



Tavuklarda Coronavirus ve Enfeksiyöz Bronşitis aşıları

Özlem Kardoğan^{1*}

¹ Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü-Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 04.10.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 28.02.2022

Özet: IB, kanatlı hayvan endüstrisinde özellikle genç ve yetişkin yumurtacı ve broyler tavukların, solunum ve ürogenital sistemlerinde lezyonlara yol açan bu nedenle karkas gelişimi ve yumurta kalitesinde düşmeye neden olan prevalansı yüksek ve önemli ekonomik kayıplardan sorumlu akut, yüksek derecede bulaşıcı viral bir enfeksiyondür. Hastalığın etkeni Coronaviridae ailesinde, Gammacoronavirüs'lar içerisinde yer alan Enfeksiyöz bronşitis virüsü (IBV)'dur. Kapsamlı aşılama olsa bile, ticari olarak IB salgınları kümes hayvanları üreticileri için önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Sürekli olarak yeni serotipler ve varyantlar ortaya çıkmakta, bu da kümes hayvanı üreticilerini ve hayvan sağlığı şirketlerini aşılama planlarını devamlı olarak değerlendirmeye ve yeni aşılar üretmeye zorlamaktadır.

Anahtar kelimeler: Aşı, Enfeksiyöz Bronşitis, tavuk coronavirus

Coronavirus and Infectious Bronchitis vaccines in chickens

Abstract: IB is an acute, highly contagious viral infection responsible for the high prevalence and significant economic losses in the poultry industry, especially in young and adult layers and broiler chickens, which causes lesions in the respiratory and urogenital systems, resulting in reduced carcass development and egg quality. The causative agent of the disease is Infectious bronchitis virus (IBV), which is in the Gammacoronaviruses in the Coronaviridae family. Even with extensive vaccination, commercial outbreaks of IB remain a major problem for poultry producers. New serotypes and variants are constantly emerging, forcing poultry producers and animal health companies to continually evaluate their vaccination plans and produce new vaccines.

Keywords: Chicken coronavirus, Infectious Bronchitis, vaccine.

Giriş

Enfeksiyöz bronşitis (IB), kanatlı hayvan endüstrisinde özellikle genç ve yetişkin yumurtacı ve broyler tavukların, solunum ve ürogenital sistemlerinde lezyonlara yol açan bu nedenle karkas gelişimi ve yumurta kalitesinde düşmeye neden olan prevalansı yüksek ve önemli ekonomik kayıplardan sorumlu akut, yüksek derecede bulaşıcı viral bir enfeksiyondür (de Wit ve ark. 2011).

IB enfeksiyonlarının her yaş grubundaki tavukları etkilemesi ve yüksek morbitideye sebep olması sebebiyle kanatlı endüstrisi için büyük tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle tüm dünyada yakından takip edilmektedir. Dünyada birçok ülkede farklı Enfeksiyöz bronşitis virüs (IBV) varyantları bulunmakta ve mücadele de sorunlar yaşanmaktadır.

Kümes hayvancılığı endüstrisinde yaygın olarak IBV'ne karşı aşılama yapılmasına rağmen, yeni serotiplerin ve varyantların ortaya çıkması nedeniyle hastalığın kontrolü zor olmaktadır. IBV aşıları için mevcut toplu uygulama stratejileri verimsizdir ve sıklıkla aşılama başarısızlıklarına neden olmaktadır.

IBV proteini ve konakçı hücre etkileşimleri hakkında yeterli bilgiye sahip olunmaması, hedeflenen aşı kontrol stratejilerini neredeyse imkansız hale getirmektedir.

Bu derleme de; IBV, aşıları, aşı teknolojisindeki son gelişmelerle birlikte mevcut durumun ana hatlarıyla özetlenmesi amaçlanmıştır.

Enfeksiyöz Bronşitis Virüs ve Aşılar

Enfeksiyöz Bronşitis Virüs (IBV)

IB, ilk kez 1930 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde tavuklarda akut solunum yolu hastalığı olarak tanımlanmış, 1936 yılında ise etkeni olan virüs (IBV) izole edilmiştir. Ülkemizde de ilk kez 1978 yılında Ankara'da tespit edilmiş ve 1980'li yıllarda tavuk yetiştiriciliğindeki hızlı artışa paralel olarak ülke genelinde yayılmıştır (Çöven 2012).

IBV Nidovirales sınıfında, Coronaviridae ailesi, Orthocoronavirinae alt ailesindedir. Orthocoronavirinae alt ailesinde 4 cins (Alfacoronavirus, Betaco-

ronavirus, Deltacoronavirus, Gammacoronavirus) tanımlanmıştır. IBV'ü grup 3'de yer alırken, diğer üç grupta memeli coronavirusları yer almaktadır(OIE 2018). Coronaviruslar segmentsiz, pozitif ipliklikli lineer yapılı RNA genomuna sahiptir. RNA yapısındaki genomun içerisinde S (spike), M (matriks), E (zarf) ve N (nükleokapsid) yapısal proteinlerini kodlayan genler bulunmaktadır. Virüs tropizmini belirleyen S proteini IBV'ye karşı oluşan antikorların bağlanacağı bölgeleri taşır (OIE 2018). Spike glikoproteini (S1 ve S2) iki alt birimden oluşmaktadır (Cavanagh 2003). Değişken S1 alt ünitesi konak hücreye tutunmayı, S2 alt ünitesi ise virüsün hücre içine girmesini sağlamaktadır (Cavanagh 1997; Jackwood 2012). IBV karakterizasyonu için hedef bölge, S glikoproteininin S1 alt birimidir(OIE 2018).

IBV'nin ilk izole edilen serotipi Massachusetts(-MASS)'dir. Valastro ve ark. (2016) S1 geninin tamamının dizilemesini yaparak tüm IBV'lerini 6 genotip ve 32 farklı viral soy altında sınıflandırmıştır. 27 soy, genotip I'de yer almış, kalan genotiplerin her biri bir soy içermiştir. Bu soylardan bazıları birkaç kıtaya, ülkeye veya bölgeye dağılmışken, bazıları da belirli coğrafi alanlara özgüdür. Her bir soy, her biri tür olarak adlandırılan ve belirli bir isim verilen (GA08, QX vb.) farklı virüsleri içermektedir (Tablo 1). Genel olarak serotip grupları, sınıflandırma sistemindeki genotip gruplarına karşılık gelmektedir(Aziz 2020).

Ülkemizde yapılan genotiplendirme çalışmalarında baskın genotipin İsrail varyant-2 olduğu bildirilmiştir (Kahya ve ark. 2013; Aral 2016; Yılmaz ve ark. 2016; Öngör ve ark. 2021).

Tablo 1. S1 gen dizisi veri analizlerine göre genogruplar, suşların adları ve sirküle olduğu dönemler (Valastro ve ark. 2016).

Genogrup (Soy)	Sirkülasyon dönemi	Suş adı	Köken aldığı ülke	Genogrup (Soy)	Sirkülasyon dönemi	Suş adı	Köken aldığı ülke
GI-1	1937–2013	Beaudette	USA	GI-18	1993–1999	JP8127	Japonya
GI-2	1954–2006	Holte	USA	GI-19	1993–2012	58HeN-93II	Çin
GI-3	1960–2006	Gray	USA	GI-20	1996–1999	Qu_mv	Kanada
GI-4	1962–1998	Holte	USA	GI-21	1997–2005	Spain/97/314	İspanya
GI-5	1962–2012	N1/62	Avusturya	GI-22	1997–2011	40GDGZ-97I	Çin
GI-6	1962–2010	VicS	Avusturya	GI-23	1998–2012	Variant 2	İsrail
GI-7	1964–2012	TP/64	Tayvan	GI-24	1998–2013	V13	Hindistan
GI-8	1965–1967	L165	USA	GI-25	2004–2013	CA/1737/04	USA
GI-9	1973–2011	ARK99	USA	GI-26	2006–2007	NGA/B401/2006	Nijerya
GI-10	1970s–2000s	B	Yeni Zelanda	GI-27	2008–2013	GA08	USA
GI-11	1975–2009	UFMG/G	Brezilya	GII-1	1979–1984	D1466	Hollanda
GI-12	1978–2006	D3896	Hollanda	GIII-1	1988–2008	N1/88	Avusturya
GI-13	1983–2013	Moroccan-G/83	Fas	GIV-1	1992–2003	DE/072/92	USA
GI-14	1984–2006	B1648	Belçika	GIV-1	1992–2003	DE/072/92	USA
GI-15	1986–2008	B4	Kore	GV-1	2002–2008	N4/02	Avusturya
GI-16	1986–2011	IZO 28/86	İtalya	GVI-1	2007–2012	TC07-2	Çin
GI-17	1988–1999	CA/Machado/88	USA	GIV-1	1992–2003	DE/072/92	USA

Jungherr ve ark. (1956)'da, farklı IBV serotiplerinin çapraz koruma sağlamadığını bulmuştur. Bu keşiften günümüze, antikorları nötralize ederek tanımlanan birçok farklı serotip ve spike geninin çıkarılmış amino asit sekansına dayanan genetik tipler dünya çapında tanımlanmıştır. Bazı istisnalar olmasına rağmen (Cavanagh ve ark. 1992; Li ve ark. 2011)

IBV tipleri arasındaki çapraz korumayı tahmin etmek için, virüslerin S1 amino asit dizisi arasındaki genetik ilişki kullanılabilir (Cavanagh ve ark. 1997; Lee ve ark. 2003; Ladman ve ark. 2006; Jackwood 2012).

IB, zor soluma, öksürük, trakeal raller(ses), hapşırma ve burun akıntısı ile karakterizedir. Genç hayvanlarda ciddi solunum sıkıntısı ve özellikle civciv-

lerde semptomlara ilave olarak burun akıntısı oluşturmaktadır (Esendal 2002). Bu virüs, solunum sistemi dışında da böbrek ve genital sistem epitelyal hücrelerin çoğunda çoğalarak patolojik değişikliklere neden olabilmektedir (Boltz ve ark. 2004). IB'ye yakalanan sürüler genellikle %100 morbidite gösterir. Mortalite, nefritis ve çoğunlukla solunum sistemine yerleşen başta *Escherichia coli* olmak üzere *Mycoplasma spp.* gibi bakteriyel kaynaklı sekonder enfeksiyonlar sebebiyle yükselmektedir (Cavanagh 2003). Yumurtacılar, yumurta veriminde düşüş görülmektedir. Özellikle yumurta üretiminin başlangıcında sürüde IB enfeksiyonun yaşanması durumunda verim düşüşünü %70'e kadar çıkabilmektedir. Bu gibi durumlar kanatlı hayvan yetiştiricileri için ciddi ekonomik kayıp yaratmaktadır. Ülkemizde Connecticut, H120, MA5 ve M41 gibi farklı suşlarla IB'ye karşı aşılama yapılmasına rağmen, halen birçok IB şüpheli salgınlar yaşanmaktadır (Kahya ve ark. 2013).

Aşılama

Aşılar

Kanatlı hayvan endüstrisindeki en çok canlı attenüe aşılar kullanılmaktadır. Attenüe canlı IBV aşıları patojen IBV izolatlarının embriyolu tavuk yumurtasında (EYT) seri pasajıyla üretilir. Aşıların anttenüe olduğuna, inokulasyondan sonra klinik semptomlara rastlanmamasıyla karar verilmektedir (Jordan 2017).

Bir saha virüsünün virulensini azaltmak 1 yılı kadar sürebilmektedir, ancak hızlı virülensi düşürmek için bazen ısıl işlem ve sınırlı sayıda yumurta geçişinin birlikte kombinasyonu ile elde edilebilmektedir (Jackwood ve ark. 2010). Ölü veya inaktive edilmiş IBV aşıları yumurtacı/damızlık tipi tavuk yetiştiriciliklerinde kullanılmaktadır. Rutin olarak canlı IBV'nin izolatlarının inaktivasyonunda formaldehit kullanılmaktadır. İlk üretilen aşı olan MASS serotipli IBV aşısı, tüm dünyada uzun yıllardır kullanılan tek aşıdır. Kümes hayvanı üretimi yapan birçok ülkede, aynı zamanda tek lisanslı IBV'u aşı serotipidir (Jordan 2017).

Yeni serotip ve varyantlar ortaya çıktıkça, bölgesel olarak önemli serotiplerle mücadele etmek için aşilar sürekli yeni serotiplerle üretilmiştir (Arkansas, Connecticut, Gürcistan 98, 793/B, QX, Q1 gibi) (Jackwood 2012). Tek başına IBV antijenlerini eksprese (Johnson ve ark. 2003; Toro ve ark. 2014; Li ve ark. 2016) eden veya diğer patojenlerin antijenleriyle kombinasyon halinde rekombinant IBV aşilar geliştirilmiştir (Yang ve ark. 2016; Yin ve ark. 2016). Ancak bu aşilar henüz canlı-attenüe aşilarla aynı koruyucu

seviyeyi göstermemiştir. Şu anda, kullanılan lisanslı ticari rekombinant IBV aşısı bulunmamaktadır (Jordan 2017).

Aşılama Zamanı

IBV'ye karşı aşılanmanın zamanlaması yetiştirme tipine ve türe göre değişmektedir. Broylelerin yaşam süresi kısadır ve IB'ye karşı az sayıda aşılanmaktadır. Genel olarak, yumurtadan çıkan civcivler kuluçkahane 1-3 serotipli canlı-attenüe IBV aşilarıyla aşılanmaktadır. Daha uzun yaşam süreli piliçler (>49 günlük), broyle kümelerinde bağışıklık süresini uzatmak amacıyla 14 ila 18 günlükten tekrar aşılanmaktadır. Broyle damızlık ve yumurtacı tavuklar çok daha uzun yaşam sürelidir ve piliç kümesinde canlı attenüe aşı ile 2 haftalıktan başlayarak IB'ye karşı çoklu aşilar, ardından 4 ve 6 haftalıktan canlı-attenüe aşilar ile aşılanmaktadır (Jordan 2017). Tavuklar yumurtlamaya başladıktan sonra, verilen tüm IBV aşiları inaktiftir ancak bazı entegreler bölgede, bir enfeksiyon durumu varsa canlı attenüe aşı da kullanabilmektedir. Canlı attenüe ve inaktif IBV aşilarının uygulama zamanının ayarlanabilmesi, her üreticiye uygun en iyi aşı programının belirlenebileceği etkili aşılama stratejilerini yapmak zordur. Ayrıca aşılama stratejisi belirlenirken kullanılan aşiların NDV aşiları ile birleştirildiği için bunun da başka bir karmaşıklık ve değişkenlik katmanı eklediği düşünülmelidir (Jordan 2017).

Aşılama Programları

IBV'de, çapraz koruma sağlamayan çok sayıda farklı tür var olduğundan, kontrol edilmesi çok zor bir enfeksiyondur. Attenüe canlı aşilar broylelerde ve yumurtacı yarkalarda, inaktif aşilar ise genellikle yumurtacı ve damızlıklarda kullanılmaktadır. Etkili kontrol, hastalığa neden olan virüs tipinin tanımlanmasını ve ardından bu türe karşı uygun bir aşı ile aşılamayı içermektedir. Bununla birlikte, kullanımda olan yalnızca birkaç farklı IBV'ü aşı suşu türü vardır, oysa virüsün hastalığa neden olabilecek sayısız farklı türü ve varyantı tüm dünyada bulunabilmektedir. Buna ek olarak, bazı ülkeler yalnızca bir veya birkaç aşı türü ile aşılamaya izin vererek kontrolü daha da zorlaştırmaktadır (Cavanagh ve Gelb 2008). Kanatlı hayvan üreticileri birden fazla serotipli aşilarla sürülerini koruma genişliğini arttırabilmektedirler. Bu çoklu serotipli aşılama stratejileri en az iki serotiple veya sürüdeki görülen diğer serotiplere göre belirlenebilmektedir. IBV'nin sürekli gelişimi ve aşiları sürekli güncelleme ihtiyacı, bu aşılama stratejisinin dezavantajıdır (Jackwood ve Wit. 2013). Çoklu serotip aşılamada kullanılan ikinci bir strateji de, IBV aşısının

sadece iki serotipinin uygulanmasıyla heterolog virüs türlerine karşı geniş çapraz koruma (Cook ve ark. 1999) sağlamak amaçlanmıştır. Bu strateji "koruyucu tip" olarak adlandırılmıştır. Massachusetts-tipi (MA5) ve IB 4/91 aşılarının birlikte kullanımı tek başlarına kullanımlarına oranla çok daha iyi çapraz koruma oluşturmuştur (Jordan 2017).

Aşılama Uygulamaları

Sprey aşılama

IBV'ü aşılı, kuluçkahanelerde sprey olarak rutin uygulanmakta (Purswell ve ark. 2008) ve her gün binlerce civciv aşılanabilmektedir. Genelde sprey kabinleri, bir tank ya da bir aşı haznesinden oluşmaktadır. Aşı, üretici firma talimatlarına göre kuluçkahane bulunan aşı haznelere yerleştirilerek yapılmaktadır (Jordan 2016).

Sprey aşılamının etkinliğini değerlendirmek için nispeten az sayıda laboratuvar çalışması yapılmıştır. Roh ve ark. (2015)'i elektron mikroskopunu kullanarak yaptıkları araştırma sonuçlarında, tekli IB aşı virüslerinin spreylemeden sonra yapısal hasara uğradığına dair herhangi bir kanıt rastlanmamıştır ancak uygulama işlemi sırasında aşıya uygulanan mekanik kuvvetten dolayı titre kaybedebileceğini bildirmişlerdir. Bu durum, birçok virüsün sprey uygulama sürecini bozulmadan geçtiğini, ancak bazılarının etkisiz hale gelebileceğini göstermektedir. Farklı çalışmalarda, püskürtme memesinden çıkan aşı ile civcivlerin seviyesine gelen aşı karşılaştırılırken titre de önemli bir düşüşün olduğu görülmüştür. Böyle bir durumda virüsün püskürtme işlemi sırasında çevreye saçıldığını düşündürmektedir (Jordan 2016).

Kanatlılarda günümüzde kullanılan sprey uygulama ekipmanları yaklaşık 40 yıldır değişmemiştir. Ekipman inovasyonları yapılmadan daha çok yeni aşı uygulama teknolojileri geliştirilmiştir (Jordan 2017).

Jel aşılama

IBV aşı uygulamasında en yeni teknoloji olan jel seyrelticiler, başlangıçta IBV aşılı için tasarlanmamıştır ancak bu amaç için uyarlanmıştır. Bu sistemde, aşı kalın bir jel seyreltici ve jel aracılığıyla sepetlerdeki veya kuluçkadaki civcivlere uygulanmıştır. Aşı, damlacıklar halinde civcivlerin üzerine püskürtülmekte ve civcivler birbirlerini gagalayarak aşıyı almaktadırlar. Gagalara bakılarak, civcivlerin aşıyı alıp almadıkları kontrol edilebilmektedir. Bu aşılama tipi, sprey aşılamaya kadar etkilidir. Jel aşılamasını IBV için sprey aşılamaya alternatif olarak kullanılması için daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır (Jordan 2017).

Aşılama Sonrası Korumanın Değerlendirilmesi

Amerika da çalenç (eprüvasyon) sonrası aşı etkinliği değerlendirirken ETY'de yeniden virüs izolasyonu yapılmaktadır (USDA 1999). Ancak diğer ülkelerde aşı etkinliği, siliostas testine göre yapılmaktadır (Pharmacopoeia 2016). Ayrıca çalenç sonrası kanatlı hayvanlarda klinik solunum semptomları ve tracheanın histopatolojisi incelenerek değerlendirme yapılabilmektedir. Moleküler analizler hem aşılama sonrası hem de çalenç sonrası kullanımı popüler hale gelmiştir. Bu yöntemler aşağıda detaylı anlatılacaktır.

Virüs izolasyonu

Çalenç sonrası ETY'de IBV izolasyon metodu her zaman altın standart test olmuştur (Jackwood, de Wit 2013) ve halen rutin olarak yapılmaktadır. Sonucun negatif olduğu virüs izolasyon testi, bir tavuğun virüssüz olduğunu ve aşının, en yüksek koruma biçimi olan sterilize edici bağışıklığı sağladığını göstermektedir. Ancak bu test maliyetli, zaman alıcı ve SPF (Specific Pathogen Free) yumurtaların her zaman sağlanması zordur. Bu test aynı zamanda nötralize edici antikorları indükleyen aşılama stratejileri için uygundur. Bu testin dezavantajlarında biri de, aşı suyu ve patojenik suş arasında ayırım yapmamasıdır. Aşılama devam ederken, virüs izolasyonu testindeki pozitif bir sonuç aslında aşı olabilir. Bu durum da, gerçek sonucunu belirlemek için başka testlerin yapılmasını gerektirmektedir (Jordan 2017).

Siliostas Testi

Trachea'nın yüzeyini tamamen örten silia adı verilen kıl benzeri yapıların arasında yer alan salgı hücreleri tarafından üretilen mukus, yabancı ajanları tutmaktadır. Siliaların tek-yönlü koordine hareketinin yardımı ile yabancı cisimler uzaklaştırılır. Bu hareketlerle birincil ve ikincil bakteriyel enfeksiyonlar karşı koruyucu bariyer oluşmaktadır. Silialarda kayıp ve deformasyonlar solunum sistemin savunma yeteneğinde kayba neden olmaktadır. Bu nedenle aşı virüsleri, hastalıklardan korunma da önemli olan bu mekanizmaya minimum düzeyde deformasyon yapmalıdır. Siliostas testi ile trachea'nın siliar aktivitesi incelenmektedir. Silia aktivitesi %50 veya daha altına indiğinde trachea, sekonder bakteriyel enfeksiyonlara karşı korunamaz. Aşılanmış kanatlılarda korunma seviyesini ölçerken en düşük skor, aşılama programı ile sağlanan en yüksek (çapraz) korunma derecesini göstermektedir (Cook ve Jackwood 2020). Bu test sahada hangi aşı

programının denemeye değer olduğuna dair bir gösterge vermektedir.

Kantitatif ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu(qRT-PCR)

Moleküler teknolojiler ilerledikçe ve daha fazla ekonomik hale geldikçe, çalenç sonrası kantitatif ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yaygın bir kullanıma girmiştir. qRT-PCR testleri genel olarak tüm IBV türlerini veya bireysel serotip virüslerini spesifik olarak tespit etmek için (Roh ve ark. 2014) geliştirilmiştir (Callison ve ark. 2006), IBV için genel qRT-PCR testi, viral RNA genomunun farklı IBV türleri arasında yüksek oranda korunan bir bölümünü hedefleyerek, IBV'nü tespit etmek için uygun hale gelmiştir ancak bu yöntemle IBV genotipi ayırt edilememektedir. Genotipe özgü qRT-PCR testleri, serotip ile ilişkili olan çok çeşitli değişken gen bölgelerine (HVR) ait dizilerini hedeflemektedir. qRT-PCR'la, aynı zamanda virüs izolasyonu kadar hassas ve bazı durumlarda daha hassas sonuçları (Roh ve ark. 2014) tek bir günde alınabilmektedir. Yayınlanmış serotip spesifik qRT-PCR testleri oldukça spesifik hedef serotip için pozitif olan test başka bir serotip için negatif olacaktır. Başka serotipin varlığı veya yokluğu hakkında herhangi bir bilgi verilmemektedir (Jordan 2017).

Aşı Etkinliği Değerlendirme Yöntemlerinin İlişkisi

Aşı etkinliği değerlendirme yöntemlerinin değerlendirilmesinde çok farklı sonuçlar elde edilmiştir. Jackwood ve ark, (2015)'ı, korumayı değerlendirirken, klinik semptomlar, siliostas, çalenç virüsünün tespiti ve trakea'daki mikroskopik lezyonların varlığına göre değerlendirme yapılabileceğini bildirmişlerdir. Bu dört kriterin tümü, IBV ile çalenç'in ardından tamamen korunan (aşılı) hayvanlarda negatif, duyarlı (aşısız) hayvanlarda tamamen pozitif olduğunu, aralarında iyi bir korelasyon olduğunu gözlemlemişlerdir. Kullanılan değerlendirme metodu, aşı üretim çalışmaları ve çalenç sonucunu büyük ölçüde etkileyebilmektedir. Kullanılan kanatlı türü (SPF-broyler), maternal antikör durumu, aşılama yaşı, aşı uygulama yöntemi, çalenç zamanlaması, çalenç virüsünün titresi ve korumayı değerlendirmek için kullanılan yöntemlerin tümü deneyin sonucunu etkilemektedir (Jordan 2017).

Yeni Nesil Aşılar

Son 20 yılda yeni aşı geliştirme denemeleri olmuştur. Halen en yaygın olarak canlı-attenue aşılar kullanılmaktadır (Bande ve ark. 2015). Yeni aşı teknolo-

jisi gelişimi yavaş ilerlemektedir. Çünkü yeni IBV aşı teknolojilerinin kullanımını sınırlandıran 2 faktör bulunmaktadır. Birincisi maliyettir. Çünkü ticari kanatlı kümeslerinde hayvan başına düşecek ek maliyet önemlidir (Jordan 2017). Diğer kanatlı patojenlerine karşı kullanılan standart rekombinant aşılar, canlı attenue veya inaktif IBV aşılara göre çok daha pahalıdır, ancak yine de kullanım kolaylığı ve etkinliği nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. İkinci sınırlandırıcı faktörse uygulama yöntemidir. Etlik piliçler kuluçkahanedede çıkım makinesine transfer edilirken in-ovo olarak veya yumurtadan çıktığı gün toplu olarak aşılanmaktadır. Yumurtacı / damızlık tavuklar canlı IBV aşıları ile sprey yoluyla birçok kez aşılanmaktadırlar.

Yeni aşı adaylarının virüsün ana giriş yeri olan solunum yolunda koruma sağlamak için gerekli bağışıklık mekanizmalarını uyarması önemlidir. Humoral ve hücre aracılı reaksiyonlar dahil olmak üzere mukozal bağışıklığı indüklemelidirler. Ayrıca kanatlı üretiminde kullanılabilirliği için toplu aşılanmanın uygulanabilirliğini sağlanmalıdır (Rautenschlein 2021). Toplu olarak uygulanamayan ve etkili olmayan herhangi bir aşı, kanatlı endüstrisinin geniş ölçekli üretim uygulamaları ile uyumlu olmayacaktır (Jordan 2017).

Rekombinant aşılar

Moleküler biyoloji ve genetik bilim dallarının gelişimine paralel olarak, birçok hastalığa karşı kullanılmakta olan rekombinant aşılar geliştirilmiştir. Rekombinant aşılar, kanatlı endüstrisinde de kullanılmaktadır. En yaygın olarak hindilerin herpesvirüsü (HVT) veya kümes çiçeği virüsü vektör olarak tercih edilmektedir. NDV'nin antijenik proteinleri kodlayan genleri (Morgan ve ark. 1992), Enfeksiyöz Bursal hastalık virüsü (IBDV) (Darteil ve ark. 1995) ve Enfeksiyöz Laringotrakeit virüsleri (ILTV) gibi viral konaklara yerleştirilmiş ve tavuklarda uygun bir bağışıklık tepkisi oluşturmak için etkili bir şekilde kullanılmıştır. Spike geninin S1 bölümünü (Johnson ve ark. 2003; Toro ve ark, 2014) ifade eden kısımlar bu viral omurgalar kullanılarak rekombinant IBV aşısı geliştirmek için girişimler yapılmıştır. Henüz ticari bir ürün ortaya çıkmamıştır (Jordan 2017).

Rekombinant aşı teknolojisi, proteinlerin rekombinant ekspresyonunu ve viral vektörleri içermektedir. Bu sayede, kültürlenmesi zor olan veya kültürü yapılamayan virüslere karşı aşı geliştirilebilmektedir. Geleneksel yöntemlere göre daha kontrollü biyoproseslerle kısa sürede üretim sağlandığından güvenlik riskleri elimine edilebilmektedir (Hudu ark. 2016).

Subunit, peptit ve DNA aşılıarı

Subunit, peptit ve DNA aşılıarı, konakçı bağışıklık sistemine antijen sunularak hastalık etkenine karşı antikor gelişimi uyarma temeline dayanmaktadır. Subunit aşılıar bir patojenin antijenik komponentlerinin (pilus, flagella, kapsül, protein, glikoprotein, toksin, vs.) direkt uygulanmaktadır. Peptid aşılıarında bir patojenin antijenik proteininden türetilen amino asitler kullanılır. Plazmit bazlı olmayan nükleik asitler ve plazmit bazlı DNA aşılıarında, bir antijeni kodlayan protein kısmı konakçı hücre içerisine verilmektedir. Bu aşı türlerini inceleyen (Yang ve ark. 2009; Guo ve ark. 2010; Fang ve ark. 2013) bazı araştırmacılar bu aşılıara karşı gelişen bağışıklık tepkisininin; bağışıklık faktörlerinin (sitokinler vs) veya adjuvantların eklenmesiyle güçlendirileceğini bildirmişlerdir. Ancak bu aşılıarın etkili olabilmesi için, birçok kez kas içine enjekte edilmesi gerekmektedir ki bu da büyük ölçekli kümes hayvanı üretiminde mümkün değildir. Çünkü maliyetleri yükseltecektir (Jordan 2017).

Ters genetik metodu ile oluşturulan rekombinant IBV aşılıarı

Piyasada bulunmasa da en umut verici yeni nesil aşı adayı, ters genetik sistem tarafından üretilen rekombinant IBV'dür. Bu aşılıar, bir IBV aşı virüsünün genomunun klonlanarak homolog rekombinasyon, PCR yoluyla veya ilgili diğer genlerin doğrudan genoma klonlanmasıyla elde edilebilmektedir (Britton ve ark. 2005; Casais ve ark. 2005).

Bu tersine mühendislik uygulanmış genomlar daha sonra genomu kopyalayacak, montaj için gerekli viral proteinleri üretecek ve tamamen işlevsel bir IBV verebilecek uygun bir hücre kültürü sistemine transfer edilir. Rekombinant IBV ilgili yapılan araştırmaların çoğu, IBV genomunu eksprese eden viral proteinlerin işlevini ve konakçı hücre etkileşimlerini ortaya çıkarmak için yapılmıştır. Ancak aşı geliştirmeye yönelik araştırmalar da devam etmektedir (Casais ve ark. 2005; Cavanagh ve ark. 2007).

Rekombinant bir IBV'de spike geninin çıkarılmasının ve bunun farklı bir IBV serotipinden spike geniyle değiştirilmesiyle, virüs yeni bir serotipe dönüştürülmektedir. Yeni oluşturulan rekombinant IBV daha sonra spike genini içeren patojenik virüse karşı koruyucu bir bağışıklık tepkisi oluşturmak için kullanılabilir (Hodgson ve ark. 2004; Armesto ve ark. 2011). Bu teknolojiyle daha az zamanda aşılıar üretilmektedir. Rekombinant IBV aşılıarının diğer aşılıara avantajları bulunmaktadır. İlk olarak, rekombinant IBV'ler canlı virüslerdir ve geleneksel bir IBV aşılıarının yapacağı gibi enfeksiyon, replikasyon ve bir

bağışıklık tepkisi oluşturabilir. Bu virüste tüm proteinler mevcut olduğu için spike dışında immünojenik proteinlere de bir yanıtın oluşturulması sağlanabilmektedir. İkincisi, IBV genomu tarafından kodlanan tüm proteinlerin işlevi bilindikçe, IBV'nün ETY'e adaptasyonuna dayanmadan stratejik olarak rekombinant IBV'lerinin patojenitesi değiştirilebilir hale gelmiştir. Üçüncü olarak spike proteinindeki gen alışverişi ile yeni aşı üretimindeki ilerlemeler tahmin edilebilmektedir. Mevcut canlı-attenüe aşılıarın genomları, spike geninin dışındaki birçok yerde değişiklik gösterebilir ve bu da yeni aşılıarın davranışının tahminlerini zorlaştırmaktadır. Dördüncü avantajı ise, rekombinant IBV'ler, kanatlı aşılıarının uygulama ve maliyet modeline uygundur. Canlı virüs oldukları için geleneksel yöntemlerle veya hatta bazı durumlarda in-ovo uygulanabilirler (Cavanagh ve ark. 2007). Rekombinant virüsü oluşturmanın ilk maliyeti, geleneksel ETY'de pasaj yönteminden önemli ölçüde daha yüksektir, ancak bu tek seferlik bir maliyettir. Rekombinant IBV üretildikten sonra, diğer IBV aşılıarı gibi çoğaltılabilir ve EYT'de muhafaza edilebilir. İlk üretim maliyetinin etkisi, aşılıarın uzun süreli kullanımına yayılabilir ve bu nedenle doz başına maliyeti yalnızca minimum düzeyde etkileyecektir. Rekombinant IBV aşılıarının çalışmalarında ruhsatlandırma da büyük bir engel oluşturmaktadır. Şu anda, her yeni rekombinant aşı amacıyla oluşturulan IBV'nin, yeni virüsün lisanslaması için iki yıl veya daha uzun süre beklenmesi gerekmektedir (Jordan 2017).

Genetik olarak değiştirilmiş organizmalar (GDO'lar) olduklarından, rekombinant IBV'lerin kullanımını düşündüğünde halkın algısı da dikkate alınmalıdır. GDO'lara genel halk yaklaşımı iyi değildir ve bu da bu tür aşılıarın kullanımlarını etkileyebilecektir (Jordan 2017).

Sonuç

IB, dünyada ve ülkemizde kanatlı endüstrisindeki yumurta üretim miktarını ve kalitesini etkileyen en önemli viral enfeksiyonlardan biridir. Tavukçuluk sektöründe sürülerde ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu enfeksiyonun kontrolünde sıkı biyogüvenlik önlemleri ile birlikte kanatlıların IBV suşlarıyla mücadeleye karşı direncini arttırmak için aşılıarın büyük etkisi söz konusudur.

Sprey olarak uygulanan canlı attenüe aşılıar yerel ve hücrenel aracılı bağışıklığı uyarmaktadır. Harderian ve lakrimal bezler lokal IgA üretirken aktive CD8+ ve CD4+ lenfositler solunum yolunun enfeksiyondan temizlenmesinde etkili olurlar. Aşılıama sonucunda dolaşımda bulunan antikorlar (çoğunlukla

lg G) virüsün solunum yolundan böbrekler ve üreme sistemi dahil diğer duyarlı organlara yayılmasını sınırlandırır (Aziz 2020). Aşılamanın immunizasyonunu, sürünün aşılama takvimi, sürü için seçilen aşı tipi, aşının uygulama yolu, uygulama tekniği, aşılanan kanatlıların sağlığı ve aşı ekibinin uygulama becerisi etkilemektedir. Saha da uygulanan aşı programları IBV'nun bölgedeki sirkülasyonu ve aşılanacak sürünün durumuna göre farklılık gösterebilir. Bunların yanında saha şartları altında yapılan aşılamalarda, çiftlikteki hijyen şartları ve sevk idare yöntemleri de büyük önem taşıdığı için aşılarından tam anlamıyla koruma beklemek gerçekçi olmayacaktır (Goncagül ve ark. 2020).

Kapsamlı aşılama olsa bile, ticari olarak IB salgınları kümes hayvanları üreticileri için önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Sürekli olarak yeni serotipler ve varyantlar ortaya çıkmakta, bu da kümes hayvanı üreticilerini ve hayvan sağlığı şirketlerini aşılama planlarını sürekli olarak değerlendirmeye ve yeni aşılar üretmeye zorlamaktadır. IBV aşı kombinasyonları üzerine yapılan araştırmalar ve saha verileri, bazı kombinasyonların heterolog enfeksiyonlara karşı çapraz koruma sağlayabildiğini ve üreticilerin kanatlı hayvan sağlığını korurken aşı programlarını basit tutmalarına izin verdiğini göstermektedir.

Yeni aşı teknolojileri üzerine yapılan araştırmalar, IBV ile ilgili bilgilerimizin sürekli olarak artışı daha iyi kontrol stratejilerine yol açarken, uygulama yöntemlerine odaklanılarak da, zayıf teknik nedeniyle aşılama başarısızlıklarının ortaya çıkmasını sağlayacaktır.

Kaynaklar

- Aral EM. (2016) Türkiye'de Enfeksiyöz Bronşitis Viruslarının RT-PCR ile Saptanması ve Moleküler Karakterizasyonu. Ankara Üni. Sağ. Bil. Ens. Doktora Tezi.
- Armesto M, Evans S, Cavanagh D, Abu-Median AB, Keep S, Britton P. (2011) A recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene belonging to the 4/91 serotype. *PLoS One* e24352.
- Aziz T. (2020) Avian infectious bronchitis virus: infection, evolution, and immunity <https://www.thepoultrysite.com/articles/avian-infectious-bronchitis-virus-infection-evolution-and-immunity>. Erişim tarihi: 06.12.2020.
- Bande F, Arshad SS, Hair Bejo M, Moeini H, Omar AR. (2015) Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. *J. Immunol. Res.* 1–12.
- Boltz DA, Nakai M and Bahra JM. (2004) Avian infectious bronchitis virus: A possible cause of reduced fertility in the rooster. *Avian Dis.* 48: 909-915.
- Britton P, Evans S, Dove B, Davies M, Casais R, Cavanagh D. (2005) Generation of a recombinant avian coronavirus infectious bronchitis virus using transient dominant selection. *J. Virol. Methods* 123. 203–211.
- Callison SA, Hilt DA, Boynton TO, Sample BF, Robison 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.
- Casais R, Davies M, Cavanagh 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, Davis DJ, Cook J, Li D, Kant A, and Koch G. (1992) Location of the amino acid differences in the SI spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 21: 33-43.
- Cavanagh D, Elus MM, and Cook JK. (1997) The pathogenicity of new variant IBV isolates need sequence variation in the SI spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian Pathol.* 26:63.
- Cavanagh D. (2003) Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experience of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.* 32(6), 567-582.
- Cavanagh D, Casais R, Armesto M, Hodgson T, Izadkhasti S, Davies M, Lin F, Tarpey I, Britton P. (2007) Manipulation of the infectious bronchitis coronavirus genome for vaccine development and analysis of the accessory proteins. *Vaccine* 25, 5558–5562.
- Cavanagh D, Gelb J. (2008) Infectious bronchitis. Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE. eds. *Diseases of Poultry* 12th. pp. 117–135. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional.
- Cook J, 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 J ve Jackwood M. (2020) Enfeksiyöz Bronşitis www.enfeksiyoz-bronsitis.com. Erişim Tarihi:27.11. 2020.
- Çelebi M. (2009) Yeni Bir Enfeksiyöz Bronşitis Virüsü Olan 4/91 (793b)'in Ege Bölgesinde Varlığının Ortaya Konulması. Doktora Tezi Adnan Menderes Üni. Sağ. Bil. Ens.
- Çöven F. (2012) Kanatlıların Enfeksiyöz Bronşitis Hastalığı Yumurta Bülteni. s:10;14-16.
- Darteil R, Bublot M, Laplace E, Bouquet JF, Audonnet JC, Rivière M. (1995) Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens. *Virology* 211, 481–490.
- de Wit JJ, Cook JK, Van Der Heijden HM. (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.* 40, 223–235.
- Esendal MÖ. (2002) Enfeksiyöz Bronşitis, Kanatlı Hayvan Hastalıkları İzgür M, Akan M, eds. Medisan Yayınları.50. Ankara, 155-162.
- Fang Y, Yujun Z, Yongting H, Jianyang Q, Wenxin L, Wenhui J, Xuying L, Qian W, Xiumin S, Zhong L. (2013) Protection of chickens against infectious bronchitis virus with a multivalent DNA vaccine and boosting with an inactivated vaccine. *J. Vet. Sci.* 14, 53–60.
- Goncagül G, Kardoğan Ö, Günaydın E. (2020) İç Anadolu'da enfeksiyöz bronşit virüsü aşılmasının etkinliği. *Etlık Mikrobiyoloji Derg.* 31(2), 147-153.
- Guo Z, Wang H, Yang T, Wang X, Lu D, Li Y, Zhang Y. (2010) Priming with a DNA vaccine and boosting with an inactivated vaccine enhance the immune response against infectious bronchitis virus. *J. Virol. Methods* 167, 84–89.

- Hodgson T, Casais R, Dove B, Britton P, Cavanagh D. (2004) Recombinant infectious bronchitis coronavirus Beaudette with the spike protein gene of the pathogenic M41 strain remains attenuated but induces protective immunity. *J. Virol.* 78, 13804–13811.
- Hudu SA, Shinkafi SH, Umar S. (2016) An overview of recombinant vaccine technology, adjuvantts ant vaccine delivery method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 8(11): 19–24.
- Jackwood MW. (2012) Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World *Avian Diseases.* Vol. 56, No. 4 pp. 634–641.
- Jackwood MW, de Wit S. (2013). Infectious bronchitis. Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V. Eds. *Diseases of Poultry.* Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa, Ames, IA. pp. 139–160.
- Jackwood MW, Hilt DA, Sellers HS, Williams SM, Lasher HN. (2010) Rapid heat-treatment attenuation of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 39, 227–233.
- Jackwood MW, Jordan BJ, Roh HJ, Hilt DA, Williams SM. (2015) Evaluating protection against infectious bronchitis virus by clinical signs, ciliostasis, challenge virus detection, and histopathology. *Avian Dis.* 59, 368–374.
- Johnson MA, Pooley C, Ignjatovic J, Tyack SG. (2003) A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. *Vaccine* 21. 2730–2736.
- Jordan BJ. (2016). Spray Application of Infectious Bronchitis Virus Vaccines in the Hatchery: How Efficient are We? XXIV Congreso de Avicultura Centroamericana y del Caribe. Erişim adresi: www.anaviguatemala.org/xxiv-congreso-de-avicultura-centroamericano-y-del-caribe/2016. Erişim tarihi: 20.05.2020.
- Jordan BJ. (2017) Vaccination against infectious bronchitis virus: A continuous challenge. *Veterinary Microbiology,* 206. 137–143.
- Jungherr EI, Chomiak TW, Luginbuhl RE. (1956) Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. Proc. 60th Annual Meeting U.S. Livestock Sanitary Association. 203–209.
- Kahya S, Çöven F, Temelli S, Eyiğör A, Çarlı 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.
- Ladman BS, Loupos AB, Gelb Jr. (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.
- Lee CW, Hilt DA, Jackwood MW. (2003) Typing of field isolates of infectious bronchitis virus based on the sequence of the hypervariable region in the S1 gene. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15:344–348.
- Li M, Wang XY, Wei P, Chen QY, Wei ZJ, Mo ML. (2011). Serotype and genotype diversity of infectious bronchitis viruses isolated during 1985–2008 in Guangxi, China. *Arch. Virol.* 57:467.
- Li H, Wang Y, Han Z, Wang Y, Liang S, Jiang L, Hu Y, Kong X, Liu S. (2016) Recombinant duck enteritis viruses expressing major structural proteins of the infectious bronchitis virus provide protection against infectious bronchitis in chickens. *Antiviral Res.* 130, 19–26.
- Morgan RW, Gelb Jr, Schreurs J, Lutticken CS, Rosenberger D, Sondermeijer PJ. (1992) Protection of chickens from Newcastle and Marek's diseases with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing the Newcastle disease virus fusion protein. *Avian Dis.* 36, 858–870.
- OIE (2018) Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Office International des Epizooties, Chapter 3.3.2. World Organisation for Animal Health, Paris. Erişim adresi: <https://www.oie.int>. Erişim tarihi: 12.06.2021.
- Öngör H, Timurkaan N, Çöven F, Karabulut B, Eröksüz H, Çetinkaya B. (2021) Detection of Israel variant 2 (IS/1494/06) genotype of Infectious Bronchitis Virus in a layer chicken flock. *Ankara Üniv Vet Fak Derg,* 68, 167–172, 2021 DOI: 10.33988/auvfd.756970.
- Pharmacopoeia. (2016) Avian Infectious Bronchitis Vaccine (live). European Pharmacopoeia, pp. 1008–1010.
- Purswell JL, Fritz BK, Branton SL, Leigh SA. (2008) Effects of system pressure and nozzle type on spray application of avian vaccines. *Appl. Eng. Agric.* 24, 785–789.
- Rautenschlein S, Hans-Christian P (2021). Infectious bronchitis: 80 years of control efforts to combat a Coronavirus infection in poultry. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* Vol. 134, No.1 DOI:10.2376/1439-0299-2020-27.
- Roh HJ, Jordan BJ, Hilt DA, Jackwood MW. (2014) Detection of infectious bronchitis virus with the use of real-time quantitative reverse transcriptase- PCR and correlation with virus detection in embryonated eggs. *Avian Dis.* 58, 398–403.
- Roh HJ, Jordan BJ, Hilt DA, Ard MB, Jackwood MW. (2015) Hatchery spray cabinet administration does not damage avian coronavirus infectious bronchitis virus vaccine based on analysis by electron microscopy and virus titration. *Avian Dis.* 9, 149–152.
- Toro H, Zhang JF, Gallardo RA, van Santen VL, van Ginkel FW, Joiner KS, Breedlove C. (2014). S1 of distinct IBV population expressed from recombinant adenovirus confers protection against challenge. *Avian Dis.* 58, 211–215.
- USDA. (1999) Title 9, Code of Federal Regulations, Standard Requirements for IBV Vaccines. Animal and Plant Health Inspection Service, USDA Section 113 p.
- Valastro V, Holmes EC, Britton P, Fusaro A, Jackwood MW, Cattoli G. (2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infection, Genetics and Evolution,* 39, 349–364.
- Yang T, Wang HN, Wang X, Tang JN, Lu D, Zhang YF, Guo ZC, Li YL, Gao R, Kang RM. (2009) The protective immune response against infectious bronchitis virus induced by multi-epitope based peptide vaccines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 1500–1504.
- Yang X, Zhou Y, Li J, Fu L, Ji G, Zeng F, Zhou L, Gao W, Wang H (2016). Recombinant infectious bronchitis virus (IBV) H120 vaccine strain expressing the hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein of Newcastle disease virus (NDV) protects chickens against IBV and NDV challenge. *Arch. Virol.* 161, 1209– 1216.
- Yılmaz H, Altan E, Çizmecigil UY, Gürel A, Öztürk G, Bamac OE, Aydın Ö, Briton P, Monne I, Cetinkaya B. (2016) Phylogeny and S1 gene variation of infectious bronchitis virus detected in broilers and layers in Turkey. *Avian Dis,* 60, 596–602.
- Yin L, Zeng Y, Wang W, Wei Y, Xue C, Cao Y. (2016) Immunogenicity and protective efficacy of recombinant fusion proteins containing spike protein of infectious bronchitis virus and hemagglutinin of H3N2 influenza virus in chickens. *Virus Res.* 223, 206–212.