

Türkiye genelinde broyler ve damızlıklarda IB salgınlarında IS/1494/06 IBV suşu belirlenmiştir.

Enfeksiyöz Bronşitisli Broylerlerde IB Virus Genotipleri: **Ülkemizdeki Durum**

Ülkemizde uzun yıllardan beri kanatlı sektöründe ekonomik kayıplara neden olan IBV'nin önüne geçilmesinde en iyi adım, sahadaki genotiplere spesifik aşıların uygulanması olacaktır.

YAZI: KAMİL TAYFUN ÇARLI, SERPİL KAHYA
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ, MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
FETHİYE ÇÖVEN
BORNOVA VETERİNER KONTROL VE ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

Bilindiği gibi Enfeksiyöz Bronşitis (IB) hastalığı Coronaviridae ailesinden Coronavirus cinsinde bulunan "avian infectious bronchitis virüsü" (IBV) tarafından oluşturulur. Hastalık broylerlerde klinik olarak solunum yolu ve nefritis olgularıyla seyreder. Yumurtacılarda ise genellikle solunum yolu semptomlarını takiben yumurta verim ve kalitesinde kayıplar şekillenir.

IBV 27 kb uzunluğunda pozitif duyulu bir RNA'ya sahiptir. IBV'nin majör proteinleri Membran (M), Nukleokapsid (N) ve Spayk (S)'tır. Spayk S1 ve S2'den oluşan iki alt ünitesinden S1 korunma ile ilgili bölümdür. Günümüzde S1 glikoproteininde bulunan çok değişken bölgelerin oluşumundan sorumlu gen bölgelerindeki değişimler (Nokta mutasyonu ▸

veya rekombinasyon) nedeniyle birçok serotip, genotip veya protektotip günümüzde ortaya çıkmıştır. Bu değişimlerin korunmayla ilgili sorunlarını, sahada mevcut aşılama stratejilerine rağmen IB hastalığının tavuklara hiç aşı yapılmamışçasına karşımıza çıkmasıyla gözleyebiliriz. Diğer bir deyişle, mevcut aşılar yeni gelişen veya karşılaşılan bu genotiplere karşı çoğunlukla korunma sağlayamaz.

Ülkemizde de uzun yıllardan beri IB ile ilgili benzer sorunlar yaşanmakta ve bu sorunların somut nedenlerini açıklayan geniş kapsamlı basılı bir kaynağa rastlamak olanaklı olmamış, belki bazı aşı firmalarının kendi olanaklarıyla yurtdışına örnek yollayarak aldıkları sonuçlara dayalı ve örtülü bir biçimde saptanan sonuçlar temel alınarak aşılamalara devam edilmiştir. Bu süreç içinde sahada tavuklarda çoğunlukla M41 (Massachusets) ve bazen 793/B suşları tabanlı aşı programlarıyla korunma sağlanmaya çalışılmış, ancak sahadan alınan yanıtlarda IB sorunlarının sürdüğü anlaşılmıştır; kümeslerde IB bağımlı ölümlerin %15'lere dek tırmandığı bilgileri alınmıştır. Bu bağlamda tarafımızdan başlatılan bir proje bağlamında yapılan ilk çalışmada broyler ve damızlıklarda IB salgınlarında IS/1494/06 IBV suşu belirlenmiştir. Bu çalışmada daha sonra tüm Türkiye genelinde olacak şekilde genişletilmiştir ve ilk sonuçları II. Uluslararası Beyaz Et Kongresi'nde tebliğ edilmiştir ve sonuçta tüm Türkiye'de gerek broyler, gerekse yumurtacı tavuklarda bu IBV genotipinin (IS/1494/06 IBV) yaygın olarak yerleşik olduğu saptanmıştır. Bu tebliğde de sonuçlarına kısaca değinilmiş olan ve tarafımdan özellikle önemli bir veri grubunu içeren klinik çalışmayı burada ayrıca tanımlamak istiyorum. Bu çalışma Türkiye'nin önemli tavuk yetiştiriciliği yapılan üç bölgesinden (İzmir, Bolu ve Adana) broyler kümeslerdeki spesifik olarak seçilen IB sorunlu şüpheli tavuklardan hedefli olarak alınan örneklerde sürekli IS/1494/06 IBV genotipinin belirlenmesini göstermektedir.

Ülkemizdeki kanatlı işletmelerinde Enfeksiyöz Bronşitis bağımlı kanatlı ölümlerinin %15'lere ulaştığı bildirilmektedir.



Çalışma kapsamında Bolu'dan 21, İzmir'den 9, Adana'dan 5 kümes değerlendirmeye alınmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Numuneler

Bu çalışmada, Bolu, İzmir ve Adana bölgesinde özgün bir biçimde solunum ve böbrek problemli olarak gözlemlenerek

Tablo 1. Bolu bölgesinden alınan kümes kodları ve izole edilen IBV genotipleri

KÜMES KODU (BÖLGE)	TRACHEAL SWAPLARDAN İZOLE EDİLEN GENOTİP (BLAST ANALİZİNDE EN YAKIN GENOTİPLER)
B1 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
B2 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
B3 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
B4 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
B5 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
B6 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
B7 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
B8 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
B9 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
B10 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
B11 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
B12 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
B13 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
B14 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
B15 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
B16 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
B17 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2) ve PM1, GX-NN2,THA241251,1096/97, M41
B18 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
B19 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
B20 (Bolu)	GX-NN2,THA241251,1096/97, M41
B21 (Bolu)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)



Örneklerin alındığı Adana bölgesindeki 1 kümes hariç tüm kümeslerde IBV varlığı ortaya konmuştur.



klinik IB teşhisi koyulmuş broyler tavuklardan her kümesten 20 adet olmak üzere tracheal swab alınarak laboratuvara yollanmıştır. Bu şekilde Bolu bölgesinden 21, İzmir bölgesinden 9 ve Adana bölgesinden 5 kümes değerlendirmeye alınmıştır.

IBV pozitif çıkan örneklerdeki virusun tiplendirilmesi

Virus tespit edilen örneklerden içinde virusun nükleik asidininde bulunduğu total RNA izolasyonu yapılmış ve Pouhang ve ark (2009)'da tanımlanan primerler kullanılarak virusun tüm genomundaki S1 bölgesinin genotiplendirmede kullanılan en çok değişken bölgesinden 400 baz çiftlik (bp) bir bölge çalışmamızda da kullanılmıştır. Bu bölge özgün bir nested RT-PCR ile çoğaltılarak, örneklerde hem IBV varlığı konfirme edilmiş ve hem de dizilemeye yollanacak 400 bp uzunluğundaki ampilifiye edilen DNA bantları gel elektroforezinde gözlendikten sonra jelden arındırılmış (ekstraksiyon) ve dizilemeye alınmıştır. Dizileme işlemleri ABI Prizsm 310 "Genetic Sequencer" kullanılarak gerçekleştirilmiş. Elde edilen diziler daha sonra Amerika Birleşik Devletleri NIH (National Insititute Health)'da bulunan GenBank'ta "Blast" analizine tabi tutulmuştur. Blast analizinde, kısaca bizim bulduğumuz dizi dünyada benzer olan tüm nükleotid dizileriyle internet üzerinden bir programla karşılaştırılmaktadır. Bu sayede herhangi bir elle müdahaleye izin verilmeksizin ilgilenilen ve elde edilen virus RNA dizisinin Genbank'taki hangi dizilerle en yakın olduğu kendiliğinde yüzdesel olarak sırasıyla belirlenmiş olmaktadır. Ayrıca filogenetik olarak benzer genotiplerle yakınlıkları da kendiliğinde ortaya çıkarılmış olmaktadır. Böylece elde edilen IBV'lerimizin genotipleri belirlenmiş veya diğer bir ifadeyle viruslarımız genotiplendirilmiştir.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

IBV deteksiyonu

Örneklerin alındığı, Adana bölgesindeki bir kümes hariç (A5; Tablo 3), tüm kümeslerde IBV varlığı RT-PCR testiyle belirlenmiştir. Bu durum örneklerimizin alındığı kümeslerden yapılan hastalık tanısının özgün bir biçimde klinik olarak doğru bir yaklaşımla yapıldığının teyidi şeklindeydi. Amacımız da zaten örnekleri mümkün olduğu kadar doğru bir biçimde klinik olarak IB teşhisi konulan kümeslerden almaktı.



IB Hastalığı ile ilgili sorunların en aza indirgenebilmesi için, aşılama uygulamalarının eksiksiz ve kesintisiz olarak yapılması gerekmektedir.

IBV'larının Genotiplendirilmesi

Aşağıdaki tablolarda (Tablo 1, Tablo 2 ve Tablo 3) incelenen kümes kodları, bölge ve izole edilen genotip(ler) verilmektedir. Bolu bölgesine bakılacak olursa, laboratuvarımıza yollanan 21 farklı kümesin 19'unda (%90.5) sadece IBV IS/1494/06 genotipi izole edilmiştir. Diğer bir kümeste sadece IBV M41 genotipi ile ilgili bir sorun olduğu, bir diğerinde ise M41 ve IS/1494/06 genotiplerinin dual enfeksiyonu saptanmıştır. İzmir bölgesindeki kümeslerin ▸



Antijene karşı oluşan antikor moleküllerinin kendi homolog antijenlerine bağlanma kapasiteleri, anahtar kilit ilişkisi şeklinde olmaktadır.

Bir ülkede aynı serotip büyük olasılıkla aşılama stratejilerine bağlı bir biçimde, uzun süre kalıcı olamamakta, olsa da zamana bağlı olarak insidansı azalabilmektedir.

Tablo 2. İzmir bölgesinden alınan kümes kodları ve izole edilen IBV genotipleri

KÜMES KODU (BÖLGE)	TRACHEAL SWAPLARDAN İZOLE EDİLEN GENOTİP (BLAST ANALİZİNDE EN YAKIN GENOTİPLER)
İ1 (İzmir)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
İ2 (İzmir)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
İ3 (İzmir)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
İ4 (İzmir)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
İ5 (İzmir)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
İ6 (İzmir)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
İ7 (İzmir)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
İ8 (İzmir)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
İ9 (İzmir)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)

tümünde IS/1494/06 genotipi IBV enfesiyonuna rastlanırken, Adana bölgesinde incelenen 5 kümesin 4'ünden IBV izole edilmiş; bunlardan 1'inde M41 tabanlı bir suşun sorumlu olduğu, diğer 3'ünde ise IS/1494/06 suşunun sorunlara neden olduğu belirlenmiştir.

Yukarıdaki verilere dayanarak, şu saptamaları yapmak olanaklıdır: Kümeslerin çoğunda M41 tabanlı aşılamalar yapılmaktadır. Bu bağlamda, kümeslerde IS/1494/06 genotipine bağlı enfeksiyonların görülmesi kaçınılmazdır. Bunun nedeni M41 tabanlı aşılarla elde edilen immünitenin bu İsrail Var2 (IsVar2; IS/1494/06) suşuna karşı koruma sağlamamasıdır. Koruyucu olmamasının nedeni IBV'nin genomundaki korunmadan sorumlu S1 gen bölgesinin bu iki genotip arasında gösterdiği büyük farklılıktan dolayıdır. Bu farklılık virusun tavukların epitel hücrelerine bağlanmadan sorumlu olan bu spike (S1) proteininin şekilsel yapısında oldukça büyük değişim anlamına gelmektedir. Anımsanacağı üzere, proteinlere (antijen) karşı oluşan antikor moleküllerin kendi homolog antijenlerine bağlanma kapasiteleri, anahtar kilit ilişkisi şeklinde olmaktadır. Yani bir antijene karşı oluşan antikor onun yapısal olarak tam karşıtıdır. Bu durumda, farklı genotiplerin S1 proteinindeki oluşan yapısal değişim bu genotiplerin birbirine karşı korunmada kullanılamayacağı anlamına gelmektedir. Tekrar konumuza dönecek olursak M41 veya 793/B tabanlı aşılarla yapılacak immünizasyonlar, ne kadar uygun yapılırsa yapılsın ve bu aşılara karşı kümeslerde ne kadar yüksek düzeyde bağışıklık elde edilirse edilsin, IS/1494/06 gibi farklı konfigürasyonda bir genotipin kanatlı kümeslerine girmesiyle hastalığın oluşumu kaçınılmaz olacaktır.

Diğer taraftan, çalışmamızda, tek başına M41 kökenli enfeksiyonların görülmesi bu kümeslerde M41 tabanlı aşıların doğru ▸

IBV'NİN NUMUNELERDE SAPTANMASI

IBV'nin numunelerde saptanması işlemi daha önce Callison ve ark. (2006)'nın tanımladığı yöntem temel alınarak ve tarafımızdan prob ve kullanılan reagentleri değiştirilerek, optimize edilerek modifiye edilen bir Real-Time PCR yöntemi ile yapıldı. Bu yöntemin en önemli özelliği tüm IBV varyantlarını saptayabilen, IBV tür spesifik bir PCR olmasıdır. Bu yöntem bu kapsamlı klinik çalışmaya geçilmeden önce elimizde mevcut birçok serotip ile ve IBV dışı virüslerle denenerek, sensitivitesi ve spesifisitesi tamamen emin olunmuş ve bir başka çalışmamızda da güvenli bir şekilde kullanılmıştır.

yapılmamasından kaynaklanıyor olabilir. Bu durumun teyit edilmesi için kümeslerden aşılamalar sonrası kan alınarak mümkünse ELISA ile IBV-antikor titrelerinin belirlenmesi gerekir. Böyle bir işlemin işletmeler tarafından yapılıp yapılmadığı konusunda bir bilgimiz olmamıştır. Aşı suşuyla aynı genotipte veya homolog bir suş enfeksiyonun görülmesinin bir başka nedeni de bu sürülerde IBDV (Gumboro Virus), CIAV (Tavuk Enfeksiyöz Anemi Virus) veya mikotoksikosis gibi subklinik immunosupresif etkenlerinin var olmasıdır. Bu kümeslerde bu durumda uygun aşılamalara rağmen IBV veya başka enfeksiyonların gözlenmesi kaçınılmazdır.

Bunların dışında İzmir bölgesinde bir kümeste, M41+IS/1494/06 dual enfeksiyonu saptanmıştır. Bu durum klinik açıdan çok önemlidir. Muhtemelen bu kümeste yukarıda bahsedilen sorunların çoklu halde var olduğu düşünülmüştür. Yani M41 kökenli bir aşılama sonu muhtemelen yeterli bağışıklama sağlanmamış veya sürüde bir immünosupresyon sonu bağışıklık baskılanmış ve ayrıca tamamen farklı bir protektotip (genotip) olan IS/1494/06 olguya spontan bir biçimde doğal olarak katılmış olduğunu söyleyebiliriz. Çalışmamız sürecinde sadece bir sürüde IBV saptanmamıştır. Bunun nedeni bu broyler kümeste klinik olarak IB'ye çok benzer bir enfeksiyonun varlığı olabilir. Aslında bu çalışma klinik olarak çok iyi takip edilen ve kesinlikle IB klinik şüpheli sürülerden örnek almaya dayalı olarak yapılmıştır. Bu açıdan bakıldığında sadece IBV'nin bu sürülerde taranması bizim için yeterli olmuşsa da, aslında bir solunum yolu enfeksiyonu ile karşılaşıldığında başta ND, AMPV, ORT, MG, MS gibi tüm olası solunum yolu majör etkenlerinin araştırılması tam tanının konulması için tarafımızdan kaçınılmaz olarak önerilmektedir.

Tablo 3. Adana bölgesinden alınan kümes kodları ve izole edilen IBV genotipleri

KÜMES KODU (BÖLGE)	TRACHEAL SWAPLARDAN İZOLE EDİLEN GENOTİP (BLAST ANALİZİNDE EN YAKIN GENOTİPLER)
A1 (Adana)	M41
A2 (Adana)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
A3 (Adana)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
A4 (Adana)	IS/1494/06 (Israil Varyant 2)
A5 (Adana)	İzolasyon yok

Brezilya'da Massachusetts ve Ark tiplerinin yanı sıra, 2000'li yıllarda 4/91'inde aralarında bulunduğu 5 farklı yeni genotipin gözlendiği bildirilmiştir.





Tüm dünyadaki benzer IBV genotipi belirlenmesine yönelik çalışmalara bakılacak olursa, dünyada ilk varyant IBV 1956'da Connecticut (Conn) izolatı olarak gösterilmiştir.

Dünyadaki durum

Dünyadaki benzer IBV genotipi belirlenmesine yönelik çalışmalara bakılacak olursa, dünyada ilk varyant IBV 1956'da Connecticut (Conn) izolatı olarak gösterilmiştir, yapılan retrospektif çalışmalarda bu varyant virusların 1940'lı yıllarda da var olduğu belirlenmiştir. ABD'de daha sonra önemli bir serotip olan Arkansas (ARK) IBV belirlenmiş ve bu yukarıdaki 3 tipe karşı aşılar üretilerek korunma programları uygulanmıştır ve birçok başka varyanta karşı da kombine kullanımlarıyla başarı sağlanmıştır. 1997'de DE270 varyantı ABD'de ortaya çıkmış, ancak GA98 varyantına karşı aşısı koruma sağlamamıştır. Buna karşın GA98 aşısı ile DE270 salgınları önlenebilmiştir. 2010 yılında ise yeni bir varyant olan GA08 ile yüz yüze gelinmiş ve mevcut aşılarla korunma sağlanamamıştır. Brezilya önemli bir tavuk üreticisidir. Bu ülkede Massachusetts ve Ark tiplerinin yanı sıra, 2000'li yıllarda 4/91'inde aralarında bulunduğu 5 farklı yeni genotipin gözlendiği bildirilmiştir ve Mass-tabanlı aşılarla korunmanın sağlanamadığı söylenmektedir. Avrupa'da ▸



Birçok ülkede kendi serotipleriyle mücadelede uygun aşılama programlarının geniş ölçekli kullanımları ile başarı sağlanabilmiştir.

AŞILAMA UYGULAMALARI

IB Hastalığı ile ilgili sorunların indirgenebilmesi aşılama uygulamalarının eksiksiz ve bir veya daha fazla süreç boyunca devamlı uygulanmasına bağlıdır. Aşıların tek başına uygun bir biçimde uygulanmasından tamamen olumlu koruyuculuk beklemek olanaklı değildir. Birçok ülkede kendi serotipleriyle mücadelede uygun aşılama programlarının geniş ölçekli kullanımları ile başarı sağlanabilmiştir. Bir diğer husus da, bu yoğun aşılama stratejilerinin belli bir süre kesintisiz ve ısrarcı bir biçimde devam ettirilmesidir. Bu sayede, IB hastalık vakaları tedrici bir biçimde zaman içinde gözle görülür bir biçimde azalacaktır. Bunun yanında, M41 sorun olan işletmelerde IB hastalığının çıkışı ayrıca araştırılmalıdır. M41 ve IS/1494/06 dual enfeksiyonlu bölgelerde ise aşılamalar ayrıca düşünülerek tekrar planlanmalıdır.



1970'lere dek Mass tek başına önemli bir genotip olarak karşımızda durmuştur. Daha sonra İngiltere ve Hollanda'da Mass-aşılı sürülerde hastalığa D207 (D274 olarak da bilinir), D212 (D1466 olarak da bilinir), D3896 ve D3128 adlı yeni tiplerin yola açtığı görülmüştür. Bu tiplerle mücadele onların kendilerinden üretilen özgün aşılarla yapılmıştır. Daha sonra Fransa, Belçika, İtalya, Polonya ve İspanya gibi birçok Avrupa ülkesinde yeni genotipler saptanmıştır. Bunlardan en önemli üçü, 4/91 (793B veya CR88 adlarıyla da anılır) ve Italy02 ve QX tipleri olmuştur. 793/B ABD haricinde, tüm dünyaya kısa süre içinde yayılmış ve oluşturduğu önemli kayıpları önlemek için aynı homolog suştan aşılar üretilmiştir. Bu 4/91 ve Mass tabanlı aşılarının birlikte kullanımıyla QX suşuyla mücadelede de başarı sağlanmıştır. Bunların dışında, Asya, Afrika, Avustralya, Rusya ve Orta Doğu ülkelerinde benzer veya kendi ülkelerine özgün IBV genotipleri saptanmış ve saptanmaya devam edilmektedir. Bu çalışmada daha önceki çalışmalarımızdaki bulguları destekler bir biçimde üç ayrı bölgede broyler kümeslerinin çoğunda İsrail'de 2006 yılında tanımlanan ve daha önce ilk çıkış noktasının Mısır olduğu bilinen IS/1494/06 suşu ile korunmadan sorumlu S1 genindeki analizlerde %98-99 oranlarında identikal bir IBV genotipini büyük çoğunlukla tek başına saptadık. Bu sorun İsrail'de "Massachusets" tabanlı aşılarla aşılı kümeslerde oluşmuş ve mücadelede, genotip spesifik aşılar üretilerek sorunlar en aza indirgenebilmiştir.

Genel olarak bakıldığında bir ülkede aynı serotip büyük olasılıkla aşılama stratejilerine bağlı bir biçimde, uzun süre kalıcı olamamakta, olsa da zamana bağlı olarak insidansı azalabilmektedir ve bunların yanına yeni genotipler gelebilmektedir. Bu değişim durumu avian coronoviruslar için kaçınılmaz gözükmektedir. Bu nedenle sahada IB sorunlarında, yeni genotiplerin erken tespiti ve ekonomik kayıpların zaman geçmeden önüne geçebilmek için mutlaka, klinik örneklerin alınarak IB genotiplerinin takip edilmesi gerekmektedir.

Sahada IB sorunlarında, ekonomik kayıpların önüne geçebilmek için mutlaka, klinik örneklerin alınarak genotiplerin takip edilmesi gerekir.

Sonuç olarak bu çalışmalarla, Türkiye'de IB sorunlarına neden olan IBV genotipi (leri) tarafımızdan belirlenmiş olmasına rağmen, önemli olan bu akademik bilgilerin üreticilere pratikte ekonomik bir kazanç sağlayabilmesidir. Bunun için yukarıda bildirdiğim gibi sahadaki mücadelede genotip-spesifik (IS/1494/06) aşısının kesintisiz ve tanımlandığı biçimde uzun soluklu olarak veteriner hekimler veya üreticiler tarafından kullanılmasıdır. ■

KAYNAK: Kaynaklara yazarın arşivinden ulaşabilirsiniz. ***tayfun@uludag.edu.tr***
Bu çalışmadaki veriler "Tübitak-TOVAG