

Civcivlerde Deneysel Oluşturulan Gumboro (Ibd) İnfeksiyonu Üzerine Vitamin E ve Selenyum'un Etkisi *

Aydın GÜREL**, Gülhan TÜRKMEN***, Burak KUŞÇU****,
Tahsin YEŞİLDERE*****

Geliş Tarihi: 03.07.2002

Özet: Bu çalışmada, beş günlükten itibaren yemlerine 200 ppm Vitamin E (Vit E) ve sularına 1,75 mg/l Selenyum (Se) katılmış olan civcivlere, 11. gün IBD virusu (İBDV) verilerek civcivlerde Gumboro hastalığının gelişimi incelendi.

Bu amaçla 60 tane günlük SPF civciv kullanıldı. Bu civcivlerin 48 tanesi deney, 12 tanesi kontrol grubunu (E grubu) oluşturdu. Deney grubunu oluşturan civcivler 12'şer civcivden oluşan Vit E + Se+ IBDV(Agrubu), Vit E + IBDV (Bgrubu), Se + IBDV (Cgrubu), IBDV (Dgrubu) olmak üzere dört gruba ayrıldı ve ayrı kümeslere alındı. 5-17 günler arası ilgili gruplara yukarıda belirtilen dozlarda Vit E ve Se verildi ve kontrol grubu dışındakilere 11. gün IBDV inokule edildi.

Deney ve Kontrol gruplarındaki civcivlerden inokulasyon sonrası 9. ve 15. günlerde alınan kan serumlarında IBDV antikor düzeyleri belirlendi. İnokulasyon sonrası 15. gün sakrifiye edilen piliçlerin nekropsisi yapılarak bursa Fabricius lezyonları belirlenip, bursal indeks değerleri tespit edildi.

Bursa Fabricius'ta oluşan makroskopik ve mikroskopik lezyonlara ve bursal indeks değerlerine göre, çalışmada A ve B gruplarındaki civcivlerde gelişen Gumboro hastalığı lezyonlarının, diğer gruplardaki civcivlerde gelişen Gumboro lezyonlarına göre daha sınırlı ve hafif olduğu saptandı. Çalışmada bütün gruplarda kan serumlarında saptanan optik dansite değerlerinin birbirine çok yakın olduğu görüldü. Farklı günlerde alınan bu serum antikor düzeyleri artmasına rağmen değerlerinin birbirine yakın bulunması, virusun antijenik özelliğinin zayıf olmasına, veriliş yoluna v.b. bazı kriterlere bağlı olduğu ve bu hayvanlarda humoral bağışıklığın oluşum süresinin tam olarak tamamlanmadığı sonucuna varıldı. Bu nedenle yeme ve suya Vit E ve Se katılmasının IBDV antikor düzeylerine etkisi net olarak saptanamadı.

Sonuç olarak, özellikle klinik bulgular, b.Fabricius'ta saptanan makroskopik ve mikroskopik lezyonlara göre A ve B gruplarında Gumboro hastalığı klinik bulgu ve lezyonlarının diğer gruplardakilerine göre daha sınırlı ve hafif geliştiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Vitamin E, Selenyum, Gumboro (IBD) hastalığı, Patolojik bulgular

The Effect of Vitamin E and Selenium on the Progression of Gumboro (IBD) Disease of Chicks

Summary: The progression of Gumboro disease (IBD) was investigated on chicks which received daily 200 ppm vit E within the feed and 1.75 mg / l Se within drinking water, starting at the age of 5 days and challenged with IBD virus at the age of 11 days.

* Bu çalışma İ.Ü. Araştırma fonu'na desteklenmiştir, (Proje No: 773/ 131295)

** Doç. Dr., İ.Ü.Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı 34850 Avcılar/İstanbul

*** Doç. Dr., İ.Ü.Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı 34850 Avcılar/İstanbul

**** Dr. İ.Ü. Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı. 34850. Avcılar/İstanbul

***** Prof. Dr., İ.Ü. Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı. 34850. Avcılar/ İstanbul

For this purpose, 60 SPF chicks were used. 48 of these comprised the trial group, while the remaining 12 were kept as controls (Group E). The trial group was again divided into 4 subgroups consisting of 12 birds each, and the birds were kept in separate pens in order to comprise (Group A) Vit E + Se + Gumboro; (Group B) Vit E + Gumboro; (Group C) Se + Gumboro; (Group D) Gumboro trial groups. Between days 5 and 17, the birds were supplemented with Vit. E and Se with the doses as indicated above and all birds except the control group were inoculated with IBD virus at 11 days old.

IBDV antibody levels were determined by blood sera samples of the trial and control birds obtained at day 9 and day 15 P.I. At the end of trial period - i.e. 15th day P.I -, necropsies were performed on sacrificed chicks and the lesions on the bursae of Fabricii and Bursal Index values were determined. Samples from the bursas and other organs were collected and sections prepared from the samples were examined under a light microscope after staining with H&E.

Considering the macroscopical and microscopical lesions on the bursae of fabricii and the Bursal Index values, lesions in groups A and B were determined to be slighter and more limited than the lesions observed in other groups.

In this study, the optical densities determined in the blood sera of all subgroups were found to be very close to each other. Although the sera antibody levels were found to increase within different time intervals, this close relation between different groups were found to have arisen from the inadequate time for the birds to develop humoral immunity because of reasons such as weak antigenic properties of the virus, route of inoculation and etc. Thus, it was impossible to interpret the effects of vit E and Se supplementation on IBDV antibody levels, As a result, according to our particular clinical observations and macroscopical or microscopical findings, Gumboro disease related lesions were determined to develop slighter and more limited in groups A and B.

Key Words: Vitamin E, Selenium, Gumboro (IBD) disease, Pathological findings.

Giriş

Vitamin E (Vit.E) ve Selenyum (Se), savunma mekanizmalarının en önemli komponentlerindedir. Hayvanlar Vit. E ve Se.'u kendi vücutlarında sentezleyemedikleri için bu maddeleri belirli oranlarda diyetle almak zorundadırlar. Bu maddeler alındığı zaman kan ile doku ve organlara dağılarak buralarda oluşacak kontrol edilemeyen oksidasyonlara karşı buraları korurlar^{2,6,20}.

Günümüze kadar yapılan birçok araştırma sonucunda Vit. E'nin yüksek etkili bir antioksidan olduğu ortaya konmuştur. Bir antioksidanın en önemli özelliği, serbest radikaller adı verilen son derece reaktif, potansiyel olarak zararlı molekülleri stabilize etme yeteneğine sahip olmasıdır. Hücrelerde O₂ metabolizması sırasında ortaya çıkan yüksek düzeydeki süperoksit ve hidrojen peroksit gibi serbest radikaller önemli bir antioksidan olan Vit. E tarafından imha edilirler. Bunların imha edilmesi ile hücrenin yapısal bütünlüğü korunarak, hücrelerden, gerekli besinler ve metabolitlerin anormal olarak boşalmaları önlenir^{6,10,11,20}.

Se, dokularda bulunan esansiyel bir mikronutrient olan Glutathion peroksidaz (GSHpx) enziminin komponentidir. Selenyum da Vit. E gibi antioksidan olarak görev yapar. Vit. E hücre membranlarını lipid peroksidaza karşı korurken, GSHpx enzimi hücre içindeki lipid peroksidasyonu düzeyini düşürebilmektedir^{6,11,20,31}.

Yapılan çalışmalarda, kanatlılarda immün sistem fonksiyonunun zenginleşmesinde besin maddelerinin önemi ortaya konmuş, insanlarda ve hayvanlarda Vit. E ve Se'un immün cevapta etkili olduğu gösterilmiştir^{10,16,17,23,25}. Kanatlılarda ve ratlarda günlük yeme fazla miktarlarda Vit. E eklenmesinin humoral cevabı ve makrofaj fagositik fonksiyonunu arttırdığı saptanmıştır^{2,11,16,23,35,30}. Cıvıclerde 22 IU / kg Vit. E kapsayan bazal diyete, 132 IU / kg Vit. E eklenerek yapılan bir çalışmada³², uygulanan antijene karşı (koyun eritrosit) antikor cevabında uyarılma olduğu gözlenmiştir.

Tavuklarda yemdeki günlük Vit. E seviyesi 43 mg'dan 193 mg / kg'a çıkartıldığında, deneysel oluşturulan E. coli enfeksiyonlarında ölümün azaldığı^{15,19}, Newcastle, Egg Drop Syndrome, ve Gumboro hastalıklarına karşı hazırlanan inaktif aşılara adjuvant olarak Vit. E eklenmesiyle, bu hastalık etkenlerine karşı daha hızlı ve yüksek antikor cevabı elde edildiği belirtilmiştir^{4,12,13}. Bu konuda yapılan bir başka çalışmada²⁹, 1. günde IBDV ile enfekte edilen cıvıclere, aynı gün içme suyu yoluyla 25 ppm Vit E ve Se verilmeye başlanmış ve Vit. E ve Se verilmesi deney sonuna kadar (7. hafta sonuna kadar) devam etmiş ve çalışma sonucunda Gumboro hastalığı olan cıvıclerde Vit. E ve Se verilmesine bağlı olarak immün cevabın zenginleştiği bildirilmiştir.

Gumboro, Birnaviridae ailesine ait IBD virusu tarafından oluşturulan, çok bulaşıcı ve

immunosuppressive bir hastalıktır. Hastalık her yaştaki civciv ve tavuklarda meydana gelirse de, en fazla 3-8 haftalık civcivlerde görülür. IBD virusu, lenfoid organlara karşı belirgin bir affinite gösterir ve kanatlılarda humoral immunitenin primer organı olan b. fabricius'ta lenfoid hücrelerde nekroz oluşturarak folliküllerde lenfoid tükenme meydana getirir^{5,14}.

Bütün viral hastalıklarda olduğu gibi, Gumboro hastalığında da tedavi yoktur. Belirli dönemlerde yapılan aşılama ile, yani tavuklarda aktif bağışıklık oluşturularak hastalıktan korunulmaya çalışılır. Fakat bu yöntemle de aşılama hatalarından, aşının direkt kendisindeki bozukluklardan, virus süşunun patojenitesinin yüksekliliği gibi durumlardan dolayı her zaman istenilen başarı sağlanılamamaktadır.

Vit. E'nin ve Se'un diyetle belirli oranlarda verilmesi ile kanatlılarda değişik enfeksiyonlara karşı önemli başarılar elde edildiği literatürlerde^{10,16,17,23,25} belirtilmiştir. Bu çalışmada 11 günlük civcivlerde deneysel Gumboro hastalığı oluşturup, belirli dozda ve sürede yemle Vit. E ve su ile Se vererek Gumboro hastalığının gelişiminde, Vit. E ve Se'un etkilerini belirlemek amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

1.A) Deneysel Hayvanı: Çalışma materyalini Tarım- Köyişleri Bakanlığı Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü'nden alınan 125 adet SPF yumurtadan çıkan 60 adet SPF Leghorn civciv oluşturdu. Bu civcivlerden 48 tanesi deney grubunda 12 tanesi de kontrol grubunda kullanıldı.

1. B) Kümes: Civcivlerin konulması için 2 ayrı odada uygun kümesler yapıldı. Odalardan birisi eşit büyüklükte ve 12'şer civcivin kalabileceği 4 bölüme ayrıldı. Diğer oda ise kontrol grubu civcivler için kullanıldı. Isıtma, tepeden sarkıtılan elektrikli radyan ile sağlandı. Çalışma süresince deney grupları ve kontrol gruplarındaki civcivlerin bakımı farklı kişiler tarafından yapıldı. Gerek civcivler kümese konulmadan önce, gerekse sonraki aşamalarda dezenfeksiyon kurallarına özen gösterildi

1.C) Deneysel Grupları: Çalışmada kullanılan 60 adet günlük civciv, ilk 5 gün birarada ba-

kıldıktan sonra, 5. gün herbirinde 12 civcivin bulunduğu

A (Vit. E + Se + IBDV)
B (Vit E + IBDV)
C (Se + IBDV)
D (IBDV)
E (Kontrol) şeklinde olmak üzere 5 gruba ayrıldı.

1.D) Yem: Çalışmada, içerisinde normalde 10 I.Ü. Vit. E bulunan ticari civciv yemi kullanıldı. Yeme katılan Vit. E, DL - α tokoferol asetat olarak, Se da Sodyum Selenit olarak Roche Müstahzarları'ndan alındı. Programa göre, A ve B grubundakilere, Vit. E, yem içerisinde 200 ppm dozunda verildi. Bunun için, yem içerisine toz halinde Vit. E döküldükten sonra blender'da 5 dakika karıştırılıp homojen bir karışım elde edildikten sonra ilgili gruplara verildi. Se ise, 1,75 mg/lit dozunda su içerisinde A ve C gruplarına verildi. Tüm çalışma süresince D ve E gruplarına ve diğer gruplara da Vit. E ve Se eklenmediği günlerde ticari yem ve içme suyu verildi.

1.E) Virus: Gumboro hastalığını oluşturmak için $EID_{50} = 6,3 \times 10^6$ /ml olan IBDV G 34 klasik saha suşu Tarım - Köyişleri Bakanlığı Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü'nden temin edildi. Bu virus kullanılabileceği kadar $-20^{\circ}C$ 'de saklandı ve civcivlere 0,1 ml dozunda intraokuler olarak eprüve edildi.

1.F) Organ: Yirmi beşinci günde kesilen hayvanlardan histopatolojik inceleme için b. Fabricius, dalak, karaciğer, böbrek ve sekal tonsiller alınarak Bouin solusyonunda tespit edildi. Serumda Vit. E ve Se tespiti ve IBDV antikoru düzeylerinin tayini için alınan serumlar kullanılabileceği kadar $-20^{\circ}C$ 'de saklandı.

1. G) Deneysel Plan: Yukarıdaki şekilde gruplara ayrılan 60 civcivden 5. gün kan alındı ve aynı günden itibaren 17. güne kadar A ve B grubundaki civcivlere 200 ppm dozunda Vit. E yeme karıştırılarak, A ve C grubundaki civcivlere de 1,75 mg / lit dozunda Se ise içme suyuna karıştırılmak suretiyle verildi. Diğer gruplara ise ticari civciv yemi verildi. Yeme ve suya Vit.E ve Se eklenmesine 2 günde bir olmak üzere 17. güne kadar devam edildi. On yedinci günden sonra bütün gruplardaki civcivlere, deney sonu olan 25. güne kadar ticari civciv yemi verildi. Kontrol grubu dışında diğer gruplardaki bütün civcivlere 11. Gün, Gumboro hastalığı oluşturmak amacıyla $EID_{50} = 6,3 \times 10^6$ /1 ml olan IBDV virusu G 34

klasik suşundan intraokuler yolla 0,1 ml dozda eprüve edildi.

P.I.'nin 9. günü (20.gün) bütün gruplardaki civcivlerin kanat venasından kan alındı, P.I.'nin 15. günü (25. gün) ise bütün gruplardaki civcivler kesilerek kan ve organlar alındı. Ayrıca, 25. günde kesilen civcivlerin canlı ağırlıkları ve b. Fabricius ağırlıkları ölçüldü ve Bursal indeks değerleri = Bursa ağırlığı (gr)/Vücut ağırlığı (gr) formülü ile hesaplandı. 5., 20. ve 25. günlerde alınan kanlardan ayrılan serumlarda spektrofotometrik metodu¹⁸ ile Vit.E ve Se düzeyleri, 5., 20. ve 25. günlerde alınan kanlardan ayrılan serumlarda ise ELISA yöntemi ile IBDV antikor düzeyleri tespit edildi. Histopatolojik incelemeler için 25. günde kesilen civcivlerden b. Fabricius, dalak, karaciğer, böbrek ve sekal tonsillerden örnekler alınarak Bouin solusyonuna konuldu. Daha sonra bilinen işlemlerden²² geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak, Hematoksilin Eozin (H-E) boyası ile boyanıp ışık mikroskopunda incelendi.

1.H) Serolojik Testler:

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): Alınan serumlardaki IBDV antikorları kantitatif yönden incelemek amacı ile, embriyolu tavuk yumurtasında üretilmiş virus antijenleri, yapıştırma solusyonu ile 96 kuyulu plakalara yapıştırıldı ve 4°C'de 1 gece bekletildi. Plakalar Tween 20 içeren PBS-Tween ile yıkandı ve üzerine 1:100 oranında SPF koyun serumu içeren PBS-Tween'den 100 µl ilave edildi ve oda ısısında 1 saat bekletildikten sonra yıkandı. Plakada bulunan 4 kuyuya pozitif kontrol serumu, 4 kuyuya negatif serum (AGID testi ile negatifliği saptanan) ve diğerlerine de test serumları 1:100 dilüsyon yapılarak 100 µl miktarında konuldu. 4 kuyu boş bırakıldı. Oda ısısında 60 dakika bekletildikten sonra yıkandı. Alkalın fosfataz ile konjuge edilmiş tavşan anti-tavuk antikorları 1:500 oranında dilüe edilerek 100 µl miktarında plakalara kondu ve oda ısısında 30 dakika bekletildi. PBS-Tween ile yıkandıktan sonra fosfataz substrat eklenerek oluşan reaksiyon, 405 nanometre dalga boyunda okunarak değerlendirildi ve kesme değeri hesaplandı.

Bulgular

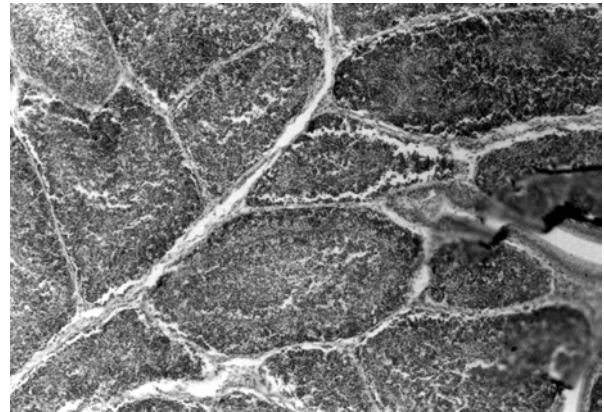
Çalışma süresince deney gruplarındaki civcivlerde IBD virusunun inokulasyonundan sonraki 2. ve 3. günlerde özellikle D grubundaki piliç-

lerin 8'inde çok belirgin olmak üzere, B grubundakilerin 4 ve A grubundakilerin ise 2 adedinde beyazımtırak renkte bir ishalin meydana geldiği gözlemlendi. Ayrıca bu gruplardaki piliçlerde tüy kabarıklığı ve halsizlik gibi genel bulgular da görüldü. Bunlar özellikle D grubundaki piliçlerde daha belirgindi. Deney gruplarındaki civcivlerin Vit.E ve Se kan serum düzeylerinde özellikle 15. ve 25. günlerde istatistiki yönden önemli olan belirgin artışlar meydana geldiği tespit edildi (Tablo. I). Çalışmada, bütün gruplardaki civciv ve piliçlerin bursal indeks değerleri topluca Tablo II'de verildi. Aynı tabloda her grup için bursal indeks ortalamaları gösterildi. Bursal indeks değeri 0,56 gramın altında olan bursa Fabricius'lar atrofik olarak değerlendirildi. 0,56 gram sınır değeri, kontrol grubunda bulunan civcivlerin bursal indekslerinin ortalaması alınarak, belirlendi. Buna göre A grubunda 8, B grubunda 7, C grubunda 12, D grubunda 12 adet piliçin b. Fabricius'larının atrofik olduğu belirlendi.

Çalışmada bursa Fabricius'ta saptanan mikroskopik bulgular çoğunlukla birbirine benzer olduğu ve her grupta aynı şeyleri tekrarlamaktan kaçınmak için lezyonlar derecelendirilerek tablo halinde verildi. Bu amaçla her grupta civciv ve piliçlerin bursa Fabricius'larında meydana gelen bulgular, 0, + 1, + 2, + 3 olarak aşağıdaki gibi derecelendirildi ve Tablo III'de gösterildi.

Bursa Fabricius'taki mikroskopik değişimler aşağıdaki şekilde derecelendirildi:

0: b.Fabricius normal yapıda (Şekil -1).



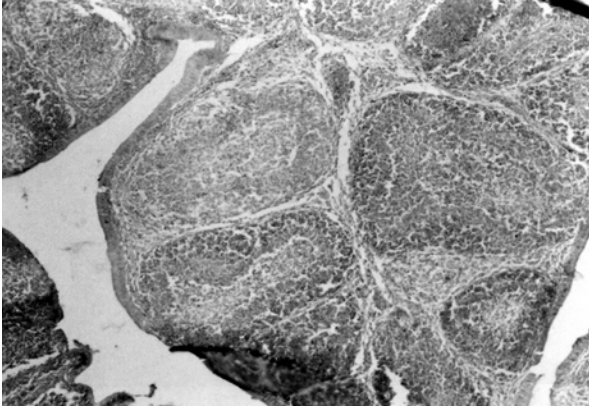
Şekil 1:

E grubu 7 No'lu civcive ait normal yapıda b. Fabricius (Derece 0) H&E X100.

Normal structure of b. Fabricius taken from the chick No 7 from group E (Score 0) H&E X100.

+1: Lamina epitelyalis ve Lamina muskularis katları normal durumda. Her piliçada

ortalama 5-6 follükülün korteks ve medulla bölgelerinde yaklaşık 40-50 lenfoid hücrede piknozis ve karyoreksiz görülmekte. Bazı follüküllerde medullar bölgede lenfoid tükenme gözlenmekte (Şekil –2).



Şekil 2:

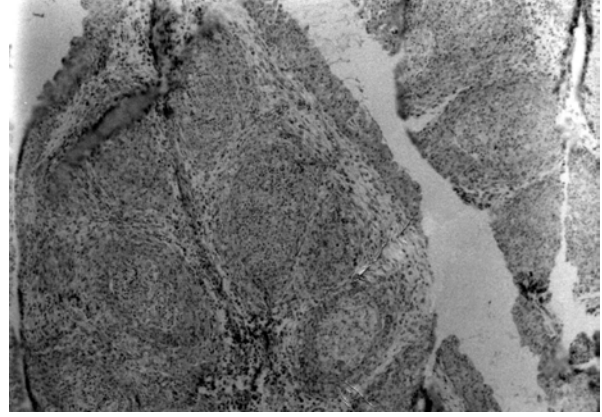
A grubunda 5 No'lu civcive ait b.Fabricius'taki follüküllerin bazılarında lenfoid tükenme (Derece 1) H&E X 100

Lymphoid depletion in some of the follicles in b. Fabricius taken from the chick No 5 from group A (Score 1) H&E X100

+2: Her plikada lamina epitelyalis tabakasında ortalama 2-3 adet kistik yapı gözlenmekte. Plikalarda follüküller farklı büyüklükte ve 8-10 follükülde koagulyasyon nekrozu oluşmuş, bazı follüküllerde de intrafollüküler olarak lenfoid hücreler yanında histiyosit, epitel benzeri hücreler görülmekte, ayrıca interfollüküler alanlarda da yine histiyosit, epitel benzeri hücreler ve heterofillerden oluşan hücre infiltrasyonları gözlenmekte. Bu hücre infiltrasyonlarının, çoğu plikalarda özellikle lamina epitelyalis tabakası altında yoğun olduğu, bazı plikalarda da interfollüküler alanlarda yoğunlaşmanın olduğu görülmüyor (Şekil-3).

+3: Lamina epitelyalislerde oluşan kistik yapıların sayıları artmış durumda. Lamina epitelyaliste çok sayıda invaginasyonlar gözleniyor. Lamina muskulariste yer yer makrofaj ve heterofil infiltrasyonları görülmüyor. Bütün plikalarda interfollüküler alanlar, yoğun olarak histiyosit, retikulüm hücreleri, epitel benzeri hücreler gibi RES hücre infiltrasyonları, heterofil lökositler le dolu durumda. Bu infiltrasyonlar arasında yer yer de eritrositlere rastlanmakta. Follüküllerin çoğu atrofik yapıda ve interfollüküler alanlardaki hücre infiltrasyonlarının benzer-

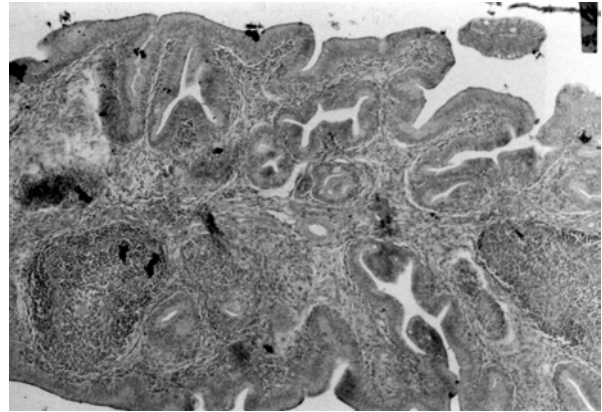
leri intrafollüküler olarak çok sayıda follükülde gözlenmekte. Yine çok sayıda follükül de bez benzeri yapılara dönüşmüş durumda (Her plikada 10-12 follükül) (Şekil – 4).



Şekil 3:

C grubunda 5 No'lu civcive ait b.Fabricius'taki follüküllerin bazılarında koagulyasyon nekrozu, interfollüküler alanlarda hücre infiltrasyonu (Derece 2) H&E X 100

Cellular infiltrations in interfollicular areas and coagulative necrosis in some of the follicles in b. Fabricius taken from the chick No 5 from group C (Score 2) H&E X100



Şekil 4:

D grubunda 12 No'lu civcive ait b.Fabricius'ta lamina epitelyalis'te invaginasyonlar, interfollüküler alanlarda hücre infiltrasyonu ve bez benzeri yapılar (Derece 3) H&E X 100

Invaginations in lamina epithelialis, cellular infiltrations in interfollicular areas and gland-like structures in b. Fabricius taken from the chick No 12 from group D (Score 3) H&E X100

A ve B grubundaki civciv ve piliçlerin da-

lendi. Bu değişimlere C grubundaki 5 piliçin da-lağında daha hafif düzeyde rastlandı.

Deney ve kontrol gruplarını oluşturan piliç-lerin mikroskobik olarak incelenen karaciğer ve böbrek kesitlerinde herhangi bir bulguya rastlan-madı. A grubunda 11, ve B grubunda ise 10 pili-çin Sekal tonsillerinde lenfoid merkezlerde belir-gin bir genişlemenin oluştuğu saptandı.

Serolojik Bulgular:

A) ELISA: Pozitif kontrol serumların optik dansite (OD) değerlerinin ortalaması 0,799 ve negatif kontrollerin OD değerlerinin ortalaması 0,415 bulundu. Kesme değeri hesaplanarak 0,670 OD değerin üstünde olanlar infeksiyon yönünden pozitif kabul edildi.

yinde) anlamlı bulundu (Tablo I). A ve C grupla-rında ise 15. ve 25. günlerde saptanan serum Se düzeyleri kontrol grubuna kıyasla istatistiki ola-rak anlamlı ölçüde ($p < 0.01$) yüksek bulundu (Tablo I). Bu bulgular, yemlerine Vit E ve Se ka-tılarak yapılan araştırmaların bulgularıyla da pa-ralellik göstermektedir^{3,7,8,26}.

Post inokulasyonun 15. günü nekropsisi yapılan civcivlerin bursal indekslerini gösteren tablo incelendiğinde (Tablo II), kontrol grubu dışındaki diğer 4 gruptaki civcivlerden alınan b.Fabriciusların çoğunluğu, bursal indeks değ-erlerinin 0,56 gramın altında olması nedeniyle atrofik olarak değerlendirildi. Sadece B grubundan 4 civcivin, A grubundan da yine 4 civcivin bursalarında atrofinin oluşmadığı saptandı. Atrofik olarak değerlendirilen b.Fabriciuslar ken-

Tablo I. Deney ve kontrol gruplarındaki piliçlerin serum Vit E ve Se düzey ortalamaları.
Table I. Serum Vit E and Se level means in chicks of both control and experimental group

Gruplar Gün		A X ± Sx	B X ± Sx	C X ± Sx	D X ± Sx	E X ± Sx
5. gün	Vit E (ppm)	3.82±0.36	3.51±0.47	4.18±0.20	3.76±0.25	3.72±0.24
(n=12)	Se (mg/l)	0.121±0.003	0.128±0.006	0.117±0.005	0.132±0.005	0.137±0.02
15.gün	Vit E	19.57±0.65*	18.62±1.09*	3.92±0.30	3.78±0.19	3.79±0.19
(n=12)	Se	0.233±0.001*	0.136±0.006	0.256±0.008*	0.142±0.008	0.132±0.02
25.gün	Vit E	14.93±0.47*	16.73±1.09*	4.68±0.27	3.64±0.27	3.63±0.20
(n=12)	Se	0.213±0.001*	0.132±0.006	0.206±0.008*	0.145±0.01	0.139±0.02

* $p < 0.01$. Kontrol Grubuna Kıyasla

Aynı şekilde, 5., 20. ve 25. günlerde alınan serumlar IBDV antikorları yönünden test edildi ve 5. gün alınan civciv serumlarının net OD de-ğerlerinin ortalaması 0,386 olarak bulundu. Yir-minci gün alınan kan serumlarında ELISA testi ile IBDV antikorları 0,670'in üzerinde OD göste-ren serum saptanmadı (Tablo IV). Aynı civcivler-den P.I.'nin 15. günü (25. gün) alınan serum ör-neklerinde B grubunda 2, C grubunda 1 ve D grubunda 2 serumda pozitiflik saptanırken A gru-bu ile kontrol grubunda pozitiflik saptanmadı (Tablo V).

Tartışma ve Sonuç

Çalışmada Vit E ve Se düzeyleri D ve E gruplarında literatürlerde^{3,7,8,9} belirtilen normal sınırlar dahilinde saptanırken A ve B gruplarında serum Vit E düzeyi artmıştı. Bu artış kontrol gru-bu değerleri ile karşılaştırıldığında özellikle 15. ve 25. günlerde istatistiki olarak ($p < 0.01$ düze-

di aralarında değerlendirildiğinde sadece IBD virusu inokule edilen gruptaki civcivlerin b. Fabriciuslarında oluşan atrofinin diğer gruplara göre (A, B ve C) daha ileri derecede olduğu gö-rülmektedir.

Aynı çalışma grubundaki civcivlerden alı-nan b.Fabricius'larda oluşan lezyonlar incelendi-ğinde (Tablo III) sadece IBDV inokule edilen gruptaki (D grubu)civcivlerde meydana gelen bursal lezyonların şiddeti ve yaygınlığının, A ve B grubundaki civcivlerin b.Fabriciuslarında olu-şan lezyonlara göre daha fazla olduğu, bunun ya-nında C grubundaki civcivlerin bursal lezyonlarıyla benzer olduğu görülmektedir.

Tablo II. 11. Günde IBDV verilen ve P.I.'nin 15. günü (25.gün) nekropsisi yapılan civcivlerin B. Fabriciuslarının in-deks değerleri. Bursal index=Bursa ağırlığı (gr)/Vücut ağırlığı (gr)

Table II. Bursal Index values of chicks given IBDV on day 11 and sacrificed on day 15 P.I. (day 25)

Hayvan No:	A	B	C	D	E
1	0.41 gr	0.69 gr	0.55 gr	0.55 gr	0.56 gr
2	0.56 "	0.56 "	0.37 "	0.26 "	0.70 "
3	0.46 "	0.63 "	0.52 "	0.48 "	0.65 "
4	0.54 "	0.32 "	0.54 "	0.46 "	0.42 "
5	0.24 "	0.67 "	0.43 "	0.34 "	0.62 "
6	0.68 "	0.48 "	0.45 "	0.42 "	0.58 "
7	0.59 "	0.56 "	0.52 "	0.40 "	0.76 "
8	0.74 "	0.42 "	0.37 "	0.38 "	0.62 "
9	0.40 "	0.36 "	0.33 "	0.50 "	0.61 "
10	0.53 "	0.37 "	0.35 "	0.23 "	0.61 "
11	0.54 "	0.48 "	0.42 "	0.45 "	0.54 "
12	0.45 "	0.45 "	0.07 "	0.12 "	0.52 "
Bursal index ortalaması	0.44 "	0.41 "	0.52 "	0.38 "	0.56 "

Tablo III. 11. Günde IBDV verilen ve P.I.'nin 15. günü (25.gün) nekropsisi yapılan civcivlerin bursa Fabricius'larındaki lezyonların derecelendirilmesi.

Table III. Lesion scores of b. Fabricii of chicks given IBDV on day 11 and sacrificed on day 15 P.I. (day 25)

Hayvan No:	A	B	C	D	E
1	+1	0	+1	+2	0
2	0	+2	+2	+2	0
3	+1	+1	+1	+1	0
4	+1	+1	+1	+1	0
5	+1	0	+2	+3	0
6	+1	0	+1	+1	0
7	+1	+1	0	+1	0
8	0	+1	+1	+2	0
9	+1	0	+3	0	0
10	0	0	+3	+3	0
11	0	+1	+1	+2	0
12	+1	0	+3	+3	0

0,+1,+2,+3: Lezyon skorları detaylı olarak bulgular bölümünde açıklanmıştır.

Bursa Fabriciuslarda oluşan mikroskobik lezyonların yaygınlığı ve şiddeti, bursal atrofının varlığı veya yokluğunu gösteren bu sonuçlara ve yine bu gruptaki civcivlerin mikroskobik olarak incelenen dalak ve sekal tonsillerinde lenfoid merkezlerdeki artışın görülmesi sonucuna göre, kontrol grubu dışında her 4 grupta da Gumboro hastalığının oluştuğu, fakat oluşan lezyonların A ve B gruplarındaki civcivlerde daha sınırlı ve hafif olarak olarak geliştiği söylenebilir.

Sonuçlara göre özellikle A ve B grubundaki civcivlerde saptanan bursal lezyonların, daha hafif ve sınırlı olduğu görülmektedir. Buna göre de erken dönemde (5.-17. gün) yeme Vit E ve suya Se eklenmesi, Gumboro hastalığının gelişiminde özellikle bursal lezyonların şiddetinin ve yaygınlığının engellenmesinde daha etkili olduğu söylenebilir.

Vit E ve Se ile, gerek bakteriyel, gerek paraziter gerekse viral etkenli hastalıkların gelişimi üzerine etkilerine ilgili olarak, yapılan birçok çalışmada^{19,21,23,24,28,29} elde edilen sonuçların, çalışmada saptadığımız ve yukarıda detaylı olarak açıkladığımız sonuçlar ile kısmen uyumlu olduğu görülmektedir.

Bazı çalışmalarda da^{11,17,23} özellikle ilk bir ve iki haftalık yaşam döneminde yeme ve suya Vit.E - Se eklenmesi yapıldığı durumlarda meydana gelen immunité artışı ve hastalığın şiddetindeki azalmaların, Vit E ve Se. eklemelerinin 4. haftadan sonra yapılması durumuna göre daha belirgin olduğu bildirilmektedir. Tengerdy ve ark.³² 22 IU/ Kg. Vit E kapsayan temel diyetle 132 IU/Kg. Vit E eklenerek hazırlanan diyetle beslenen civcivlerde koyun eritrositlerine karşı oluşan antikor seviyelerinde artış olduğunu bildirmişlerdir. Fakat başka bir çalışmada²³ 4 haftalık yaşta piliçlerde diyetle yeterli selenyum varlığında günlük Vit E seviyesi 0'dan 160 IU/Kg. çıkarıldığında koyun eritrositlerine karşı antikor cevabında bir değişim olmadığı sonucuna varmışlar, fakat aynı oranda Vit E eklenmesi ile 3 haftalık yaşta civcivlerde koyun eritrositlerine karşı antikor cevabında yükselme oluştuğunu saptamışlardır. Çalışmamızda A ve B grubundaki civcivlerde meydana gelen hastalığın klinik bulguları ve bursal lezyonları daha hafif ve sınırlı idi. Bu elde edilen sonuçlar yukarıda bildirilen literatür sonuçlarıyla uyumludur. Yine çalışmamızda aynı gruplardaki civcivlerin antikor seviyelerinde kontrollere göre yükselme olmuş iken, sadece IBD virusu inokule edilen civcivlerin antikor düzeylerinde bir farklılık olmadı.

Bu da hayvanların SPF olmasına bağlı olarak immunizasyonun geç şekillenmesi ile ilgili olarak yeterli humoral bağışıklığın oluşmamasına bağlı olabilir. Yeme artan oranda Vit E eklenmesi durumunda da brusella abortus antijeni ve E. Coli'ye karşı serum antikor değerlerinde artış olduğu belirtilmiştir^{11,15,19,23}. Bu konuda aşılarda yapılan bazı çalışmalarda da^{4,12,15} inaktif aşılardan adjuvant olarak Vit E'nin eklenmesi ile daha hızlı

ve yüksek antikor cevabı elde edildiği bildirilmiştir. Gumboro hastalığı ile yapılan başka bir çalışmada²⁹ birinci gün İBD virusu inokule edilen civcivlere içme suyu ile 7 hafta boyunca 25 mg/Kg Vit E ve Selenyum verilmiş ve sonuçta immün cevabın zenginleştiği belirtilmiştir. Bu konuda değişik hayvanlarda benzer çalışmalar oldukça fazladır^{6,10,25,31}.

Çalışmada alınan serumlarda en yüksek OD değeri 0,804 olarak bulunmuş ise de her grupta sadece 1- 3 sayıda hayvanın pozitif bulunması ve OD değerlerinin birbirine yakın olması sonuçların incelenmesi ve yorumunu güçleştirmiştir. Bu nedenle çalışmada yeme ve suya Vit E ve Se eklenmesinin İBD virusu verilen hayvanların kan serumlarında antikor düzeyleri üzerine etkileri tam ve net olarak açıklanamadı. Sonuçlar incelendiğinde özellikle P.I.'nin 9. ve 15. günlerindeki serum antikor seviyelerinin birbirine çok yakın olması (Tablo IV-V), çalışmada yem ve suya Vit E ve Se eklenmesinin Gumboro hastalığında serum antikor düzeyleri üzerinde olumlu veya olumsuz bir etkisi olmadığını akla getirebilirse de, özellikle P. I.'nin 15. gününde alınan kan serumlarındaki değerlerin P.I.'nin 9. gün alınan kan serum değerlerine göre yüksek olması ve özellikle P. I.'nin 15. gününde alınan kan serumlarında her grupta iki - üç hayvanda yüksek pozitiflik saptanması, hayvanlarda antikor oluşum süresinin tam olarak tamamlanmadığını düşündürdüğünden, çalışmadan böyle bir sonuç çıkarılmasının da doğru olmayacağı sonucuna varıldı.

Gumboro konusunda yapılan çalışmaların bazılarında^{5,27} P. I.'nin 7. gününden sonra presipitinler saptanmış iken, bazı çalışmalarda da^{5,14} presipitinlerin P. I.'nin 11. gününden sonra saptandığı bildirilmiştir. Serumda antikorların oluşma süreleri antijen veriliş yoluna, antijenin dozuna, hayvanın ırkına, ilk defa mı ikinci defa mı verildiğine, hayvanın cinsiyeti gibi benzeri değişik faktörlere bağlı olarak uzayabilir veya kısalsabilir. Bu sürenin birkaç gün ile birkaç haftaya kadar devam edebileceği bildirilmektedir¹. Çalışmada serolojik test sonuçları incelendiğinde kontrol grubu dışındaki hayvanlarda P.I.'nin 9. ve 15. günlerde alınan serumlarda yapılan AGID testinin negatif olması bunlarda yeterli düzeyde humoral bağışıklığın gelişmediğini göstermektedir. Yine P.I.'nin 15. gününde alınan serumların ELISA değerlerinin P.I.'nin 9. gününde alınan serumlarda tespit edilen ELISA değerlerine göre yüksek olması, her grupta sadece 1-3 arası hayvan değerlerinin yüksek olması, çoğu değerlerin

birbirine yakın olması kullandığımız virusun antijenik özelliğinin zayıflığına, özellikle virusun inokulasyon yoluna ve virusun tek doz halinde (Primer immunizasyon) verilmesine ve hayvanların SPF olmasına bağlı olarak humoral bağışıklığın tam olarak şekillenmediğine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Tablo IV. 11. Günde İBDV verilen ve P.I.'nin 9. günü (20.gün) alınan kan serumlarının ELISA değerleri (Net Optik Dansite).

Table IV. ELISA test results (Optical Density=O.D) of sera sampled on day 9 P.I. (day 20)

Hayvan No:	A	B	C	D	E
1	0.403	0.340	0.321	0.450	0.335
2	0.353	0.392	0.373	0.402	0.453
3	0.268	0.380	0.437	0.334	0.404
4	0.434	0.492	0.238	0.356	0.502
5	0.449	0.445	0.297	0.342	0.391
6	0.551	0.261	0.479	0.440	0.356
7	0.434	0.306	0.429	0.393	0.450
8	0.358	0.520	0.374	0.328	0.272
9	0.356	0.430	0.263	0.456	0.402
10	0.388	0.453	0.290	0.298	0.485
11	0.334	0.253	0.365	0.403	0.570
12	0.470	0.454	0.490	0.428	0.450

Tablo V. 11. Günde İBDV verilen ve P.I.'nin 15. gününde (25.gün) alınan kan serumlarının ELISA değerleri (Net Optik Dansite).

Table V. ELISA test results (Optical Density=O.D) of sera sampled on day 15 P.I. (day 25)

Hayvan No:	A	B	C	D	E
1	0.457	0.730	0.488	0.611	0.457
2	0.554	0.519	0.463	0.637	0.545
3	0.505	0.523	0.540	0.673	0.558
4	0.520	0.409	0.676	0.460	0.459
5	0.542	0.610	0.422	0.612	0.387
6	0.538	0.491	0.572	0.447	0.460
7	0.491	0.804	0.384	0.558	0.338
8	0.586	0.544	0.459	0.759	0.506
9	0.530	0.424	0.514	0.543	0.564
10	0.516	0.637	0.563	0.573	0.445
11	0.524	0.502	0.542	0.564	0.504
12	0.503	0.441	0.342	0.592	0.421

İetimad ve ark.¹⁶, yeme 37,5 ppm, 50 ppm ve 100 ppm olarak üç farklı dozda Vit E ekleyerek yaptıkları çalışmalarında, bildirdikleri karaciğerde; konjesyon, paraneşim hücrelerinde yağ vakuelleri, damarlar çevresinde lenfosit ve heterofil infiltrasyonu, böbrekte; lenfosit kümeleri ve proksimal tubuluslarda epitel hücre artışı gibi

mikroskopik değişimler ile göğüs kaslarında makroskopik kanamalar, çalışmamızda daha yüksek doz (200 ppm) Vit E kullanılmasına rağmen gözlenmedi.

Sonuç olarak, Çalışmada A grubu ve B grubundaki civcivlerde, hastalığa ilgili olarak b. Fabriciusta şekillenen lezyonların C ve D gruplarına göre daha sınırlı ve hafif olarak meydana geldiği ve hastalığın diğer gruplara göre daha hafif geliştiiği saptandı. Kan serumlarında ELISA testi ile tespit edilen antikor değerleri konusunda daha önce belirtilen nedenlere bağlı olarak tam ve net bir yorum yapılamadı. Bu nedenle çalışmanın bu bölümünde Vit E ve Se eklenmesi durumunda Gumboro hastalığının serum antikor düzeylerindeki değişimler konusunda net bir sonuca ulaşılamadı. Bu konuların elimine edilmesi için özellikle serolojik yöndeki çalışmaların daha fazla sayıda hayvan ve daha değişik gruplarla yapılmasının gerektiği sonucuna varıldı.

Kaynaklar

- Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M.: İmmunoloji. Medisan Yayınevi - Ankara. 1994.
- Bains, B. S.: Vitamin E and Immunity in Poultry. World Poultry. 1994; 10, (7): 51.
- Bartov, I., Frigg, M.: Effect of high concentrations of dietary Vitamin E during various age periods on performance, plasma Vitamin E and meat stability of broiler chicks at 7 weeks of age. Brit. Poult. Sci. 1992; 33: 393-402.
- Bassiouni, A. A., Zaki, M. M., Hady, M. M.: Effect of Vitamin E and Selenium on the Immune response of chickens against living Newcastle disease vaccine. J. Vet. Med. Giza. 1990; 38, (1): 145-155.
- Calnek, B. W., Barnes, H. J., Beard, C. W.: Diseases of Poultry, Ninth Edition. Iowa State University Press, Iowa-USA. 648-663, 1991.
- Chandra, R. K., Bendich, A.: Antioxidant Vitamins and Immune Responses. In: Nutrition and Immunology. Second Printing, July. Alan R. Liss Inc. New York. 125-148. 1989
- Echevarria, M. G., Henry, P.R., Ammerman, C. B., Rao, p. V., Miles, R.D.: Estimation of the Relative Bioavailability of Inorganic Selenium Sources for poultry. 1. Effect of Time and High dietary Selenium on Tissue Selenium Uptake. Poult. Sci. 1988; 67: 1295-1301.
- Echevarria, M. G., Henry, P.R., Ammerman, C. B., Rao, p. V., Miles, R.D.: Estimation of the Relative Bioavailability of Inorganic Selenium Sources for poultry. 2. Tissue Uptake of Selenium from High Dietary Selenium Concentrations. Poult. Sci. 1988; 67: 1585-1592.
- Erkılıç, A., Erkılıç, M., Gümüşlü, S., Yücel, G., Özben, T.: Vitamin Levels in Thyroid diseases. Turk. J. Med. Sci. 1996; 26 - 79.
- Finch, J. M., Turner, R. J.: Enhancement of Ovine lymphocyte responses: a Comparison of Selenium and Vitamin E Supplementation. Vet. Immunol. and Immunopath. 1989; 23: 245-256.
- Finch, J. M., Turner, R. J.: Effects of Selenium and Vitamin E on the immune responses of domestic animals. Res. in Vet. Sci. 1996; 60: 97-106.
- Franchini, A., Bertuzzi, S., Meluzzi, A.: The influence of high doses of Vitamin E on immune response of chicks to Inactivated oil adjuvant vaccine. Clinica Vet. 1986; 109,(1): 117-127.
- Franchini, A., Bertuzzi, S., Tosarelli, C.: Vitamin E in viral inactivated vaccines. Poult. Sci. 1995; 74,(4): 666-671.
- Gürel, A., Yeşildere, T.: Civcivlerde Deneysel oluşturulan Gumboro (IBD) Hastalığında bursa Fabricius Lezyonları. I.Ü.Vet. Fak. Derg. 1993; 19,(2):197-211.
- Heinzerling, R. H., Nockels, C. F.: Protection of chicks against E. coli infection by dietary supplementation with Vit. E. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1974; 146: 279-283.
- İetimid, A. A., Dafaalla, R., Adan, S. E.: Effects of Various levels of Dietary Vitamin E on Broiler Chicks. Vet. Hum. Toxicol. 1989; 31,(1): 50-53.
- Jensen, L. S.: Interaction of Vitamin E with disease in Poultry. In: Vitamin E in Animal Nutrition and Management. Alan R. Liss. Inc. New York. 205-214, 1991.
- Kaplan, L. A.: Methods in Clinical Chemistry. Mosby Book Company. New York. 1987.
- Lawrence, L. M., Mathias, M. M., Nockels, C.F.: The effect of Vitamin E on prostaglandin levels in the immune organs of chicks during the course of an E. coli infection. Nutr. Res. 1985; 5: 497-509.
- Leach, R. M.: Biochemical Function of Selenium and its interrelationships with other trace elements and Vitamin E. Federation Proc. 1975;34, (11): 2082-2089.
- Lee Russel, M.: Vitamin E. In: Vitamins in Animal Nutrition,. Academic Press Limited. San Diego, 93-131. 1989.
- Luna, L. G.: Manual of Histologic staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology.; Third Edition, The Blakiston Division - Mc Graw Hill Book Company, Newyork. 1972.

23. Marsh, J. A., Dietert, R.R. and Gombs, Jr.: Influence of dietary Selenium and Vitamin E on the humoral immune response of the chick. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1981; 166: 228-236.
24. McIlroy, S.G., Goodall, E. A., Rice, D. A., McNulty, M.S., Kennedy, D.G.: Improved performance in commercial broiler flocks with subclinical infectious bursal disease when fed diets containing increased concentrations of Vitamin E. *Avian Path.* 1993; 22: 81-94.
25. Moriguchi, S., Kobayashi, N., Kishino, Y.: High Dietary Intakes of Vitamin E and Cellular Immune functions in Rats. *J. Nutr.* 1990; 120: 1096-1102.
26. Nockels, C. F., Menge, D. L., Kienholz, E. W.: Effect of excessive dietary Vitamin E on chick. *Poult. Sci.* 1976; 55: 649-652.
27. Okoye, J. O. A.: Persistence of Infectious Bursal Disease Virus and the Appearance of precipitins in infected chickens. *Trop. Veterinarian.* 1984; 2: 97-102.
28. Panda, S. K., Rao, A. T.: Effects of Levamisole and Vit. E – Selenium on experimental infectious bursal disease virus infection. *Ind. J. Vet. Path.* 1993; 17,(2): 162-163.
29. Panda, S.K., Rao, A. T.: Effect of a Vitamin E-Selenium combination on chickens infected with infectious bursal disease virus. *Vet. Rec.* 1994; 134: 242-243.
30. Puzzi, J. V., Combs, G. F., March, J.A.: Effects of combined selenium and Vitamin E deficiency on chicken macrophages. *Poult. Sci.* 1988; 67:1260-1265.
31. Sheffy, B. E., Schultz, R. D.: Influence of Vitamin E and Selenium on immune response mechanism. *Federation Proc.* 1979; 38,(7): 2139-2142.
32. Tengerdy, R. P., Nockels, C. F.: The effects of Vitamin E on egg production, Hatchability and Humoral Immune response of chickens. *Poult. Sci.* 1973; 52: 778 - 783.