

Hindi ve tavuklarda avian pneumovirus enfeksiyonlarının indirek floresan antikor testi ve reverse transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu ile teşhisi *

Tuba İÇA

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

Özet: Bu çalışmada Türkiye’de solunum problemi bulunan tavuk ve hindi sürülerinde Avian pneumovirus (APV) enfeksiyonunun varlığının belirlenmesi ve sonuçların karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlandı. Çalışmada 50 tavuk ve 20 hindi sürüsünden toplanan nazal turbinat, nazal svab, akciğer ve trakea örnekleri indirek floresan antikor testi (IFAT) ve reverse transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) teknikleri ile incelendi. RT-PCR ile yapılan çalışmalarda, incelenen tavuk sürülerinin %46’sında ve hindi kümeslerinin %50’sinde APV genomu belirlendi. IFAT ile tavuk kümeslerinin %38’inde ve hindi kümeslerinin %35’inde APV antijenlerinin varlığı saptandı. RT-PCR ile incelenen teşhis materyalleri içinde tavuklarda en yüksek pozitiflik %50 ile nazal turbinatta ve %44.1 ile nazal svabta, hindilerde ise %57.1 ile nazal svabta ve %33.3 ile nazal turbinatta belirlendi. IFAT ile en yüksek pozitiflik aynı materyallerde fakat daha düşük oranlarda tespit edildi. Her iki teknikte de, nazal svab ve nazal turbinatlardan alınan materyallerin akciğer ve trakea örneklerine göre daha uygun olduğu saptandı. APV tanısında RT-PCR’ın IFAT’a göre daha duyarlı olduğu, kullanılan organın ve enfeksiyon döneminin sonuçlara etki edebileceği kanısına varıldı.

Anahtar sözcükler: Avian pneumovirus, hindi, IFAT, RT-PCR, tavuk.

Detection of avian pneumovirus infection in chickens and turkeys by indirect fluorescent antibody test and reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Summary: The aim of this study was to detect the avian pneumovirus (APV) infection in chicken and turkey flocks with respiratory problems in Turkey. Nasal turbinate, nasal swab, lung and trachea samples collected from 50 chicken and 20 turkey flocks were examined by indirect fluorescent antibody test (IFAT) and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques in the study. APV genome was detected in 46% of chicken flocks and 50% of turkey flocks by RT-PCR. In IFAT, APV antigens were determined in 38% of chicken flocks and 35% of turkey flocks. On the basis of diagnostic materials used in RT-PCR were considered, the highest positivities were detected in nasal turbinates (50%) and nasal swabs (44.1%) of chickens; and in nasal swabs (57.1%) and nasal turbinates (33.3%) of turkeys. IFAT detected the highest positivity for APV infection in same materials with relatively lower percentages. In both techniques, nasal turbinates and nasal swabs were considered to be superior to the lung and tracheal samples for diagnosis of APV. In conclusion, it was suggested that RT-PCR was more sensitive than IFAT for the detection of APV, but test results might be affected by the test material and the time of infection.

Key words: Avian pneumovirus, chicken, IFAT, RT-PCR, turkey.

Giriş

Avian pneumovirus (APV) hindilerde üst solunum yolu problemleri ile ortaya çıkan hindi rhinotrakeitis (turkey rhinotracheitis, TRT) hastalığının etkenidir. Virus tavuklarda da görülmekte olup “Şişkin Baş Sendromu” (swollen head syndrome, SHS) olarak bilinen hastalık tablosunu meydana getirmektedir. Hastalık broyler, broyler damızlık ve yumurtacı tavuklarda baş ve alın bölgesinde derialtı ödem ve yumurta veriminde düşmeler ile karakterizedir (25, 26, 37). Etken Mononegavirales sınıfından, Paramyxoviridae ailesine, Pneumovirinae alt ailesine ve Metapneumovirus cinsine bağlı bir virustur (31). Elektron mikroskop çalışmalarında virus pleo-

morfik partiküller şeklinde görülmektedir. APV’lar tek iplikçikli, segmentsiz RNA’ya sahip virustur (1, 12, 25, 38). G glikoproteinine spesifik monoklonal antikorlar ile yapılan nötralizasyon çalışmaları (10, 28) ve virus polipeptidlerin gen sekans analizlerine göre APV’ler 4 alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar A, B, C ve D alt tipleridir (18, 19, 20, 33).

Avian pneumovirus’lardan en çok etkilenen türler tavuklar ve hindilerdir. Sülün, beç tavuğu da doğal olarak enfekte olmakta, kaz ve güvercinlerde ise deneysel yolla enfeksiyon oluşturulmaktadır (4, 11, 13). Avian pneumovirus’lar burun boşluğu respiratorik epitelinde çoğalır. En önemli yerleşim bölgesi üst solunum yolundaki

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

turbinatlardır; etken infraorbital sinuslar ve kısmen trakeanın epitel hücrelerinde çoğalır. Virus akciğer ve hava kesesinde çok az miktarda tespit edilebilmektedir (21, 34). Etkenin vücuda alınmasından sonraki 1-14. günlerde siliar malformasyon, siliumlu epitel hücrelerinin yerini siliumsuz epitel hücrelerinin alması ve üst solunum yolu epitellerinde yıkımlanma gibi patolojik değışiklikler meydana gelmektedir. Virus genital sistemde özellikle uterus ve ovidukt epitel hücrelerine de yerleşir (15, 17). Histopatolojik değışikliklerin görüldüğü 1-14 günlük periyotta, infeksiyon bölgesine *Escherichia coli*, *Bordetella avium*, *Ornithobacterium rhinotracheale* ve *Mycoplasma gallisepticum* gibi sekonder bakteriyel etkenlerin kolonizasyonu kolaylaşmakta ve sekonder hastalıklara yakalanma olasılığı artmaktadır (2, 22, 23, 26, 35).

Hayvanların klinik belirtileri tanıya yardımcı olmakla birlikte, bazı hastalıklarla karışma olasılığından dolayı yeterli değildir. Teşhis amacı ile, virusun izolasyonu ve hücre kültürlerinde yapmış olduğu sitopatolojik yapılar değerlendirilmektedir. Virusun primer izolasyonu için embriyolu tavuk yumurtasının yumurta sarı kesesine inokulasyon ya da tavuk ve hindi trakeal organ kültürleri kullanılmaktadır. Lezyonlar görüldükten sonra virus, tavuk embriyo fibroblast, tavuk embriyo karaciğer, vero, QT-35 ve BS-C-1 gibi çeşitli hücre kültürlerinde üretilmektedir. Etkenin hücre kültürlerinde üretilmesi uzun ve yorucu işlemler gerektirdiğinden, bu yöntem teşhis açısından pratik bulunmamaktadır (8, 24, 29, 36). Viral antijenleri taşıyan hayvan materyallerine immunoperoxidaz (21, 27), immunofloresan (5, 16, 17) ve immunogold (22) tekniklerinin uygulanması ile histokimyasal yolla APV tanısı gerçekleştirilebilmektedir.

Son yıllarda viral genomun saptanmasına dayalı bir teknik olan RT-PCR'ın APV'ların teşhisinde kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Etken şüpheli hayvanların dokularından direkt olarak saptanabilmektedir. Alt tip spesifik PCR ile, ya da genel PCR uygulamalarını takiben sekanslama veya restriction fragment analizleri ile de APV'lerin tespiti ve tiplendirilmesi yapılabilmektedir (9, 12).

Bu çalışmada Türkiye'de hindi ve tavuklarda Avian pneumovirus'ların varlığının antijenik ve genomik düzeyde saptanması, ve APV'lerin teşhisi amacı ile kullanılabilecek en uygun materyalin seçimi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Çalışmada test materyali olarak, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde bulunan ticari tavuk ve hindi işletmelerinden toplanan ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kanatlı Hayvan Hastalıkları Rutin Teşhis Laboratuvarına getirilen solunum sistemi problemlili tavuk ve hindilere ait nazal svab, nazal turbinat, trakea ve akciğer örnekleri kullanıldı (Tablo 1). Materyaller Ankara, Bilecik, Bolu, Çorum, İzmir, Kayseri ve Konya bölgelerinden temin edildi.

Tablo 1. Çalışmada incelenen teşhis materyallerinin dağılımları (sürü adedi).

Table 1. The number of diagnostic materials used in the study (number of flocks).

	Tavuk			Hindi	
	Broyler	Broyler damızlık	Yumurtacı	Toplam	
Nazal svab	23	2	9	34	14
Nazal turbinat	3	1	12	16	6
Trakea	3	1	12	16	6
Akciğer	3	1	12	16	6
Toplam	26	3	21	50	20

İndirek floresan antikor testi (IFAT)

IFAT, Allan ve ark. (3) ve Baxter-Jones ve ark. (5) tarafından bildirilen yöntemle göre gerçekleştirildi. Herbir sürüden alınan 5 nazal svab ve 5'er akciğer, trakea ve nazal turbinat örneklerinin herbiri 500 µl steril fizyolojik tuzlu su içerisinde homojenize edildi. Testte pozitif kontrol olarak Nobilis TRT (Intervet) aşı suşu verilen tavuklara ait nazal svablar ve solunum sistemi organları kullanıldı. Negatif kontrol olarak ise spesifik patojenlerden arı hayvanlara ait materyallerden yararlanıldı. Doku örneklerinden ve nazal svablardan elde edilen FTS homojenizatlarından 20 µl alınarak ortası çukur özel lamplara konuldu ve kurutulduktan sonra asetona ile fiks edildi. Preparatlar çalışma dilüsyonundaki (1:16) hiperimmün serum ile 30 dakika inkübe edildi. Testin tüm basamakları oda ısısında, inkubasyonlar ise 37°C'de ve nemli ortamda gerçekleştirildi. İnkubasyon süresinin sonunda preparatlar 3 kez 5'er dakika fosfat tamponlu sıvı (PBS) ile yıkandı. Preparatlar, sulandırma solüsyonu (3 kısım PBS + 1 kısım Evans blue) ile 1:32 oranında sulandırılmış floresan izotiyosiyonat işaretli rabbit-anti-chicken IgG ile 30 dakika inkübe edildi. PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Preparatların üzerine kaplama mediumu (1/10-PBS/gliserin) konularak lamel kapatıldı. Sonuçlar floresan mikroskopta 40x ve 100x objektifte bakı ile değerlendirildi. Elma yeşili rengindeki oluşumlar pozitif olarak değerlendirildi.

Reverz transkriptaz / polimeraz zincir reaksiyonu (RT/PCR)

RNA eldesi: Solunum sistemi şikayeti olan hayvanlardan alınan örnekler her sürüyü temsilen 5'li gruplar halinde toplandı. Her bir sürüye ait 5 adet nazal turbinat, trakea, akciğer örnekleri bistüri ile parçalandı. Organ türüne göre gruplandırılarak, steril cam şişelere alınan materyallerin üzerine 1ml dietilpirokarbonatlı (DEPC) su konularak homojenize edildi. Solunum sistemi şikayeti olan tavuk ve hindilerden alınarak -20°C'de saklanan kuru svablar, epitel hücrelerinin ve virusun sıvıya geçmesi amacıyla 500 µl steril distile su içinde vortekslenildi. Doku ve svab süspansiyonlarından 250 µl alınarak üzerlerine Tridity G denatürasyon solüsyonundan 750 µl

Tablo 2. Tavuk ve hindi solunum sistemi materyallerinde APV IFAT bulguları (sürü adedi).
Table 2. IFAT result of APV suspicious chickens and turkeys (number of flocks).

	IFAT (%)			
	Nazal svab (+/n)	Solunum sistemi organları (+/n)		
		Nazal turbinat	trakea	akciğer
Broyler	7/23 (30.4)	2/3 (66.6)	0/3 (0)	0/3 (0)
Broyler damızlık	1/2 (50)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)
Yumurtacı	3/9 (33.3)	5/12 (41.6)	2/12 (16.6)	2/12 (16.6)
Toplam tavuk (n=50)	11/34 (32.3)	8/16 (50)	3/16 (18.7)	3/16 (18.7)
Hindi (n=20)	5/14 (35.7)	2/6 (33.3)	1/6 (16.6)	1/6 (16.6)

Tablo 3. Tavuk ve hindi solunum sistemi materyallerinin APV RT-PCR bulguları (sürü adedi).
Table 3. RT-PCR result of APV suspicious chicken and turkeys (number of flocks).

	RT-PCR (%)			
	Nazal svab (+/n)	Solunum sistemi organları (+/n)		
		Nazal turbinat	trakea	akciğer
Broyler	13/23 (56.5)	2/3 (66.6)	0/3 (0)	0/3 (0)
Broyler damızlık	0/2 (0)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)
Yumurtacı	2/9 (22.2)	5/12 (41.6)	4/12 (33.3)	2/12 (16.6)
Toplam tavuk (n=50)	15/34 (44.1)	8/16 (50)	5/16 (31.2)	3/16 (18.7)
Hindi (n=20)	8/14 (57.1)	2/6 (33.3)	1/6 (16.6)	1/6 (16.6)

ilave edildi. Daha sonra örneklerin üzerine 200 µl kloroform eklenerek 4°C’de, 12000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki faz alınarak üzerine 500 µl izopropanol ilave edildi 4°C’de 12000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek RNA presipitatının çökmesi sağlandı. Pelet yıkandıktan sonra, kurutuldu ve 100 µl DEPC’li su ile çözdürüldü. Pozitif kontrol olarak kullanılan liyofilize TRT (İntervet) aşısı üzerinden RT-PCR’de kullanılmak üzere yukarıda tarif edildiği şekilde RNA ekstrakte edildi.

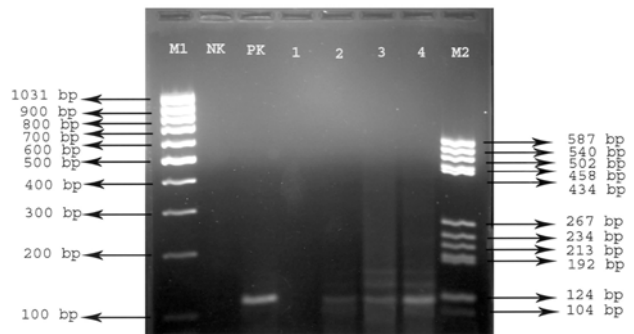
Komplementer DNA (cDNA) eldesi: Ekstrakte edilen RNA örneklerinden cDNA eldesi amacıyla RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kiti (Fermentas, Litvanya) kullanıldı. Test, kit protokolüne göre gerçekleştirildi.

Reverz transkripsiyon ve nükleik asitlerin çoğaltılması (RT-PCR): Elde edilen cDNA’ların çoğaltılması amacıyla yapılan PCR’de 50 µl’lik total hacimlerde çalışıldı. Testte Nd (5-AGC AGG ATG GAG AGC CTC TTT G-3’) ve Nx (5-CAT GGC CCA ACA TTA TGT T-3’) primerleri kullanıldı (6). Örnek başına 31 µl DEPC’li su, 5 µl 10x PCR buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, %0.8 Nonidet P40), 5 µl dNTP (2 mM), 3 µl MgCl₂ (25 mM), 0.25 µl primer 1 (100 pmol), 0.25 µl primer 2 (100 pmol), 0.5 µl Taq polimeraz enzimi ve 5 µl hedef DNA kullanıldı. Amplifikasyon, 94°C’de 15 dakikalık ön denaturasyon, 30 siklustan oluşan 94°C’de 20 saniye denaturasyon, 51°C’de 45 saniye primer bağlanması, 72°C’de 45 saniye uzatma ve son olarak 72°C’de 10 dakikalık son uzatma aşamaları ile gerçekleştirildi. Reaksiyon sonuçlarının gözlenmesi için örnekler elektroforez

için %2’lik agaroz jele yüklendi. 119 bp’da görülen bant APV için spesifik olarak değerlendirildi.

Bulgular

Farklı bölgelerden alınan tavuk ve hindilere ait çeşitli solunum sistemi materyallerine ait sürü bazında IFAT ve RT-PCR bulguları Şekil 1, Tablo 2 ve Tablo 3’de, aynı sürülere ait test sonuçlarının karşılaştırmalı bulguları Tablo 4’te verilmiştir. RT-PCR ile incelenen tavuk sürülerinin %46’sında ve hindi kümeslerinin %50’sinde APV genomu belirlendi. IFAT ile tavuk kümeslerinin %38’inde ve hindi kümeslerinin %35’inde APV antijenlerinin varlığı saptandı.



Şekil 1. APV RT-PCR elektroforezi. M1, Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder; M2, pBR322 DNA/BsuRI (*HaeIII*) DNA marker; NK, negatif kontrol; PK, pozitif kontrol; 1-4, tavuk ve hindilerin solunum sistemine ait organ örnekleri.

Figure 1. APV RT-PCR electrophoresis. M1, Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder; M2, pBR322 DNA/BsuRI (*HaeIII*) DNA marker; NK, negative control; PK, positive control; 1-4, organ samples from respiratory tract of chickens and turkeys.

Tablo 4. Sürülerde IFAT ve RT-PCR ile saptanan APV pozitiflik oranlarının karşılaştırılması.
Table 4. The comparison of APV positive flocks detected by IFAT and RT-PCR.

	Materyal	IFAT	RT-PCR
Tavuk	NS* (n=34)	11 (%32.3)	15 (%44.1)
	NT* (n=16)	8 (%50)	8 (%50)
	T* (n=16)	3 (%18.7)	5 (%31.2)
	AC* (n=16)	3 (%18.7)	3 (%18.7)
	Toplam**	19 (%38)	23 (%46)
Hindi	NS* n=14	5 (%35.7)	8 (%57.1)
	NT* n=6	2 (%33.3)	2 (%33.3)
	T* n=6	1 (%16.6)	1 (%16.6)
	AC* n=6	1 (%16.6)	1 (%16.6)
	Toplam**	7 (%35)	10 (%50)

*: NS, nazal svab; NT, nazal turbinat; T, trakea; AC, akciğer.

**: Aynı kümeden alınan solunum sistemine ait birden fazla örnekte pozitif sonuç saptandı.

Tartışma ve Sonuç

Avian pneumovirus'un neden olduğu infeksiyonların erken teşhisinde, rutin laboratuvarında en fazla kullanılan yöntemler arasında IFAT ve immunoperoksidaz bulunmaktadır. Tavuk ve hindilerde avian pneumovirus infeksiyonlarının IFAT ve IP ile teşhisinde turbinat, akciğer ve üreme organları materyal olarak kullanılmaktadır. Majo ve ark. (21), viral antijenleri IFAT ile nazal turbinat epitel hücrelerinin sitoplazmasında saptamışlardır. Araştırmacılar, viral antijeni deneysel infeksiyonun yoluna göre en erken turbinat epitel hücrelerinde saptarlarken trakea ve akciğerde infeksiyonun 5. ve 6. gününde kısa süreli olarak belirlediklerini bildirmişlerdir. Jirjis ve ark. (15) hindilerde APV'nin patogenezi incelemek amacı ile yaptıkları çalışmada infeksiyondan sonraki 2-10. günler arasında IFAT ile nazal turbinatlarda ve nazal svablarda yüksek pozitiflik saptarlarken trakeada bu oranı oldukça düşük bulmuşlardır.

Bu çalışmada, solunum problemi olan tavuk ve hindi kümeslerinden sağlanan nazal svab, nazal turbinat, trakea ve akciğer örneklerinin IFAT sonuçları sürü bazında değerlendirildiğinde, tavuk sürülerinin %38'inde, hindi sürülerinin %35'inde pozitiflik saptandı. Tavuk sürülerine ait nazal turbinatlarda %50, nazal svablarda %32.3, trakea ve akciğerde %18.7 pozitiflik bulundu. Hindi sürülerine ait nazal svablarda %35.7, nazal turbinatlarda %33.3, trakea ve akciğerde %16.6 pozitiflik belirlendi. Bu bulgular, APV tespitinde en yüksek oranda pozitifliğin nazal svab ve nazal turbinatlarda bulunduğunu bildiren yukarıdaki araştırmacıların bulguları ile paraleldir. Bu çalışmada elde edilen bulgular diğer raporlar ile birlikte değerlendirildiğinde, APV infeksiyonunun hızlı tanısında IFAT'ta kullanılacak materyal seçiminin önemi görülmektedir.

Hastalık etkenlerinin alt tiplerinin bulunması, virusun laboratuvar koşullarında üretilmesinin zor olması ve hızlı teşhis yöntemlerinin değerlendirilmesinde olası

yanlışlıklar nedeniyle, hastalığın teşhisinde moleküler temele dayalı tekniklerin kullanılmasını zorunlu hale gelmiştir. APV için geliştirilen RT-PCR gibi viral genomun tespitine dayalı teknikler ile virus, kültür ortamında çoğaltılmasına gerek kalmadan teşhis edilebilmekte ve tiplendirilebilmektedir (7, 18). Bu konudaki çalışmalar virusun farklı dokularda saptanmasına ve virus alt tiplerini belirlemeye yönelik olmak üzere iki farklı amaçla gerçekleştirilmiştir. Virusun farklı materyallerde saptanmasına yönelik yapılan bir çalışmada (32), deneysel gözburun damla yolu ile infekte edilen broylerlerde bağırsak dışında tüm organlarda 3. günde RT-PCR ile viral genom saptanırken, kanda 15. güne kadar, turninat, akciğer ve trakeada 9. güne kadar viral genom tespit edilmiştir. Ağız yolu ile infekte edilen broylerden 3. günde alınan materyallerin tümünde, akciğerde 15. güne kadar viral genom saptanmıştır. Jirjis ve ark. (14) hindilerde okuler ve nazal virus inokulasyonlarını takiben 4-6. günlerde viral genomu sadece nazal turbinatda bulmuşlar ve saha şartlarında *E.coli* ve *Pasteurella* sp. gibi sekonder infeksiyonların hastalık şiddetini arttırdığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, hindiler üzerinde yaptıkları deneysel infeksiyon sonrasında RT-PCR ile 2-6. günlerde nazal turbinatda, 2-8 günlerde nazal svablarda ve 6. günde trakeada APV varlığını göstermişlerdir (15). Pedersen ve ark. (30) ise deneysel infeksiyon sonrası APV genomunu nazal turbinat ve nazal svablarda 1-9 günler arasında RT-PCR ile saptamışlar, sinus, nazal turbinat ve kuru svablarda pozitifliği akciğer ve trakeaya göre daha yüksek oranda bulmuşlardır.

Bu çalışmada, tüm APV alt tiplerini saptayan Nd/Nx primerlerinin kullanıldığı RT-PCR ile incelenen 50 tavuk sürüsünün 23'ünde (%46) ve 20 hindi sürüsünün 10 (%50)'unda APV RNA'sı belirlendi. Pozitiflik oranları materyal tipine göre değerlendirildiğinde, tavuklarda nazal svabların %44.1'inde, nazal turbinatların %50'sinde, trakeaların %31.2'sinde ve akciğerlerin %18.7'sinde pozitiflik saptandı. Hindilerde nazal svablarda %57.1, nazal turbinatlarda %33.3, trakealarda ve akciğerlerde %16.6 oranında pozitiflik tespit edildi. Hem tavuk hem de hindi sürülerinde RT-PCR ile en yüksek oranda APV nazal svab ve nazal turbinatlarda saptandı. Bu sonuçlar viral genomun RT-PCR ile nazal turbinat ve nazal svablarda yüksek; akciğer ve trakeada düşük düzeyde saptandığını bildiren diğer araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir (14, 15, 30). Bu çalışmanın bulguları ile Shin ve ark. (32)'nin bulguları arasındaki bazı farklılıklar, araştırmacıların kullandıkları farklı infeksiyon yolu ve inokulum dozu ile açıklanabilir. APV'nin sekonder bakteriyel etkenler ile seyrettiği doğal infeksiyonlarda, alt solunum yollarının etkilenmesi sonucunda virusun organlarında daha uzun süre kalabileceği de düşünülmelidir.

IFAT ve RT-PCR bulguları karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, IFAT ile 50 tavuk sürüsünün %38'inde, 20 hindi sürüsünün %35'inde APV pozitifliği saptanırken; RT-PCR ile bu oranlar sırasıyla %46 ve %50 olarak bulundu. Bu sonuçlar, saha koşullarında APV enfeksiyonunu belirlemede, RT-PCR'ın IFAT'a göre daha duyarlı bir yöntem olduğunu göstermektedir. Ancak, IFAT ile pozitiflik saptanan bazı materyallerde RT-PCR ile viral genomun saptanamaması, materyallerdeki inhibitör maddelerin olumsuz etkileri ile açıklandı. Aynı materyallerde IFAT'ın da RT-PCR bulgularına yakın değerlerde pozitif sonuç vermesi, moleküler teknikler için alt yapısı ve teknik elemanı olmayan laboratuvarlarda rutin teşhis amacıyla IFAT'ın kullanılabilirliğini ortaya koydu. Her iki teknikte pozitif sonuç veren organ materyallerinin aynı olması, teşhis için kullanılan materyalin önemli olduğunu ve teşhis için nazal svab ve nazal turbinatların kullanılması gerektiğini gösterdi.

Kaynaklar

- Ahmadian G, Chambers P, Easton AJ (1999): *Detection and characterization of proteins encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumoviruses*. J Gen Virol, **80**, 2011-2016.
- Al Ankari A, Bradbury JM, Naylor CJ, Worthington KJ, Payne-Johnson C, Jones RC (2001): *Avian pneumovirus infection in broiler chicks inoculated with Escherichia coli at different time intervals*. Avian Pathol, **30**, 257-267.
- Allan GM, McNulty MS, Connor TJ, McCracken RM, McFerran JB (1984): *Rapid diagnosis of infectious bursal disease infection by immunofluorescence on clinical material*. Avian Pathol, **13**, 419-427.
- Anon KR (1985): *Turkey rhinotracheitis of unknown aetiology in England and Wales*. Vet Rec, **117**, 653.
- Baxter-Jones C, Grant M, Wilding GP (1986): *Immunofluorescence as a potential diagnostic method for turkey rhinotracheitis*. Vet Rec, **118**, 600.
- Bayon-Auboyer MH, Jestin V, Toquin D, Cherbonnel M, Eterradosi N (1999): *Comparison of F, G and N based PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus*. Arch Virol, **144**, 1091-1109.
- Bayon-Auboyer MH, Arnould C, Toquin D, Eterradosi N (2000): *Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup*. J Gen Virol, **81**, 2723-2733.
- Buys SB, Du Preez JH, Els HJ (1989): *Isolation and attenuation of virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa*. Onderstepoort J Vet Res, **56**: 87-98.
- Cavanagh D (2001): *Innovation and discovery: the application of nucleic acid-based technology to avian virus detection and characterization*. Avian Pathol, **30**, 581-598.
- Collins MS, Gough RE, Alexander DJ (1993): *Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies*. Avian Pathol, **22**, 469-479.
- Cook JKA (2000): *Avian pneumovirus infections of turkeys and chickens*. Vet J, **160**, 118-125.
- Cook JKA, Cavanagh D (2002): *Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses)*. Avian Pathol, **31**, 117-132.
- Gough RE, Collins MS, Cox WJ, Chettle NJ (1988): *Experimental infection of turkeys, chickens, ducks, geese, guinea fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus*. Vet Rec, **123**, 58-59.
- Jirjis FF, Noll SL, Halvorson DA, Nagaraja KV, Townsend EL, Sheikh AM, Shaw DP (2000): *Avian pneumovirus infection in Minnesota turkeys: Experimental reproduction of the disease*. Avian Dis, **44**, 222-226.
- Jirjis FF, Noll SL, Halvorson DA, Nagaraja KV, Shaw DP (2002): *Pathogenesis of avian pneumovirus infection in turkeys*. Vet Pathol, **39**: 300-310.
- Jones RC, Baxter-Jones C, Wilding GP, Kelly F (1986): *Demonstration of a candidate virus for turkey rhinotracheitis in experimentally inoculated turkeys*. Vet Rec, **119**, 599-560.
- Jones RC, Williams RA, Baxter-Jones C, Savage CE, Wilding GP (1988): *Experimental infection of laying turkeys with rhinotracheitis virus: Distribution of virus in the tissues and serological response*. Avian Pathol, **17**, 841-850.
- Juhasz K, Easton AJ (1994): *Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups*. J Gen Virol, **75**, 2873-2880.
- Li J, Ling R, Randhawa JS, Shaw K, Davis PJ, Juhasz K, Pringle CR, Easton AJ, Cavanagh D (1996): *Sequence of nucleocapsid protein gene of subgroup A and B avian pneumovirus*. Virus Res, **41**, 185-191.
- Ling R, Davis PJ, Yu Q, Wood CM, Pringle CR, Cavanagh D, Easton AJ (1995): *Sequence and in vitro expression of the phosphoprotein gene of avian pneumovirus*. Virus Res, **36**, 247-257.
- Majo N, Allan GM, O'loan CJ, Pages A, Ramis A (1995): *A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chickens, turkey poults, and broiler breeders experimentally infected with turkey rhinotracheitis virus*. Avian Dis, **39**, 887-896.
- Majo N, Marti M, O'loan CJ, Allan GM, Pages A, Ramis A (1996): *Ultrastructural study of turkey rhinotracheitis virus infection in turbinates of experimentally infected chickens*. Vet Microbiol, **52**, 37-48.
- Majo N, Gibert X, Vilafranca M, O'loan CJ, Allan GM, Costa L, Pages A, Ramis A (1997): *Turkey rhinotracheitis virus and Escherichia coli experimental infection in chickens: histopathological, immunocytochemical and microbiological study*. Vet Microbiol, **57**, 29-34.
- McDougall JS, Cook JKA (1986): *Turkey Rhinotracheitis: preliminary investigations*. Vet Rec, **118**, 206-220.
- Morley AJ, Thomson DK (1984): *Swollen-head syndrome in broiler chickens*. Avian Dis, **28**, 238-243.
- Naylor CJ, Jones RC (1993): *Turkey Rhinotracheitis: a review*. Vet Bull, **63**, 339-449.

27. **O'loan JC, Allan G** (1990): *The detection of turkey rhinotracheitis virus antigen in formaline fixed, paraffin embedded tissue using a streptavidin a streptavidin-biotin-immunoperoxidase method.* Avian Pathol, **19**, 401-407.
28. **Obi T, Kokumai N, Ibuki A, Takuma H, Tanaka M** (1997): *Antigenic differentiation of turkey rhinotracheitis virus strains using monoclonal antibodies and polyclonal antisera.* J Vet Med Sci, **59**, 795-799.
29. **Panigrahi B, Senne DA, Pedersen JC, Glidlewsk T, Edson RK** (2000): *Experimental and serologic observations on avian pneumovirus (APV/turkey/Colorado/97) infection in turkeys.* Avian Dis, **44**, 17-22.
30. **Pedersen JC, Senne DA, Panigrahy B, Reynolds DL** (2001): *Detection of avian pneumovirus in tissues and swab specimens from infected turkeys.* Avian Dis, **45**, 581-592.
31. **Pringle CR** (1999): *Virus taxonomy-1999.* Arch Virol, **44**, 421-429.
32. **Shin HJ, Rajashekara G, Jirjis FF, Shaw DP, Goyal SM, Halvorson DA, Nagaraja KV** (2000): *Specific detection of avian pneumovirus (APV) US isolates by RT-PCR.* Arch Virol, **145**, 1239-1246.
33. **Tarpey I, Huggins MB, Davis PJ, Shilleto R, Orbell SJ** (2001): *Cloning, expression and immunogenicity of the avian pneumovirus (Colorado isolates) F protein.* Avian Pathol, **30**, 471-474.
34. **Van De Zande S, Nauwynck H, De Jonghe S, Pensaert M** (1999): *Comparative pathogenesis of a subtype A with a subtype B avian pneumovirus in turkeys.* Avian Pathol, **28**, 239-244.
35. **Van De Zande S, Nauwynck H, Pensaert M** (2001): *The clinical, pathological and microbiological outcome of an Escherichia coli O2:K1 infection in avian pneumovirus.* Vet Microbiol, **81**, 353-365.
36. **Wilding GP, Baxter-Jones C, Grant M** (1986): *Ciliostatic agent found in rhinotracheitis.* Vet Rec, **18**, 735.
37. **Wyeth PJ, Gough RE, Chettle N, Eddy R** (1986): *Preliminary observations on a virus associated with turkey rhinotracheitis.* Vet Rec, **119**, 139.
38. **Yu Q, Davis PJ, Li J, Cavanagh D** (1992): *Cloning and sequencing of the matrix protein (M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveal a gene order different from that of respiratory syncytial virus.* Virology, **186**, 426-434.

Geliř tarihi : 01.03.2005 / Kabul tarihi: 11.03.2005

Yazıřma adresi:

Dr.Tuba İa

Erciyes Üniversitesi

Veteriner Fakóltesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

38090 Kocasinan / Kayseri