, 72 °C 1 dakika ekstensiyon şeklinde 3 adımda oluşan toplamda 30 siklusta gerçekleştirildi. Son siklusu izleyen 72 °C’de 7 dakikalık son ekstensiyon aşamasının ardından elde edilen ürünler nested-PCR’ ın ikinci amplifikasyonunda kalıp DNA olarak kullanılmak üzere +4 °C’de saklandı. İkinci amplifikasyon aşamasında, I.’de kullanılan PCR reaksiyon karışımında kullanılan bileşenler aynı

miktarlarda kullanıldı sadece farklı olarak primer çiftleri 400 bazlık bölgeyi çoğaltan forward yönde FOR2 ve reverse yönde RE2 olarak değiştirildi. PCR inkübasyon koşulları I. inkübasyonla aynı şekilde uygulandı. Elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde inceleninceye kadar +4 °C’de, daha uzun süreli kullanım için ise -20 °C’de saklandı.

Tek BasamaklıReverse Transkripsiyon

Tek basamaklı RT-PCR reaksiyonu için SuperScript III One-Step RT-PCR Systemwith Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA) ticari kiti protokolü belirtilen talimatlara göre gerçekleştirildi. Bu amaçla TRIzol solüsyonu ile izole edilen RNA’ların spektrofotometrik ölçümleri yapıldı ve her reaksiyonda 0.01 pg-1 µg aralığında reaksiyona sokuldu. Bu reaksiyon için açık dizileri çizelge 2.4.’de verilen Pohuang ve ark. (2009) tarafından kullanılmış olan 878 bazlık bölgeyi çoğaltan FOR1 ve RE3 primer çifti kullanıldı

Çizelge 2.7. RT-Reaksiyon bileşenleri ve miktarları.

Bileşenler	Miktar
2X Reaksiyon Karışımı	12.5 µl
RNA Template	1 µl
F Primer (10 µM)	1 µl
R Primer(10 µM)	1 µl
Taq (SuperScript Platinum)	1 µl
Nükleaz Ari Su	8.5 µl
Toplam	25 µl

Reaksiyon koşulları SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (İnvitrogen, USA) ticari kit protokolünde tavsiye edilen değerler göz önüne alınarak modifiye edildi.

Çizelge 2.8. RT-Reaksiyon koşulları.

Aşama	Sıcaklık ve Süre
cDNA sentezi	55 °C 30 dk
Ön Denatürasyon	94 °C 2 dk
Denaturasyon	94 °C 15 s
Bağlanma	54 °C 30 s 40 siklus
Ekstensiyon	68 °C 60 s
Son Ekstensiyon	68°C 5 dk

Bu inkübasyon sonunda elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde inceleninceye kadar +4 °C’de, daha uzun süreli kullanım için ise –20 °C’de saklandı.

Tek basamaklı RT ile nested-PCR uygulaması

Tek basamaklı nested-RT PCR reaksiyonu SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (İnvitrogen, USA) ticari kiti protokolünde belirtilen talimatlara göre gerçekleştirildi. Protokolün ilk basamağı olan RT aşamasını da içine alan reaksiyon bir önceki bölümde ayrıntılı olarak anlatıldı. Bu reaksiyonun sonunda elde edilen ürün nested-PCR’ın II. aşamasında 400 bazlık bölgeyi çoğaltan forward FOR2 ve reverse RE2 primer çifti kullanılarak tekrar çoğaltıldı. PCR reaksiyon karışımı örnek başına 10x PCR buffer 2,5 µl, 25 mM MgCl₂ 3 µl, 10 mM dNTP0.5 µl, forward primer 1 µl, reverseprimer 1 µl, taq DNA polimeraz 0,2 µl, nükleaz ari su 14,8 µl olarak hazırlandı. Nested RT-PCR’ ın I. basamağından elde edilen kalıp DNA 2 µl olarak reaksiyona sokuldu. Reaksiyon karışımlarının hazırlanması süresince kuru buz üzerinde çalışıldı. Kalıp DNA’nın

çoğaltılması aşaması önceden programlanmış olan thermal cycler'da 94 °C 3 dakikalık ön denatürasyondan sonra 94 °C 1 dakika denatürasyon, 54°C primer bağlanması, 72 °C 1 dakika ekstensiyon şeklinde toplamda 30 siklusa gerçekleştirildi. Son siklusu takiben 72 °C'de 7 dakikalık son ekstensiyon aşamasının ardından örnekler agaroz jel elektroforezinde inceleninceye kadar +4 °C'de, daha uzun süreli kullanım için ise -20 °C'de saklandı.

2.2.3.5. Nükleik Asitlerin Görüntülenmesi

2.2.3.5.1. Agaroz Jel-Elektroforezi

Nested RT-PCR sonucunda amplifiye olan örneklerin elektroforezinde %1,5'luk agaroz jel kullanıldı. Bunun için 1,5 g agaroz (Prona, İspanya) tartılarak steril bir erlenmayere konuldu. Üzerine TBE (trisborate EDTA) buffer'dan (x 0,5 konsantrasyonda) 200 ml eklenerek karıştırıldı. Mikrodalga fırında bir iki kere çalkalanarak kontrollü şekilde 1,45 saniye kadar kaynatılarak eritildi. Eriyen agaroz soğutulduktan sonra içerisine ethidium bromide (0,5 µg/ml) eklenerek karıştırıldı ve yatay elektroforez cihazının kalıbına döküldü. Hemen tarak yerleştirilerek örneklerin ekleneceği gözler agar üzerinde açıldı. Agar iyice katılaştıktan sonra tarak çıkartıldı.

2.2.3.5.2. Jelin Görüntülenmesi

Agaroz jel elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına jelin yüzeyini kaplayacak şekilde 0,5xTBE buffer konuldu. Nested RT-PCR örneklerine % 20 oranında yükleme boyası (loading dye) eklenip karıştırıldıktan sonra jeldeki gözlere 10 µl'lik hacimlerde yüklendi. Birinci göze 100bp DNA marker eklendi. Elektroforez cihazı güç kaynağına bağlanarak sabit akımda 180 volt'ta 60 dakika elektroforeze edildi. Sonuçlar UV-transilluminator'da incelenerek UV-filtreli polaroid fotoğraf makinası ile görüntülendi.

2.2.4. RT-PCR Ürünlerinin Dizilendirilmesi

PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

RT-PCR sonrası elde edilen ürünler QIAquick Spin Miniprep (Qiagen) kit prosedürüne uygun olarak saflaştırıldı. PCR reaksiyonu sonrası elde edilen 400 bazlık bölge bistüriyle kesilip jelden çıkartıldı. Jeller 400 mg'ı aşmayacak miktarda steril ependorf tüplere alındı ve %1,5'luk agaroz jel için 4 hacim kadar DNA'nın filtreye tutulumunu arttıran QG buffer eklendi. Her 2-3 dakikada bir vortekslendi, 50 °C'de 10 dakika inkübe edilerek jelin tamamen erimesi sağlandı. Karışıma 100 µl izopropanol eklendi. QIAquickspin kolonuna alınan örnekler 13000 devirde 1 dakika santrifüje edildi. Daha sonra 500 µl QG buffer eklenip tekrar 13000 devirde 1 dakika santrifüje edilip süzüntü atıldı. DNA'yı yıkamak için 750 µl PE buffer eklendikten sonra 5 dakika beklendikten sonra 13000 devirde 1 dakika santrifje edilip süzüntü atıldı. QIAquick kolon 1,5 ml'lik steril mikrosantrifuj tüpüne alındı. DNA'yı filtreden süzmek için 50 µl elüsyon tamponu (elution buffer) QIAquick membranının merkezine bırakılıp 4 dakika inkübe edildikten sonra 13000 devirde 1 dakika santrifüje edildi. Saf DNA mikrosantrifuj tüpünde toplandı. Elde edilen DNA, 1 hacim yükleme boyası, 5 hacim örnekle karıştırılıp %1,5 agaroz jelde elektroforez cihazı güç kaynağına bağlanarak sabit akımda 180 volt'ta 30 dakika elektroforeze edildi. Sonuçlar UV-transilluminator'da incelenerek DNA'nın miktarı ve saflığı kontrol edildi.

S1 geni Çok Değişken Bölgesinin Dizi Analizi

Tek basamaklı ve iki basamaklı nested-RT PCR sonucunda pozitifliği saptanan örnekler QIAquick Spin Miniprep (Qiagen) saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırıldı. Saf DNA'lar FOR2 ve RE2 primer çifti kullanılarak BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, ABD) üretici firma tarafından belirtilen talimatlara göre reaksiyon başına 3-30 ng template kullanılarak dizilendirildi.

Dizileme Reaksiyonu

Saflaştırılıp kontrol edilen DNA'lar BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, ABD) kullanılarak dizilendirildi. Saf DNA'lar (cycle sequence) sekans PCR'ı aşamasına tabi tutuldu.

Çizelge 2.9. Dizileme PCR reaksiyonu bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
BigDye Karışımı	2 µl
5X buffer	2 µl
PCR ürünü	1-2 µl
dH ₂ O	2 µl
Primer Forward veya Reverse (3.32 pmol)	2 µl
Toplam	10 µl

Reaksiyon bileşenleri belirtilen oranlarda hazırlanıp örnek başına 8 µl karışım 1-2 µl PCR ürünü toplamda 10 µl olarak 200 µl'lik PCR tüplerine alındı. Dizilendirmek için dizileri önceden bahsedilmiş olan FOR2 ve RE2 primerleri ayrı mikserlerde hazırlanarak kullanıldı. Sekanslar forward ve reverse olarak her iki yönde (çift yönlü dizileme) incelenmiştir. Thermalcycler'da 96 °C' de 1 dakika, 96 °C' de 10 saniye, 50 °C' de 5 saniye, 60 °C' de 4 dakika 25 tekrarlı olarak inkübe edildi. Elde edilen ürünler bağlanmayan ddNTP'lerin ortamdan uzaklaştırılması için tekrar saflaştırıldı.

Sekans PCR'ı Sonucu Elde Edilen Ürünlerin Saflaştırılması

Bu amaçla Sephadex[®] jel filtrasyon sistemi üretici firmanın talimatlarına göre hazırlandı. Toz halde bulunan Sephadex'in 1 gramı 13 ml nükleaz arı su içerisinde çözdürüldü. İyice çalkalanarak homojen hale gelen jelöz kıvamlı karışım 750 µl filtrasyon sisteminde bulunan özel filtreli kolonlara alınıp koleksiyon tüplerine yerleştirildi ve 4600 devirde 2 dakika santrifüj edildi. Koleksiyon tüpünde biriken

sıvı atıldı. Kolonun içinde katılaşıp jel'in bu süreçte çatlamamış olmasına dikkat edildi. Öncesinde elde edilen sekans PCR ürününün tümü (10 µl) kolonun içerisindeki katı jelin ortasına pipet ucu değdirilmeden dikkatlice bırakıldı. Tekrar 4800 devirde 2 dakika santrifüj yapıldı. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı sekans ürünü ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)' a yüklenmek üzere cihaz hazır olana kadar +4 °C'de saklandı.

2.2.5. Dizi ve Filogenetik Analiz

Dizilendirme reaksiyonları yöntem olarak dideoksi zincir sonlanma reaksiyonu olup, ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) ile gerçekleştirildi. Elde edilen diziler BioEdit (Hall, 1999) ile hizalandı ve düzenlendi. S1 gen bölgesindeki hypervariable region 1 ve 2'yi kapsayan DNA dizileri National Center for Biotechnology Information (NCBI)'da bulunan GenBank veritabanında erişimleri olan enfeksiyöz bronşitis virüslerinin tümüyle kıyaslanmak için Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) kullanılarak incelendi. Hizalanan DNA dizileri kullanılarak MEGA versiyon 6'da (Tamura ve ark., 2013), Neighbor-joining metodu ile filogenetik ağaç oluşturuldu. Filogenetik ağaç oluşturulurken 1000 çöz bağla değeri kullanılmıştır (Felsenstein, 1985). Yüzde 50 oranında benzerlik olan dallar üst üste gösterilmiştir (Tamura ve ark., 2004). Referans suşlar ve erişim numaraları: (EU780077.2) isolate IS/1494/06, (HM131453.1) isolate attenuated IS/1494/06, (JX173488.1) Eg/CLEVB2/IBV/012, (KP259312.1) TR8, (JX173489.1) Eg/CLEVB1/IBV/012, (KC533682.1) Eg/1265B/2012, (JX027069.1) IB VAR2, (AF093796.1) isolate Variant2, (FN182274.1) NGA/288/2006, (FN182276.1) NGA/295/2006, (M21969.1) D207, (X52084.1) D3896 S1subunit, (FN182275.1) NGA/293/2006, (AJ441314.1) RF/01/02, (DQ064808.1) Spain/98/313, (HQ123347.1) IRFIBV6, (HQ123352.1) IRFIBV13, (HQ123350.1) IRFIBV9 spike, (HQ123348.1) IRFIBV7, (HQ123357.1) IRFIBV20, (DQ490211.1) Q199, (DQ490210.1) Q176, (DQ490221.1) Vic, (DQ490209.1) Q173, (EU930437.1) SDJY0701, (DQ386098.1) Spain/00/336, (DQ386097.1) Spain/99/327, (AF093795.1) Variant1, (Z83979.1) UK/7/93, (KF809794.1) IBV439, (KF809792.1)

IBV431, (EU283085.1) MassD/Cvial1, (JN022544.1) 6904, (HM194680.1)
ck/CH/LLN/090909, (KF757467.1) (GE3KC577393.1) 55HaN95II, (KC577373.1)
27SDTA01II, (JQ739313.1) ck/CH/LHLJ/111023, (HQ132760.1) GXNN1,
(HQ123365.1) IRFIBV44, (EU283088.1) MassD/C6dpvcontact, (EU283087.1)
MassD/C3dpvvaccinated, (EU283082.1) Mass/Cvial1, (DQ064815.1) Spain/00/339,
(GQ885138.1) THA320352, (KP868573.1) CK/CH/LJL/130908, (KJ425497.1)
ck/CH/LHB/130598, (KJ425495.1) ck/CH/LHB/121040 (KJ425496.1)
ck/CH/LHB/130573, (KJ425508.1) ck/CH/LHN/090909.



3. BULGULAR

3.1. ETY'ye İnokulasyon Sonuçları, Viral RNA İzolasyonu ve Primerlerin Seçimi

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kanatlı Hayvan Teşhis Laboratuvarı'na 2011-2012 yılları içerisinde gönderilen -70°C'de dondurularak muhafaza edilmiş olan 125 kümese ait doku materyallerinden (trake, akciğer, sekal tonsil) IBV izolasyonu, hazırlanan inokulumların embriyolu tavuk yumurtalarına 3 kör pasajı yapılarak gerçekleştirildi. Örneklerin 1., 2. ve 3. pasaj allantoik sıvıları ile aşı örneklerinin 1, 2. ve 3. pasaj allantoik sıvıları (pozitif kontrol) kullanılarak uygun RNA izolasyon yönteminin belirlenmesi ve Çizelge 2.3.'te belirtilen primerlerin seçimi için çeşitli denemeler yapıldı. Toplam 125 kümeden 8 adet pozitiflik elde edildi. Allantoik sıvılardan pozitiflik saptanan bu kümeslere ait dondurulmuş organ materyalleri direk dokudan etkinliği saptamak amacıyla nested RT-PCR yöntemiyle analiz edildi. Sonuçta allantoik sıvıları incelendiğinde IBV pozitif bulunan 8 örnekten 6'sı negatif, 2'si pozitif olarak teşhis edildi. Bu materyaller için virüs izolasyonu amacıyla ETY inokülasyonlarının teşhiste pozitifliği arttırdığı görüldü.

RNA izolasyonu için kullanılan kitlerle yapılan denemelerde kitler arasında belirgin bir farka rastlanmadı. Ancak TRİzol ile RNA eldesi gerçekleştirilen örneklerin nanodrop ile spektrofotometrik ölçümleri örnek saflığı ile ilgili 260/280 nm absorbans değerleri (optimal 1,8-2,0; DNA-RNA) göz önüne alındığında, solüsyon kullanımına dayalı ekstraksiyon spin kolon prensibine dayanan kitlerden daha optimal bulundu. Özellikle cDNA sentezine girecek olan RNA miktarı ve cDNA sentezi sonrası nested RT-PCR reaksiyonunda kullanılacak olan kalıp DNA miktarının önemli olduğu görüldü. Çalışmada bu değerler cDNA için 25-150 ng ve RNA için 25-75 ng değerlerinde kullanıldı. Bu amaçla reaksiyona girecek olan kalıp DNA/RNA gerektiği oranda, genellikle 1/20 oranında sulandırıldı.

Çizelge 2.3.'te belirtilen primerler kullanılarak yapılan uygulamalarda f-XCE1, r-XCE3 ve F-Oligo S15', R-CK2 primerlerinden pozitif kontrol olarak kullanılan aşı örneklerinden pozitiflik alınamadı. CU2 ve IBVrev primer çiftinde ise pozitif kontroller çalıştı ancak pozitif olduğu bilinen bazı saha örneklerinden negatif sonuçlar alındı. Bunun sebebinin PCR spesifitesi ve sensitivitesi ile ilgili olduğu düşünüldü, virüs genomu FOR1, RE3 ve FOR2, RE2 nested primer çiftleri kullanılarak tek basamaklı nested RT-PCR yöntemi kullanılarak çoğaltıldı. Nested RT-PCR'ın ilk aşamasında örneklerden beklenen 878 bp'lık bant görüntüsü her reaksiyonda elde edilemedi ancak nested RT-PCR'ın ikinci aşaması olan 400 bp'lık bölgenin amplifikasyonu ile IBV RNA'sı saptandı.

Nested RT-PCR'ın tek basamaklı olarak gerçekleştirilmesi uygulama olarak daha kolay, hızlı ve kullanılan enzim yönünden iki basamaklı yöntemden daha etkin bulundu.

3.2. Tek Basamaklı Nested RT-PCR Test Sonuçları

IBV şüpheli hayvanlara ait havuzlanarak örneklenmiş olan trakeal svap ve organ materyallerinden izole edilen RNA'lara uygulanan nested RT-PCR testi sonucunda, 200 sürüden 41 (%20,5)'inde virüs genetik materyali saptandı, ancak 159 (%79,5) sürüde IBV saptanamadı.

Çizelge 3.1. IBV pozitif bulunan sürülere ait bilgiler.

Sürü Kodu	Yıl	Yetiştirme/Bölge	Örnekleme türü	ETY' ye ekim
50	2011	Broyler/ İç Anadolu	Doku-Trake	Yapıldı
63	2012	Broyler/Ege	Doku-Trake	Yapıldı
66	2012	Broyler/Marmara	Doku-Trake	Yapıldı
68	2012	Broyler/Marmara	Doku-Trake	Yapıldı
99	2012	Broyler/Orta Karadeniz	Doku-Sekal Tonsil	Yapıldı
116	2012	Broyler/Marmara	Doku-Trake	Yapıldı
117	2012	Broyler/Marmara	Doku-Trake	Yapıldı
120	2012	Broyler/Marmara	Doku-Trake	Yapıldı
132	2013	Broyler/ Ege	Doku-Trake	Yapılmadı
150	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
151	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
152	2014	Broyler/ Marmara	Doku-Trake	Yapılmadı
153	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
154	2014	Broyler/ İç anadolu	Doku-Trake	Yapılmadı
155	2014	Broyler/ İç anadolu	Doku-Trake	Yapılmadı
156	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
157	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
158	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
160	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
161	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
162	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
163	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
172	2014	Broyler/İç Anadolu	Doku-Trake	Yapılmadı
176	2014	Broyler/ Doğu Anadolu	Doku-Trake	Yapılmadı
184	2014	Broyler/ Doğu Anadolu	Doku-Trake	Yapılmadı
185	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
186	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
193	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
195	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
196	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
197	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
198	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
199	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
200	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
201	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
202	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Böbrek	Yapılmadı
203	2014	Broyler/ Akdeniz	Doku-Trake	Yapılmadı
204	2014	Broyler/ Ege	Trakeal swap	Yapılmadı
205	2014	Broyler/ Ege	Trakeal swap	Yapılmadı
206	2014	Broyler/ Ege	Trakeal swap	Yapılmadı
208	2014	Broyler/ Doğu Anadolu	Trake	Yapılmadı

Çalışmada incelenen toplam 200 kümes materyalinin bölgelere göre pozitiflik sayısı ile materyal sayıları İç Anadolu-Batı Karadeniz 4/105, Akdeniz 22/34, Marmara 6/23, Ege 5/23, Doğu Anadolu 3/10, Orta Karadeniz 1/5 olarak bulundu. İç Anadolu-Batı Karadeniz Bölgelerine ait 79 kümes materyallerinin 2011-2012 yılları arasında laboratuvarımıza gönderilen ve -70 °C'de dondurulan materyallerden oluşması virüs izolasyon oranını düşürmüş olabileceği düşünüldü. Bölgelere ait oranlar Çizelge 3.2 'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2. Bölgelere göre işletmelerin dağılımı, pozitiflik /materyal sayıları ve oranları.

Bölge/ İşletme	İşletme	İşletme Pozitiflik/ Örnekleme Sayısı	Pozitif Kümes/ Örneklene Kümes Sayıları	Pozitiflik Oranları
İç Anadolu- Batı Karadeniz	İşletme 4	2/50	4/105	%3,8
	İşletme 5	0/5		
	İşletme 6	2/50		
Marmara	İşletme 7	5/19	6/23	%26
	İşletme 8	1/1		
	İşletme 9	0/3		
Ege	İşletme 1	1/13	5/23	%21,7
	İşletme 2	1/6		
	İşletme 3	3/4		
Akdeniz	İşletme 10	3/3	22/34	%64,7
	İşletme 11	19/31		
Doğu Anadolu	İşletme 12	3/10	3/10	%30
Orta Karadeniz	İşletme 13	1/5	1/5	%20

3.3. PCR Ürünlerinin Dizilendirilmesi ve Filogenetik Analiz Bulguları

Tek basamaklı nested RT-PCR sonucunda pozitif bulunan örnekler S1 geninde 400 bp'lık çok değişken bölgenin bir kısmını çoğaltan FOR2 ve RE2 primer çiftleri kullanılarak forward ve reverse olarak iki yönde dizilendirildi. Elde edilen S1 gen bölgesindeki çok değişken bölge (hypervariable region) 2'yi kapsayan DNA dizileri NCBI'da bulunan GenBank veritabanında erişimleri olan infeksiyöz bronşitis

virüslerinin tümüyle kıyaslanmak için BLAST programıyla incelendi. Bu inceleme sonucunda örneklerin 14 tanesi %98-99 oranından (KP259312.1) TR8, 8 tanesi %98-99 oranında (EU780077.2) IS/1494/06, 11 tanesi %94-100 oranında (HM131453.1) isolate attenuated IS/1494/06, 2 tanesi %98 oranında (JX173488.1) Eg/CLEVB-2/IBV/012, 6 tanesi %99-100 oranında Mass aşısı suşu (HM540074.1) GX-NN1 ile benzer bulundu.

Çizelge 3.3. Örneklerle ait BLAST sonuçları.

Örnek No	Benzerlik Oranı	BLAST Sonucu	Erişim No
117,120,150,152,154,155,160,163,185,193,195,198,199,200	%98-99	TR8	KP259312.1
50,66,116,132,162,172,176,186	%98-99	IS/1494/06	EU780077.2
156,158,161,196,201,202,203,204,205,206,208	%94-100	İsolate attenuated IS/1494/06	HM131453.1
151,153	%98	Eg/CLEVB-2/IBV/012	JX173488.1
63,68,99,157,184,197	%99-100	GX-NN1 Mass aşısı	HM540074.1

3.3.1. Filogenetik Analiz Bulguları

IBV izolatları arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koymak için S1 genine ait nükleotid dizileri kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu. Sonuçlar Şekil 3.1.'de gösterildiği gibi izolatlar %82 benzerlikle 2 ana gruba ayrıldı. Birinci grup Mass tipi aşısı suşlarıyla (%99), 2. grup ise (KP259312.1)TR8, (EU780077.2) IS/1494/06 İsrail varyantları ve (JX173488.1) Eg/CLEVB2/IBV/012 Mısır varyantları ile %99 oranında benzer bulundu. İzole edilen IBV suşları kendi içinde %54, %64, %77 ve %99 oranında gruplanarak bu suşların belirtilen oranlarda benzer oldukları görüldü.

İzolatlar izole edilen bölgelere göre gruplandırıldığında; Akdeniz ve Ege Bölgeleri'nden izole edilen suşların %54 oranında; Akdeniz Bölgesine ait bir grubun %64 oranında kendi içinde ve İç Anadolu ile Doğu Anadolu'dan izole edilen suşların %77 oranında birbirleriyle yakınlığı ortaya kondu (Şekil 3.2).

Türkiye'de son yıllarda IBV çalışan araştırmacıların verileriyle bir değerlendirme yapıldığında bu çalışma bölge bazında daha kapsamlı ve yıl olarak daha uzun bir süreci kapsamaktadır. Türkiye'de yapılan çalışmalar sonucu elde edilen izolatların GenBank erişim numarası KP2593.1 olan TR8 izolatı ile %99 benzerlikte olduğu bulundu (Şekil3.2).



- Referanslar
- İzolatlar



4. TARTIŞMA

İnfeksiyöz Bronşitis (IB), dünyanın her yerinde kanatlı endüstrisinde ciddi ekonomik kayba neden olmaktadır. Çoğunlukla solunum sistemi belirtileriyle kendini gösterirken, morbiditesi %100'ü, mortalitesi %50'leri bulabilmektedir. Özellikle nefrite neden olan formunda veya sekonder bakteriyel infeksiyonlarla komplike olduğunda şiddeti artmaktadır. Damızlık ve yumurtacılar da reproduktif sistemi etkilemesiyle yumurta iç ve dış kalitesinde bozulma ve üretimde düşüşe neden olmaktadır. IB tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de önemli ekonomik kayıplar yaratmaktadır. Ülkemizde hastalıktan korunmada broyler yetiştiriciliklerinde Ma5, H120 ve bazı bölgelerde 4-91 attenüe aşılarını kapsayan aşılama programları uygulanmaktadır. Bu aşılama programlarına rağmen Türkiye'de tavukçuluk yapılan her bölgede IB karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada, Türkiye'de broyler kümeslerinde IB'ye neden olan virüslerin tek basamaklı nested-RT-PCR yöntemi kullanılarak teşhisini takiben virüs genetik materyalinin dizilendirilerek moleküler tiplendirilmesi ve filogenetik analizi gerçekleştirildi.

IBV'nin teşhisinde ve genotiplendirilmesinde spike (S) glikoproteininin S1 alt ünitesine ait gen bölgesi hedeflenmektedir. S1 alt ünitesi virüs nötralizasyonundan sorumlu serotipsesifik antikorlara bağlanan bölgeleri kodlamakta (Boursonn ve ark. 1987) ve aynı zamanda da S2 alt ünitesine göre daha çok dizi çeşitliliği göstermektedir (Kusters ve ark. 1989). Bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında ve önceki pek çok çalışmada hedef bölge olarak S glikoproteininin S1 alt ünitesine ait gen bölgesi tercih edilmiştir (Jackwood ve ark., 2007; Roussan ve ark., 2009). Cavanagh ve ark. (1999), yapmış oldukları çalışma sonunda IBV'nin teşhisi için RT-PCR testinde kullanılacak olan primer çiftinin seçimini testin özgünlüğü ve duyarlılığı açısından önemli bulmuştur. Bu çalışmada, IBV suşlarının genomik yapısında farklı nedenlere (mutasyonlar, rekombinasyonlar, coğrafik suş farklılıkları, vb.) bağlı değişiklikler olabileceği düşünülerek farklı primer kombinasyonları test edilmiştir (OIE, 2008; Pohuang ve ark., 2009; Rimondi ve ark. 2009).

Nested RT-PCR, konvansiyonel RT-PCR ile karşılaştırıldığında daha uzun bir bölgenin amplifikasyonunun ardından bu bölgenin içerisinde yer alan daha kısa bir bölgeye yönelik ikinci bir amplifikasyon uygulandığı için daha spesifik ve duyarlı bir tekniktir. Bu tez çalışmasında, yapılan tekli PCR’larda meydana gelen spesifikite ve sensivite problemlerini elimine etmek için RT-PCR yerine nested RT-PCR yöntemiyle teşhise karar verildi. Pohuang ve ark. (2009)’nın kullanmış olduğu primer çiftleri kullanılarak pozitif kontrolle (aşı suşları) yapılan standardizasyon çalışmalarında ve saha örnekleriyle yapılan denemelerde nested RT-PCR’ın daha iyi sonuç verdiği görüldü. Pek çok araştırmacının yapmış oldukları çalışmalarda bu sonucu destekler niteliktedir (Adzhar ve ark., 1996, Cavanagh ve ark., 1999, Jones ve ark., 2005, Farsang ve ark., 2002). Kahya ve ark. (2013), aynı yöntemle Türkiye’de 2 broyler ve 8 damızlık kümeste bronşit görülen hayvanlarda IBV suşlarını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, yöntemin hem trakealsvaplarda hem de allantoik sıvılarda virüsün tespitinde iyi çalıştığını bildirmişlerdir.

Tez çalışmasında IBV şüphesiyle örneklemeleri yapılmış olan 200 sürüden 41 (%20,5)’inde virüs genetik materyali saptandı, 159 (%79,5) sürüde ise IBV saptanamadı. Türkiye’de Akan ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada broyler, yumurtacı ve damızlık kümeslerden yapılan örneklemelerde 71 kümeden 14’ünde (%19,7) RT-PCR yöntemiyle IBV pozitifliği saptanmıştır. Tez çalışmasında elde edilen pozitiflik oranı Akan ve ark. (2002) yapmış oldukları çalışmayla benzerlik göstermektedir. Kahya ve ark. (2013)’nın yapmış oldukları çalışmada, IBV’nin farklı yetiştirmelerdeki varlığı ortaya konulmuştur. Farklı yıllarda yapılmış olan bu çalışmalar IBV’nin Türkiye’de sirküle olmaya devam ettiğini göstermektedir.

Günümüzde pek çok epidemiyolojik çalışmaya temel oluşturması ve varolan varyant suşlar hakkında bilgi vermesi açısından teşhis edilen virüslerin tiplendirilmesi ve filogenetik analiz verilerinin değerlendirilmesi önemlidir (de Wit, 2000; Jackwood ve ark., 2012). Pohuang ve ark. (2009), uyguladıkları yöntemle nested RT-PCR’ın ilk basamak amplifikasyonundan elde ettikleri 878 bp’lık S proteini S1 alt ünitesi HVR1 ve 2’yi kapsayan bölgeyi dizilendirmişlerdir. Bu tez çalışmasında 878 bp’lık bölgeye ait spesifik banther PCR reaksiyonunda her örnek

için elde edilememiştir bu yüzden dizilendirme HVR 2'yi kapsayan kısa bölge kullanılarak yapılmıştır. Bu inceleme sonucunda örneklerin 14'ü %98-99 oranından (KP259312.1) TR8, 8 'i %98-99 oranında (EU780077.2) IS/1494/06, 11' i %94-100 oranında (HM131453.1) isolate attenuated IS/1494/06, 2'si %98 oranında (JX173488.1) Eg/CLEVB-2/IBV/012, 6'sı %99-100 oranında Mass aşısı suşu (HM540074.1) GX-NN1 ile benzer bulundu. Şekil 3.1.'de gösterildiği gibi izolatlar %82 benzerlikle 2 ana gruba ayrıldı. Birinci grup Mass tipi aşısı suşlarıyla (%99), 2. grup ise (KP259312.1)TR8, (EU780077.2) IS/1494/06 İsrail varyantları ve (JX173488.1) Eg/CLEVB2/IBV/012 Mısır varyantları ile %99 oranında benzer olduğu filogenetik analizle ortaya konulmuştur. Pohuang ve ark. (2009)'nın dizilendirme sonucunda elde ettikleri varyant suşları 2 ayrı gruba ayrılmıştır. Saptanan suşlardan I. grup birbirinden evrimsel olarak farklı yeni bir grubu temsil ederken 2. grup Çin'e ait A2, SH ve QX IBV suşlarına yakın bulunmuştur. Bu tez çalışmasına ait sekans verileri ile Pohuang ve ark. (2009)'nın yapmış oldukları sekans verileri saptanan varyant türleri yönünden benzerlik göstermemektedir. Bu olası bir durumdur, çünkü farklı coğrafyalara ait IBV suşları farklılık gösterebilmektedir. Hatta tez çalışmasında farklı IBV varyantlarının saptanmış olması bu uygulanan yöntemin farklı IBV varyantlarını saptayabildiğini destekler niteliktedir.

Türkiye'de IBV suşlarının moleküler karakterizasyonuna yönelik yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Konuya ilişkin ilk ve tek çalışma olan Kahya ve ark. (2013)'nın çalışmasında, IB klinik bulgularını gösteren tavuklardan RT-PCR tekniğiyle IBV saptanarak dizilendirme metoduyla tiplendirilmiştir. Çalışmadaki izolatlardan 8 tanesinin IS/1494/06 IBV suşu (EU780077) ile %99 benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. Tez çalışmasından elde edilen veriler Kahya ve ark. (2013) tarafından elde edilen verilerle uyumludur ve ek olarak Mısır'a ait varyant IBV suşları saptanmıştır. Bu çalışma, Dünya'da olduğu gibi Türkiye'de de IBV'nin yaygınlığını göstermektedir. Varolan suş çeşitliliğine bakıldığında özellikle Orta Doğu'ya ait varyantlarla olan benzerlikler yapılan çalışma sonucunda belirlenmiştir. Türkiye'de görülen varyantlar Orta Doğu'da, genel olarak var olan; Mass serotipi (H120), D274 (Roussan ve ark., 2009), İsrail variant 1 suşları (IS/222/96, IS/251/96

ve IS/64714/96) ve 793/B (4/91) IBV varyantlarıyla benzerlik göstermektedir. Ayrıca, Mısır'da Türkiye ile benzer olarak Eg/CLEVB2/IBV/012 suşu ve Mısır'a özgü Mısır varyant I (Egypt/Beni-Suef/01, Egypt/Zag/07-01, Sul/01/09, Ck/Eg/BSU-1/2011, Ck/Eg/BSU-4/2011, Ck/Eg/BSU-5/2011, Eg/101/ck, Eg/CLEVB2/IBV/012, IS-IBVAR2-06, IS/1494/06, IS/885) ve Mısır varyant II (CK/Eg/BSU-2/2011, CK/Eg/BSU-3/2011, Eg/1212B) suşları (Mahmood ve ark., 2011; Abdel-Moneim ve ark., 2012; Ababneh ve ark., 2012) ile D274, D-088880 ve 4-91 genotipleriyle ilişkili saha suşları Mısırlı araştırmacılar tarafından ülkenin farklı kanatlı çiftliklerinde belirlenmiştir (Abdel-Moneim ve ark., 2002; Sultan ve ark., 2004; Selim ve ark., 2013).

S1 geninin nested RT-PCR ile çoğaltılması sonrasında DNA dizilemesine dayalı genotiplendirme ile sadece saha suşlarının değil sahada sirküle olabilen aşı suşlarının da ortaya konması mümkündür. Aşı suşları ve saha suşlarının genetik olarak karşılaştırması ile ilgili araştırmalara bakıldığında; Shimazaki ve ark. (2008) Japonya'da 4/91 tipi infeksiyöz bronşitis virüs varyantlarını izole etmişler ve yapılan aşılanmanın bu varyantlara olan etkilerini incelemişlerdir. Bu aşı suşu Japonya'da 2002 yılında kullanılmaya başlanmıştır. Çalışmada 4/91 tipi izolatların aşı suşlarından köken aldığı ihtimali düşünülmüş ve bu izolatlar civcivlerde hastalık oluşturmak için zayıflatılmıştır. İzolatların 4/91 aşı suşunun çok değişken bölgelerini de içine alan S1 geniyle yüksek nükleotid dizi homolojisi gösterdiği (%99.8) ve civcivlerde düşük patojenite oluşturduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca 4/91 suşuyla aşılanmamış olan sürülerden elde edilen diğer suşların 4/91 aşı suşuyla olan dizi benzerlikleri daha düşük (%93.3) bulunmuştur. Farsang ve ark. (2002) yapmış oldukları moleküler epidemiyolojik çalışmada, 1994 ve 1998 yılları arasında yumurtacı ve broyler sürülerde meydana gelen 12 vaka ile ilgili olarak; 1997 yılında Massachusetts serotipi canlı aşısı ile yapılan aşılama sonrası tespit edilen virüslerdeki değişimi ve aşı suşuyla olan benzerliklerini S1 ve N geni dizilendirme sonuçlarıyla ortaya koymuşlardır. Çalışma verilerine dayanarak aşılanmanın aşı suşunun yayılımına neden olduğu, hastalık oluşturduğu ve epidemiyolojik durumun anlaşılmasında kanatlı popülasyonunda yanıltıcı olduğunu bildirmişlerdir. Toro ve ark. (2012), yapmış oldukları çalışmada attenüe IBV aşılarının homolog aşı

uygulamalarında etkili koruma sağlamasına karşın elde edilen bulgulardan aşılarda kanatlılarda aşı benzeri virüslerin dolaşımında ve ortaya çıkışında rol alabileceğini bildirmiştir. McKinley ve ark. (2008), aşılama takiben IBV atenué canlı aşılarda meydana gelen altpopölasyonların seçilimini ve mutasyonlarını incelemişlerdir. IBV aşılama sürecinde virüsün evrimleşme ve mutasyon oranlarının yılda %2.5 ile 1.5 oranında değiştiği ancak aşılama yapılmadığında daha yavaş (%0.3) evrimleştiğini bildirmişlerdir (Lee ve Jackwood 2001). Tüm bu çalışmalar sahada IBV'nin aşılama kaynaklı olarak yayılabileceğini ve evrimleşebileceğini doğrular niteliktedir. Bu çalışmada örneklenen tüm sürülerde Mass tipi aşı suşu sürülerin aşılama programlarında bulunmaktadır. İzole edilen suşların 6 tanesinin (Kod: 63, 68, 9, 184, 157, 197) %99 oranında Mass aşı suşu (HM540074.1) GX-NN1 ile benzer bulunmuş olması ve bu suşların şekil 3.2'de gösterildiği üzere (63 nolu örnek) Ege, (68 nolu örnek) Marmara, (99 nolu örnek) Orta Karadeniz, (184 nolu örnek) Doğu Anadolu, (157 nolu örnek) ve (197 nolu örnek) Akdeniz gibi Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilmiş olması araştırmacıların bulgularıyla uyumludur. Aşı suşuna benzer varyantların sahada sirküle olması kanatlılar için bir risk oluşturup oluşturmadığı konusu ise kesin değildir. Ancak birçok araştırmacı bu konuda virüsün evrimsel sürecini hızlandırdığı konusunda aynı görüşü paylaşmaktadır. Virüsün genetik çeşitlilik mekanizması (rekombinasyon ve mutasyonlar) seçim sürecinde rol oynayan biyokimyasal ve fiziksel koşulların yanı sıra immun yanıt, hücre reseptör affinitesini de içeren konakçı içindeki çevresel baskı mekanizmaları, IBV'nin evrimsel mekanizmasını etkilemektedir. Bu mekanizmanın altında yatan sebeplerin anlaşılabilmesi hastalığın koruma ve kontrolüyle mümkündür (Toro ve ark., 2012).

Türkiye'de uygulanan aşılama stratejilerinin IBV infeksiyonlarına karşı korunmada etkinlikleri araştırılmalıdır. Çalışmada tespit edilen IS/1494/06 İsrail varyantları ve Eg/CLEVB2/IBV/012 Mısır varyantlarına karşı uygulanan aşılamanın etkinliğine dair Türkiye'de bir çalışma yapılmamıştır. Ancak Orta Doğu'da ve Kuzey Afrika'da IS/885/00, IS/1494/06 ve bu suşlarla aynı grupta olan pek çok IBV varyantı bildirilmiştir (Meir ve ark., 2004; Mahmood ve ark., 2011; Abdel-Moneim ve ark., 2012; Awadve ark 2014). Bu bildirimlerin yapıldığı Kuzey Afrika, Mısır, Irak ve Libya gibi ülkelerde uygulanan aşı suşları Türkiye ile benzer olarak; H120,

4/91 ve bu suşların kombinasyonları şeklindedir. Sahada, konvansiyonel H120 aşısının bahsi geçen varyant IBV suşlarına karşı tek başına yeterli koruyuculukta olmadığı bildirilmiştir (Meir ve ark., 2004). Awad ve ark. (2014)'nın yapmış oldukları çalışmada canlı IBV aşı suşlarının. IS/1494/06 ve IS/885/00 benzeri suşlara karşı olan koruyuculuklarını araştırmışlardır. Sonuçta canlı attenüe H120 ve CR88 (4/91) aşılarının 1 günlük civcivlere birlikte verildikten sonra 14. gün CR88 aşısını tekrar vererek oluşturdukları programda, 30. günde IS/1494/06 ve IS/885/00 varyant suşlarına maruz bırakılan broyler tavuklarda bu aşılama programının %80 oranında trakede siliar koruma sağlandığı, klinik semptomlar ve trake veya böbrek lezyonlarında %100 koruma meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Her varyant suş için aşı geliştirilmesi maliyet ve zaman kaybı yaratabileceği gibi virüsün sürekli evrimleştiği göz önüne alındığında pratik bir uygulama değildir (Alvarado ve ark., 2003; Jackwood ve ark., 2003; Bijlenga ve ark., 2004;). IBV'den korunmada homolog aşılar kullanılabileceği gibi aynı serotipte olmayan, ancak çapraz koruma sağlayabilen hali hazırda kullanılan IBV aşı suşları da uygulanabilir. Bu çapraz korumanın sebebi virüs protein yapısının büyük bir bölümünün değişmeden kalması olabilir, bu yüzden korumada serotipten çok protektotip bazında düşünüp değerlendirmek daha etkili olabilir (Lohr, 1988). Ayrıca Mass ve 4/91 gibi genetik olarak farklı olan canlı attenüe iki aşı suşuyla yapılan aşılama programlarının farklı IBV tiplerine karşı geniş bir çapraz koruma sağladığı bildirilmiştir (Gelb ve ark., 1991; Cook ve ark., 1999; Terregino ve ark., 2008).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kanatlılarda IBV'nin moleküler teşhisi ve karakterizasyonunun amaçlandığı çalışmada, Türkiye'nin çeşitli bölgelerindeki broyler yetiştiriciliklerinden yapılan örneklemelerde nested RT-PCR ile saptanan viruslar dizilendirilerek moleküler olarak tiplendirildi ve filogenetik analizi gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda, Türkiye'de varolan IB virusları ve benzerlikleri ortaya konuldu.

Türkiye'de IBV'nin epidemiyolojik takibi için teşhis ve tiplendirme ile ilgili diğer çalışmalara temel oluşturacak bilgiler elde edildi. Bu bilgiler ile Türkiye'de tavukçuluğun yoğun olarak yapıldığı bölgelerde IBV salgınlarına neden olan virüslerin saptanması ve moleküler karakterizasyonu için gerekli temel bilgiler sağlandı. Aynı zamanda Türkiye'de uygulanan aşı suşları ile sahada hastalık oluşturan suşlar arasındaki farklar değerlendirilip mevcut aşılama stratejilerinin etkinliğinin araştırılmasına yönelik çalışmaların gerekliliğini gösteren bulgulara ulaşıldı.

Çalışma bulguları değerlendirildiğinde, nested RT-PCR testinin IBV suşlarının rutin teşhisi açısından uygun bir test olduğu ve dizilendirme yöntemiyle genotiplendirmenin virüsün epidemiyolojik takibi açısından önemli olduğu görüldü.

Sonuç olarak, Türkiye'de tavuk yetiştiriciliği yapılan farklı bölgelerdeki ve farklı yetiştirme yönlerindeki (damızlık ve yumurtacı) işletmelere ait IBV enfeksiyonu geçiren sürülerden de örneklemeler yapıp Türkiye'de IBV'nin moleküler epidemiyolojisinin kapsamlı olarak incelenmesi gerekliliği ortaya çıktı. Ayrıca, mevcut aşı ve saha suşlarından moleküler olarak farklı özellikler gösteren virusların detaylı çalışmalarla farklı gen bölgeleri ve/veya daha geniş gen bölgelerinin incelenmesinin farklı virüs tiplerinin takip ve teşhisinde faydalı olacağı düşünüldü. Böylece IBV'nin kontrol ve takibinde başarı sağlanacağı sonucuna varıldı.

ÖZET

Türkiye'de İnfeksiyöz Bronşitis Viruslarının RT-PCR ile Saptanması ve Moleküler Karakterizasyonu

Çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerindeki işletmelerde solunum sistemi problemi görülen tavuk sürülerinde İnfeksiyöz Bronşitis'in (IB) teşhisi ve S1 geninin dizilendirilmesine dayalı karakterizasyonu amaçlandı.

Türkiye'de solunum sistemi problemleri görülen farklı işletmelerden teşhis amacıyla Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kanatlı Teşhis Laboratuvarı'na 2011-2014 yılları arasında gönderilen materyallerden (trakeal svap, trake, akciğerler, ileo-sekal tonsiller) guanidinium-thiocyanate fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile RNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Çalışmada incelenen 200 örneğin 125 tanesi 2011-2012 yılları arasında örneklendi ve -70°C'de donduruldu. Dondurulmuş olan bu örnekler RNA izolasyonu öncesinde embriyolu tavuk yumurtasına (ETY) ekildi, geriye kalan 75 örneğin RNA'sı direkt olarak izole edildi. Örneklerde IBV varlığının ortaya konması için ekstrakte RNA'lar S1 genine spesifik primer çiftlerinin kullanıldığı tek basamaklı nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (nested-RT-PCR) tekniği ile araştırıldı. IBV yönünden pozitif örneklerin moleküler karakterizasyonu S1 geninin dizi analizi ile gerçekleştirildi. İncelenen 200 sürüden 41 (%20,5)'inde virüs genetik materyali saptandı, ancak 159 (%79,5) sürüde IBV saptanamadı. Pozitif örnekler dideoksi zincir sonlanma reaksiyonu yöntemiyle dizilendirildi. DNA dizileri NCBI'da bulunan GenBank veritabanında erişimleri olan infeksiyöz bronşitis virüslerinin tümüyle kıyaslanmak için BLAST programıyla incelendi. IBV izolatları arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koymak için S1 genine ait nükleotid dizileri kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu. İzolatlar %82 benzerlikle 2 ana gruba ayrıldı ve örneklerin 14 tanesi %98-99 oranında (KP259312.1) TR8, 8 tanesi %98-99 oranında (EU780077.2) IS/1494/06, 11 tanesi %94-100 oranında (HM131453.1) isolate attenuated IS/1494/06, 2 tanesi %98 oranında (JX173488.1) Eg/CLEVB-2/IBV/012, 6 tanesi %99-100 oranında Mass aşısı suşu (HM540074.1) GX-NN1 ile benzer bulundu.

Türkiye'de infeksiyöz bronşitis virus suşlarının nested-RT-PCR ile saptanması ve sonrasında S1 geninin dizi analizine dayanan bu tekniğin ülkemizde tavuklarda görülen infeksiyöz bronşitis hastalığının teşhis ve karakterizasyonu ile moleküler epidemiyolojisine yönelik çalışmalarda ve aşı programlarının geliştirilmesinde faydalı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: İnfeksiyöz bronşitis virüsü (IBV), Tavuk, S1 geni, nested-RT-PCR, Dizilendirme

SUMMARY

Molecular Detection and Characterization of Avian Infectious Bronchitis Viruses in Turkey by RT-PCR

The aim of the research was identification of infectious bronchitis virus in poultry flocks showing respiratory signs raised in different locations in Turkey and characterize the IBV detected strains by sequencing of S1 gene.

Samples from different commercial poultry flocks showing respiratory signs and suspected of respiratory infection from all around Turkey were sent to Poultry Diagnostic Laboratories, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University between 2011-2014. One hundred twenty-five of 200 materials were sampled between 2011-2012 and freezed at -70 °C. These frozen samples were inoculated at 9-11 days old embryonated chicken eggs (ECE) via allantoic route as described in OIE (2008). The rest of the materials (n.75) were directly processed. RNA extractions from all materials were performed from organ samples and tracheal swaps (trachea, lungs, ileo-cecal tonsils) with guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction method. One step nested-RT-PCR was carried out with spesific primers for S1 gene to screen IBV. Molecular characterization of IBV detected 41 (%20,5) out of 200 samples were analyzed by sequencing of S1 gene. Sequenced samples were analyzed with BLAST by comparison of sequences in GenBank database.

It was found that 6 of 41 isolates were vaccine related variants which was %99-100 identical to (HM540074.1) GX-NN1 and the rest were field strains which belong to neighbour countries, respectively; 19 of 41 isolates were %94-100 identical to Israil variants (EU780077.2) IS/1494/06, and (HM131453.1) isolate attenuated IS/1494/06, 2 of 41 were %98 identical to (JX173488.1) Eg/CLEVB-2/IBV/012. Fourteen of 41 isolates were %98-99 identical to (KP259312.1) TR8 Turkish variants which were circulating in Turkey since 2013.

Nested RT-PCR detection and molecular characterization of IBV is thought to be an useful method for the futher molecular epidemiological studies of IBV and to evaluate and perform more effective vaccine programs in Turkey.

Keywords: Avian Infectious Bronchitis Virus, Chicken, nested RT-PCR, S1 gene, Sequencing

KAYNAKLAR

- ANONİM. The Infectious Bronchitis (IB)Information Site. Erişim. [<http://www.infectious-bronchitis.com/infectious-bronchitis-disease.asp>] Erişim tarihi:24.03.2016.
- ABABNEH M, DALAB A, ALSAAD S, AL-ZGHOUL M (2012). Presence of infectious bronchitis virus strain CK/CH/LDL/97I in the Middle East. *ISRN Vet Sci* 2012. Article ID 201721, **p:6**.
- ABDEL-MONEIM A, AFIFI M, EL-KADY M (2012). Emergence of a novel genotype of avian infectious bronchitis virus in Egypt. *Arch Virol*.1-5..
- ABDEL-MONEIM AS, MADBOULY HM, GELB JJr, LANDMAN BS (2002). Isolation and identification of Egypt/Beni-Suef/01 a novel genotype of infectious bronchitis virus. *Vet MedJ Giza, Egypt*.**50**: 1065-1078.
- ABD EL RAHMAN S (2010). Comparative analysis of current infectious bronchitis virus isolates in primary cell culture systems. PH.D. Thesis, at the University of Veterinary Medicine of Hannover.
- ABRO S (2013). Molecular Characterization and Detection of Infectious Bronchitis Virus. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- ADZHAR A, SHAW K, BRITON P, CAVANAGH D (1996). Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *Avian Pathol*.**25**:817-836.
- ADZHAR A, GOUGH RE, HAYDON D, SHAW K, BRITTON P, CAVANAGH D (1997). Molecular analysis of the 793/B serotype of infectious bronchitis virus in Great Britain. *Avian Pathol*.**26**: 625-640.
- AKAN M, İZGÜR M, SAREYYÜPOĞLU B (2002).Tavuklarda İnfeksiyöz Bronşitisin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Floresan Antikor Tekniği (FAT) ile teşhisi TÜBİTAK proje no: VHAG-1642.
- ALEXANDER DJ ve GOUGH RE (1977). Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. *Res. in Vet. Sci*. **23**: 344-347.
- AMBALI AG ve JONES RC (1990). Early pathogenesis in chicks of infection with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus. *Avian Dis*. **34**:809-817.
- AWAD F, CHHABRA R, BAYLIS M, GANAPATHY K (2014). An overview of infectious bronchitis virus in chicken. *World's Poultry Sci. J.* **70**: (375-383).

- BENYEDA Z, MATO T, SUVEGES T, SZABO E, KARDI V, ABONYI-TOTH Z, RUSVAI M AND PALYA V (2009). Comparison of the pathogenecity of QX-like, M41 and 793/B infectious bronchitis strains from different pathological conditions. *Avian Pathol.* **38**: 449-456.
- BIJLENGA, G., J. K. COOK, J. GELB JR, AND J. DE WIT(2004). Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. *Avian Pathol.* **33**: 550-557.
- BROADFOOT DI, POMEROY BS, SMITH WM Jr (1956). Effects of infectious bronchitis in baby chicks. *Poultry Sci.* **35**: 757-762.
- BOURSNELL ME, BROWN TD, FOULDS IJ, GREEN PF, TOMLEY FM, BINNS MM (1987). Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.* **68**: 57-77.
- BOZKURT FM, ALCIGIR G (2009). Enfeksiyöz Bronşitis. Veteriner Tavukçuluk Derneği Dergisi **7 (3)**: 6-11.
- CALLISSON SA, HILT TO, BOYNTON BF, SAMPLE BF, ROBINSON R, SWAYNE DE, JACKWOOD MW (2006). Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *J. Virol Methods.* **138**: 60-65.
- CASAI R, DAVIES M, CAVANAH D, BRITTON P (2005). Gene 5 of the avian coronavirus infectious bronchitis virus is not essential for replication, *J. Virol.* **79**: 8065-8078.
- CAVANAGH D (1991). Sequencing approach to IBV antigenicity and epizootiology. In: Proceedings of the Second International Symposium on Infectious Bronchitis. Rauschholzhausen, Germany, June 1991, 147-160.
- CAVANAGH D (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.* **142**: 629-633.
- CAVANAGH D (2001). A nomenclature for avian coronavirus isolates and the question of species status, *Avian Pathol.***30**: 109-115.
- CAVANAGH D (2005). Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol.***34**: 439-448.
- CAVANAGH D (2007). Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res.* **38**: 281-297.
- CAVANAGH D, DAVIS PJ, COOK JKA (1992). Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. *Avian Pathol.* **21**: 401-408.

- CAVANAGH D, HORZINEK MC (1993). Genus Torovirus assigned to the Coronaviridae. *Arch. Virol.* **128**: 395-396.
- CAVANAGH D, MAWDITT K, GOUGH R, PICAULT J P, BRITTON P (1998). Sequence analysis of strains of the 793/B genotype (CR88, 4/91) of IBV isolated between 1985 and 1997. In E.F. Kalteta & U. Heffels-Redmann (Eds.), *Proceedings of an International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry* Giessen, Germany: Justus-Liebig University. **pp.** 252-256.
- CAVANAGH D, MAWDITT K, BRITTON P, NAYLOR C J (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* **28**: 593-605.
- CAVANAGH D, NAQI S (2003). Infectious bronchitis In: *Diseases of Poultry*. 11th ed. Ed: Barnes, HJ, FadlyAM, Glisson, JR, McDougald LR, Swayne DE. Iowa State University Press, Ames. **pp.** 101-119.
- CAVANAGH D, GELB J (2008). Infectious bronchitis. In *Diseases of Poultry* 12th ed. Ed: Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald, D.E. Swayne. **pp.** 117-135.
- CRINION, RAP, HOFSTAD MS (1972). Pathogenicity of four serotypes of avian infectious bronchitis virus for the oviduct of young chickens of various ages. *Avian Dis.* **16**: 351-363.
- COOK JK, DARBYSHIRE HJ, PETERS WR (1976). The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Virol.* **50**: 109-118.
- COOK JKA, ORBELL SJ, WOODS MA, HUGGINS MB (1999). Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.* **28**: 477-485.
- COOK JK, JACKWOOD M, JONES RC (2012). The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol.* **41**: 3, 239-250.
- CUMMING RB (1963). Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. *Australian Vet. J.* **39**: 145-147.
- CUMMING RB (1969). Studies on avian infectious bronchitis virus. *Australian Vet. J.* **45**: 305-308.
- DE WIT JJ (2000). Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* **29**: 71-93.
- DE WIT JJ, COOK JKA, van der HEIJDEN HMJF (2010). Infectious Bronchitis Virus in Asia, Africa, Australia and Latin America - History, Current Situation and Control Measures. Workshop: Infectious Bronchitis (IB) in the Brazilian Poultry. ISSN 1516-635. **12**: 97-106.

- DHINAKER RAJ G, JONES RC (1997). Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathol.* **26**: 677-706.
- DOLZ R, PUJOLS J, ORDONEZ G, PORTA R, MAJO N (2008). Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus in Spain over a fourteen-year period. *Virology* **374**: 50-59.
- ELBERS AR, FABRI TH, De VARIES TS, De WIT JJ, PIJPERS A, KOCH G (2004). The highly pathogenic avian influenza A (H7N7) virus epidemic in The Netherlands in 2003 lessons learned from the first five outbreaks. *Avian Dis.* **48**: 691-705.
- EL HOUAD FIMD, JONES RC, COOK JKA VE AMBALI AG. (1986) The isolation and characterisation of six avian infectious bronchitis virus isolated in Morocco. *Avian Pathol* **15**:93-105.
- ESENDAL MÖ (2002). İnfeksiyöz bronşitis In: Kanatlı Hayvan Hastalıkları. Ed: Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür M, Yardımcı H, Erdeğer J, Akan M. Ankara: Medisan yayınevi. Bölüm: 5 s:155-162.
- FABRICANT J (1998). The early history of infectious bronchitis. *Avian Dis.* **42**: 648-50.
- FAN H, OOI A, TAN YW, WANG S, FANG S, LIU DX, LESCAR J (2005). The nucleocapsid protein of coronavirus infectious bronchitis virus: crystal structure of its N-terminal domain and multimerization properties. *Structure* **13**: 1859-1868.
- FARSANG A, ROS C, RENSTO'M LHM, BAULE C, SOOS T, BELAK, S (2002). Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain. *Avian Pathol.* **31**: 229–236.
- FELSENSTEIN J (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.
- GALLARDO RA, Van SANTEN VL, TORO H (2010). Host intraspatial selection of infectious bronchitis virus populations. *Avian Dis.* **54**: 807-813.
- GANAPATHY K (2009). Diagnosis of infectious bronchitis in chickens. *In Practice.* **31**: 424-431.
- GELB J Jr, WOLFF B, MORAN CA (1991). Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens, *Avian Dis.* **35**: 82-87.
- GOUGH RE, COX WJ, WINKLER CE, SHARP MW, SPACKMAN D (1996). Isolation and identification of infectious bronchitis virus from pheasants. *Vet.Rec.* **138**: 208–209.

- HALL TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**:95-98
- HITCHNER SB (2004). History of biological control of poultry diseases in the USA. *Avian Dis.* **48**(1): 1-8.
- HITCHNER SB, WINTERFIELD RW VE APPLETON GS (1966). Infectious bronchitis types in the United States. *Avian Dis.* **10**: 98-102.
- HODGSON T, BRITTON P, CAVANAGH D (2006). Neither the RNA nor the proteins of open reading frames 3a and 3b of the coronavirus infectious bronchitis virus are essential for replication, *J. Virol.* **80**: 296–305.
- IGNJATOVIC J, SAPATS SI, ASHTON F (1997). A long-term study of Australian infectious bronchitis viruses indicates a major antigenic change in recently isolated strains. *Avian Pathol.* **26**: 535-552.
- IGNJATOVIC J, GOULD G, SAPATS S (2006). Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. *Arch. Virol.* **151**: 1567-1585.
- IMBERT I, SNIJDER EJ, DIMITROVA M, GUILLEMOT JC, LECINEM P, CANARD B (2008). The SARS-coronavirus PLnc domain of nsp3 as a replication/transcription scaffolding protein. *Virus Res.* **133**: 136-148.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICVT) (2014). [<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>] Erişim Tarihi: 04.04.2016.
- JACKWOOD MW (2012). Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis.* **56**: 634-641.
- JACKWOOD MW, LEE CW, KWON HM, CALLISON SA, MOORE KM, MOSCOSO H, SELLER H, THAYER S (2005). Data from 11 years of molecular typing infectious bronchitis virus field isolates. *Avian Dis.* **49**: 614-618.
- JACKWOOD MW, HILT DA, WILLAMS SM, WOOLCOCK P, CARDONA C, O'CONNOR R (2007). Molecular and serologic characterization, pathogenicity, and protection studies with infectious bronchitis virus field isolates from California. *Avian Dis.* **51**: 527–533.
- JACKWOOD MW, HALL D, HANDEL A (2012). Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infect. Genet. Evol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.05.003>.
- JACKWOOD MW, de WIT S, (2013). Infectious Bronchitis in: *Diseases of Poultry* 13th ed. Ed: Swayne W, Glisson RJ, McDougald RL, Nolan KL, Suarez DL, Nair V. Wiley-Blackwell pub. Chap:4 p:139-159

- JIA W, KARACA K, PARRISH C.R, NAQI SA (1995). A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. *Arch. Virol.* **140**: 259-271.
- JIA W, MONDAL SP, NAQISA (2002). Genetic and antigenic diversity in avian infectious bronchitis virus isolates of the 1940s. *Avian Dis.* **46**: 437-441.
- JOHANSON RB, MARQUARDT WW, NEWMAN JA (1973). A new serotype of infectious bronchitis virus responsible for respiratory disease in Arkansas broilerflocks. *Avian Dis.* **17**: 518-523.
- JONES RC (2010) Europe: history, current situation and control measures for infectious bronchitis. *Brazilian J Poultry Sci.* **12**: 125-128.
- JONES, RC, JORDAN FTW (1971). The site of replication of infectious bronchitis virus in the oviduct of experimentally infected hens. *Vet. Rec.* **89**: 317-318.
- JUNGHER EL, CHOMIAK TW, LIUGINBUHL RE (1956). Immunological differences in strains of infectious bronchitis virus. In: *60th annual meeting of United States Livestock Sanitary Association*. USA. **pp**: 203-209.
- KAHYA S, ÇÖVEN F, TEMELLİ S, EYİĞÖR A, ÇARLI KT (2013). Presence of IS/1494/06 genotype-related infectious bronchitis virus in breeder and broiler flocks in Turkey. *Ankara Üniv. Vet Fak. Derg.* **60**: 27–31.
- KAMEKA AM (2014). Effect of macrophage depletion on avian infectious bronchitis coronavirus infection. Veterinary Medical Science Graduated Program, University of Calgary, Alberta.
- KANT A, KOCH G, van ROOZELA AR, KUSTERS DJ, POELWIJK JG, van der ZEIJST BAM (1992). Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolypeptide. *J. Gen. Virol.* **73**: 591 -596.
- KEELER CL, REED KLJR, NIX WA, GELB JJR (1998). Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. *Avian Dis.* **42**: 275–284.
- KINGHAM BF, KEELER CL, NIX WA, LANDMAN BS, GELB J (2000). Identification of avian infectious bronchitis virus by direct automated cycle sequencing of the S1 Gene. *Avian Dis.* **44**: 325-335.
- KINDE H, DAFT BM, CASTRO AE, BICKFORD AA, GELB JJR, REYNOLDS B (1991). Viral pathogenesis of a nephropathogenic infectious bronchitis virus isolated from commercial pullets, *Avian Dis.* **35**: 415-421.

- KLIEVE AV, CUMMING RB (1988). Immunity and cross-protection to nephritis produced by Australian infectious bronchitis viruses used as vaccines. *Avian Pathol.* **17**: 829-839.
- KOCH G, HARTOG L, GRANT A, VAN ROOZELAAR DJ (1990a). Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. *J. Gen. Virol.* **71**: 1929–1935.
- KOCH G ve KANT A (1990b). Nucleotide and amino acid sequence of the S1 subunit of the spike glycoprotein of avian infectious bronchitis virus, strain D3896. *Nucl. Acids Res.* **18**:3063. 1990.
- KOCH G, KANT A, COOK JKA, CAVANAGH D (1992). Location of antigenic sites defined by neutralising monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. *J. Gen. Virol.* **73**: 591– 596.
- KOTTIER SA, CAVANAGH D, BRITTON P (1995). Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology* **213**: 569–580.
- KUSTERS JG, NIESTERS HGM, LENSTRA JA, HORZINEK MC, VAN DER ZEIJST (1989). Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus, infectious bronchitis virus. *Virology* **169**: 217-221.
- KUSTERS JG, JAGER EJ, NIESTERS HGM, VAN DER ZEIJST BAM (1990). Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Vaccine* **8**:605–608.
- KWON HM, JACKWOOD MW, GELB J (1993) Differentiation of infectious-bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction-fragment-length polymorphism analysis. *Avian Dis.* **37**: 194–202.
- LANDMAN WJM, DWARS RM, De WIT JJ (2005). High incidence of false layers in (re)production hens supposedly attributed to a juvenile infectious bronchitis infection. In Proceedings of the XIVth International Congress of the World Veterinary Poultry Association Turkey, Istanbul **p.** 369.
- LANDMAN BS, LOUPUS AB, GELB J (2006). Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization. *Avian Pathol.* **35**:127-133.
- LAI MMC, CAVANAGH D (1997). The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **48**: 1-100.
- LAI MC, HOLMES KV (2001). Coronaviridae: the viruses and their replication. In: *Fields Virology*, 4th Edition. Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B. Straus, S.E. (Eds.). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, **pp**: 1163–1185.

- LEE CW, JACKWOOD MW (2000). Evidence of genetic diversity generated by recombination among avian coronavirus IBV. *Arch.Virol.* **145**: 2135-2148.
- LEE CW, JACKWOOD MW (2001). Spike gene analysis of the DE072 strain of infectious bronchitis virus: origin and evolution. *Virus Genes* **22**: 85-91.
- LEE CW, BROWN C, JACKWOOD MW (2002). Tissue distribution of avian infectious bronchitis virus following in ovo inoculation of chicken embryos examined by in situ hybridization with antisense digoxigenin-labeled universal riboprobe. *J. Vet. Diagn. Invest.* **14**: 377-381.
- LEE CW, HILT DA, JACKWOOD MW (2003). Typing of field isolates in infectious bronchitis virus based on the sequence of the hypervariable region in the S1 gene. *J. Vet. Diagn. Invest.* **15**:344-348.
- LIN Z, KATO A, KUDOU Y, UEDA S (1991). A new typing method for the avian infectious bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. *Arch Virol.* **116**:19–31.
- LIU S, KONG X. (2004). A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and nonvaccinated flocks in China. *Avian Pathol.* **33**:321-327.
- LIU S, CHEN J, KONG X, SHAO Y, HAN Z, FENG L, CAIX, GU S, LIU M (2005). Isolation of avian infectious bronchitis coronavirus from domestic peafowl (*Pavo cristatus*) and teal (*Anas*), *J. Gen. Virol.* **86**: 719-725.
- LIU S, CHEN J, HAN Z, ZHANG Q, SHAO Y, KONG X, TONG G (2006). Infectious bronchitis virus: S1 gene characteristics of vaccines used in China and efficacy of vaccination against heterologous strains from China. *Avian Pathol.* **35**: 394–399.
- LIU S, HAN Z, CHEN J, LIU X, SHAO Y, KONG X, TONG G (2007) S1 gene sequence heterogeneity of a pathogenic infectious bronchitis virus strain and its embryo-passaged, attenuated derivatives. *Avian Pathol.* **36**: 231-234.
- LOHR JE (1988). Differentiation of infectious bronchitis virus strains. In: Proceedings of 1st International Symposium on Infectious Bronchitis, Ed. Kaleta, E.F. & Heffels-Redmann, U. Rauschholzhausen, Germany **pp**: 52-53.
- MAHMOOD ZH (2009). Detection and identification of Avian Infectious Bronchitis Virus in Sulaimani Province. Phd Thesis, Council of College of Veterinary medicine University of Sulaimani.
- MAHMOOD ZH, SLEMAN RR, UTHMAN AU (2011). Isolation and molecular characterization of Sul/01/09 avian infectious bronchitis virus, indicates the emergence of a new genotype in the Middle East. *Vet. Microbiol.* **150**: 21-27.

- MASE M, INOUE T, YAMAGUCHI S, IMADA T (2008). Existence of avian infectious bronchitis virus with a European-prevalent 4/91 genotype in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **70**: 1341-1344.
- MCKINLEY ET, HILT DA, JACKWOOD MW (2008). Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. *Vaccine* **26**: 1274-1284.
- MEIR R, ROSENBLUT E, PERL S, KASS N, AYALI G, PERK S, HEMSANI E (2004). Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. *Avian Dis* **48**:635–41.
- MO M, HUANG B, WEI P, WEIT, CHEN Q, WANG X, LI M, FAN W (2012). Complete genome sequences of two chinese virulent avian coronavirus infectious bronchitis virus variants. *J. Virol.* **19**: 10903-4.
- MOCKETT AP, DARBYSHIRE JH (1981). Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* **10**: 1–10.
- MONTASSIER HJ (2010). Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* **12**: 87-96.
- MOORE KM, BENNETT JD, JACKWOOD MW (1998). Sequence comparison of avian infectious bronchitis virüs S1 glycoproteins of the Florida serotype and five variant isolates from Georgia and California. *Virus Genes.* **17**: 63–83.
- NAVAS S, WEISS SR. (2003). Murine coronavirusinduced hepatitis: JHM genetic background eliminates A59 spike-determined hepatotropism. *J. Virol.* **77**: 4972–4978.
- NIX WA, TROEBER DS, KINGHAM BF, KEELER CLJR, GELB JJR (2000). Emergence of subtype strains of the Arkansas serotype of infectious bronchitis virus in Delmarva broiler chickens. *Avian Dis.* **44**: 568–581.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (2008). Terrestrial Manual. Avian Infectious Bronchitis. Chapter: **2.3.2**: 443-455.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (2013). Terrestrial Manual. Avian Infectious Bronchitis. NB: Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2013. Chapter: **2.3.2**: 1-15.
- OTSUKI K, HUGGINS MB, COOK JKA (1990). Comparison of the susceptibility to infectious bronchitis virus infection of two inbred lines of White Leghorn chickens. *Avian Pathol.* **19**: 467–475.
- PASTERNAK AO, SPAAN WJM, SNIJDER EJ (2006). Nidovirus transcription: how to make sense? *J. Gen. Virol.* **87**: 1403-1421.

- POHUANG T, CHANSIRIPORNCHAI N, TAWATSIN A, SASIPREEYAJAN J (2009). Detection and molecular characterization of infectious bronchitis virus isolate from recent outbreaks in broiler flocks in Thailand. *J. Vet. Sci.* **10**:219-223.
- RIMONDI A, CRAIG MI, VAGNOZZIA, KONIG G, DELAMER M, PEREDA A (2009). Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains from outbreaks in Argentina (2001-2008). *Avian Pathol.* **38**: 149-153.
- ROUSSAN DA, KHAWALDEH GY, SAHAHEN IA (2009). Infectious bronchitis virus in Jordanian chickens: seroprevalence and detection. *Canadian Vet.J.* **50**: 77-80.
- SAREYYÜPOĞLU B (2012). Tavuklarda görülen infeksiyöz bronşitis hastalığı. *Tarım Türk Derg.* **33**: 200-202.
- SCHALK, A.F. ve HAWN, M.C. (1937) An apparently new respiratory disease in baby chicks. *J. Am. Vet. Med. Ass.* **78**: 413-422.
- SELIM K, ARAFAAS, HUSSEIN HA, EL-SANOUSIAA (2013). Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler and layer chicken farms in Egypt during 2012. *Int. J. Vet. Sci. Med.* **2**: 102–108.
- SEO SH, COLLISSON EW (1997). Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in in vivo clearance of infectious bronchitis virus, *J. Virol.* **71**: 5173-5177.
- SEO SH, WANG L, SMITH R, COLLISON EW (1997). The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection. *J. Virol.* **71**:7889-7894.
- SHIMAZAKI Y, HORIUCI T, HARADA M, TANIMURA C, SEKI Y, KURODA Y, YAGYU K, NAKAMURA S, SUZUKIS (2008). Isolation of 4/91 type of infectious bronchitis virus as a new variant in Japan and efficacy of vaccination against 4/91 type field isolate. *Avian Dis.* **52**: 618-622.
- SNYDER DB, MARQUARDT WW (1984). Use of monoclonal antibodies to assess antigenic relationships of avian infectious bronchitis virus serotypes in the United States. *Adv. Exp. Med. Biol.* **173**: 109-13.
- SULTAN HA, TANTAWI L, YOUSEIF AI, AHMED AAS (2004). Urolithiasis in white commercial egg laying chickens associated with an infectious bronchitis virus. 6th Scin Confn Egypt Vet Poult Assoc 2004. **p**: 155–169.
- SUMI V, SINGH SD, DHAMA K, GOWTHAMAN V, BARATHIDASAN R, SUKUMAR K (2012). Isolation and molecular characterization of infectious bronchitis virus from recent outbreaks in broiler flocks reveals emergence of novel strain in India. *Trop. Anim. Health Prod.* **44**: 1791-1795.

- TAMURA K, NEI M, KUMAR S (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:11030-11035.
- TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKIA, KUMARS (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725-2729.
- TERREGINO C, TOFFAN A, SERENA BEATO M, DE NARDI R, VASCELLARI M, MEINI A, ORTALI G, MANCIN M, CAPUA I (2008). Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. *Avian Pathol.* **37**: 487-493.
- TORO H, GODOY V, LARENAS J, REYES E, KALETA EF. (1996) Avian infectious bronchitis viral persistence in the Harderian gland and histological changes after eye-drop vaccination. *Avian Dis.* **40**: 114-120.
- TORO H, ESPINOZA C, PONCE V, ROJAS V, MORALES MA, KALETA EF (1997). Infectious bronchitis: effect of viral doses and routes on specific lacrimal and serum antibody responses in chickens. *Avian Dis.* **41**: 379-387.
- TORO H, SANTEN VAN VL, JACKWOOD WM (2012). Genetic diversity and selection regulates evolution of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* **56**:449-455.
- van HEMERT MJ, van den WORN SH, KNOOPS K, MOMMAAS AM, GORBALENYA AE, SNIJDER EJ (2008). SARS-coronavirus replication/transcription complexes are membrane-protected and need a host factor for activity in vitro. *PLoS Pathol.* **4**: e1000054.
- van ROEKEL H, CLARKE MK, BULLIS KL, OLESIUK OM, SPERLING FG (1951). Infectious bronchitis. *Am. J. Vet. Res.* **12**: 140-146.
- VILLARREAL LYB (2010). Diagnosis of Infectious Bronchitis Virüs: An Overview Concepts and Tools. Workshop: Infectious Bronchitis (IB) in the Brazilian Poultry Industry. ISSN 1516-635X Apr-Jun 2010/V.12/n.2/ 111-114.
- WANG L, JUNKER D, COLLISSE EW (1993). Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Virology* **192**:710-716.
- WANG YD, WANG YL, ZHANG Z, FAN G, JIANG Y, LIU X, DING J, WANG S (1998). Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. *Chin. J. Anim. Quarantine.* **15**: 1-3.
- WANG CH, HUANG YC (2000). Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Arch. Virol.* **145**: 291-300.

- WINTERFIELD RW, HITCHNER SB (1962). Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am. J. Vet. Res.* **23 (97)**: 1273-1279.
- WORTHINGTON KJ, CURRIE RJW, JONES RC (2008). A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathol.* **37**: 247-257.
- YU L, JIANG YH, LOW S, WANG ZL, NAM SJ, LIU W, KWANG J (2001). Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis.* **45**: 416-424.
- ZHANG CY, WEIJF, HE SH (2006). Adaptive evolution of the spike gene of SARS coronavirus: changes in positively selected sites in different epidemic groups. *BMC Microbiol.* **6**: 88.
- ZIEBUHR J, SNIJDER EJ, GORBALENYA AE (2000). Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in *Nidovirales*. *J. Gen. Virol.* **81**: 853-879.