



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**MAREK HASTALIĞININ TEŞHİSİ VE TÜRKİYE’DE
KULLANILAN AŞILARIN AYIRIMINA YÖNELİK ÇOKLU
KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI PCR HIZLI TANI KİTİ
GELİŞTİRİLMESİ**

Özlem KARDOĞAN

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Hamit Kaan MUŞTAK

ANKARA

2019

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MAREK HASTALIĞININ TEŞHİSİ VE TÜRKİYE’DE
KULLANILAN AŞILARIN AYIRIMINA YÖNELİK ÇOKLU
KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI PCR HIZLI TANI KİTİ
GELİŞTİRİLMESİ**

Özlem KARDOĞAN

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Hamit Kaan MUŞTAK

ANKARA

2019

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

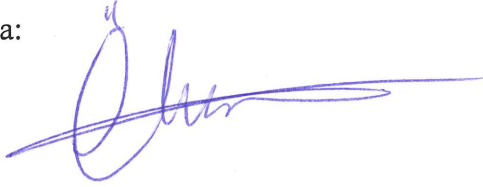
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Marek Hastalığının teşhisi ve Türkiye’de kullanılan aşılardan ayırımına yönelik çoklu Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR hızlı tanı kiti geliştirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Dr. Özlem KARDOĞAN

Tarih: 24.03.2019

İmza:



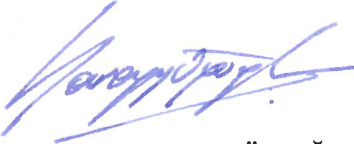
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalında

Özlem KARDOĞAN tarafından hazırlanan “Marek Hastalığının Teşhisi ve Türkiye’de Kullanılan Aşıların Ayırımına Yönelik Çoklu Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Hızlı Tanı Kiti Geliştirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/01/2019



Prof.Dr. Murat YILDIRIM
Kırıkkale Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof.Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU
Ankara Üniversitesi
Üye



Doç.Dr.Hamit Kaan MÜŞTAK
Ankara Üniversitesi
Raportör

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

Prof.Dr.Yılmaz ARAL
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	2
1.2. Etiyoloji	4
1.3. Epizotoloji	7
1.3.1. Marek hastalığının konakçıları	7
1.3.2. Marek hastalığının yayılışı, taşıyıcıları, vektörleri	8
1.3.3. Marek hastalığının inkubasyon periyodu ve insidensi	9
1.4. Patogenez	11
1.5. Marek Hastalığında Klinik Bulgular ve Lezyonlar	14
1.6. Marek Hastalığı Tanı Yöntemleri	16
1.6.1. MHV İzolasyonu	16
1.6.2. Serolojik Testler	17
1.6.3. Histopatolojik Yöntemler	17
1.6.4. Moleküler Testler	18
1.7. Marek Hastalığının Koruma ve Kontrol Stratejileri	19
1.7.1. Genetik direnç	19
1.7.2. Aşılama	20
2. GEREÇ ve YÖNTEM	22
2.1. Gereç	22
2.1.1. Klinik Örnekleri	22

2.1.2. Kullanılan Referans Suşlar	24
2.1.2.1. Onkojenik Serotip 1 suşu	24
2.1.2.2. Serotip 1 CVI988 Suşu ve Serotip 3 HVT Suşu	24
2.2. Yöntem	24
2.2.1. Histopatolojik Yöntem	24
2.2.2. Viral DNA izolasyonu	25
2.2.3. Primer ve Prob Tasarımı	27
2.2.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR	27
2.2.5. Çoklu q PCR'ın Duyarlılık ve Özgüllük Testleri	30
2.2.6. Çoklu qPCR Metodunun Klinik Örneklerle Validasyonu	30
3. BULGULAR	31
3.1. Hispatolojik Bulgular	31
3.1.1. Bezli Mide	31
3.1.2. Nervus ischiadicus	32
3.2. Çoklu qPCR metodunun Referans suşlarla amplikasyon sonuçları	32
3.3. Çoklu qPCR'nin Referans suşlarla Duyarlılık ve Özgüllük sonuçları	34
3.4. Çoklu qPCR Metodunun Klinik Örneklerle Validasyonu Sonuçları	38
4. TARTIŞMA	40
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
ÖZET	44
SUMMARY	45
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	58

ÖNSÖZ

Kanatlı endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olabilen Marek hastalığına (MH), Gallid herpesvirüs 2 (GaHV-2) neden olur. OIE (World Organisation for Animal Health) verilerine göre tüm dünyada yaygındır. Türkiye’de yapılan çalışmalarda Marek hastalığının kanatlı hayvanlarda en sık rastlanan tümöral hastalık olduğu bildirilmiştir. MHV, 1960’lı yılların sonunda ilk başarılı aşı geliştirilen onkojenik virüstür. Şu an kullanılan aşılardan canlı üç viral suştan türetilen aşılardır: HVT FC126 suşu, GaHV-3 SB-1 suşu ve GaHV-2 CVI988/Rispens suşudur. CVI988/Rispens aşısı MHV-1’in doğal olarak zayıflatılmış bir suşudur ve CVI988/Rispens aşısı Marek hastalığının virülen suşlarından kolaylıkla ayırt edilemez. MH aşısı virüsleri, kalıcı enfeksiyon ve yaşam boyu bağışıklık kazandırarak tümörlere ve mortaliteye karşı etkili koruma sağlamasıyla birlikte, aşı bazı virülen virüslerle enfeksiyonu engelleyemez dolayısıyla tavuklar hem aşı hem de virülen MHV-1 suşlarıyla potansiyel olarak enfekte olabilirler.

Yüksek Lisans tez çalışmamın her anında sabır, hoşgörü ve anlayışıyla her daim yanımda olan, bilgi ve deneyimleriyle bana ışık tutup yol gösteren danışmanım Doç. Dr. Hamit Kaan MUŞTAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü İdaresine, tezimin Histopatolojik incelemelerinde benden desteklerini esirgemeyen VKMAE Patoloji Laboratuvarı Şefi Dr. Yavuz ULUSOY’a, Bahadır KILINÇ’a, Neslihan AKBULUT TOSUN’a Kanatlı aşıları konusunda verdikleri bilgilerden dolayı Bornova VKE Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Bölüm Şefi Ahmet ARSLAN ve Mustafa KARS’a, varlıklarıyla desteklerini üzerimden esirgemeyen Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvar personeline ve aileme en samimi duygularım ile sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

bp	Base pair
CD4+	Cluster of Differentiation 4 (Yardımcı T lenfosit)
CD8+	Cluster of Differentiation 8 (Sitotoksik T lenfosit)
CPE	Sitopatik Etki
CVI988	Rispens Aşı Suşu
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
GaHV-2	Gallid Herpesvirus Tip 2
GaHV-3	Gallid Herpesvirus Tip 3
HE	Hematoksilen-Eosin Boyası
IL-8	İnterleukin 8
LL	Lenfoid lökosis
MD	Marek's Disease, Marek Hastalığı
MDV	Marek's Disease Virus
MeHV-1	Meleagrid Herpesvirus Tip 1
Meq	MHV EcoRI-Q
MH	Marek Hastalığı
MHC	Major Histocompatibility Complex
MHV	Marek Hastalığı Virüsü, Marek Hastalığı Virüsü
mm	Milimetre
N	Negatif
ND	Newcastle Hastalığı
nm	Nanometre
NO	Nitrik Oksit
°C	Santigrad Derece
OIE	World Organisation for Animal Health, Dünya Hayvan Sağlık Örgütü
P	Pozitif
pH	Asit ve Alkalın Yoğunluğunun Göstergesi
pp38	Fosfoprotein 38

RET	Retiküloendoteliasis
rpm	Revolution per Minute
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizm
TFE	Tüy Follikül Eitelleri
vMHV	Virulent Marek Hastalığı Virüsü
vv+MHV	Aşırı Virulent Marek Hastalığı Virusu
vvMHV	Çok Virulent Marek Hastalığı Virusu
μ	Mikron
μl	Mikrolitre



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Dünya çapında MH virüsüne ilişkin dağılım haritası	3
Şekil 1.2. Zarflı bir MHV virusunun elektron mikroskop görüntüsü	5
Şekil 1.3. MHV'nin tüm genomunun şematik gösterimi	6
Şekil 1.4. Kanatlı türleri arasında vertikal ve horizontal bulaşma modeli	9
Şekil 1.5. Dünya çapında MH virüsüne ilişkin dağılım haritası	10
Şekil 1.6. Marek Hastalığının patogeneze aşamalarının şematik olarak gösterimi	14
Şekil 3.1.1.1. Bezli midede anizomorfizm ve plemorfizm özellik gösteren lenfosit ve lenfoblast hücre infiltrasyonu, HE	31
Şekil 3.1.2. <i>N. ischiadicus</i> anizomorfizm ve plemorfizm özellik gösteren lenfosit ve lenfoblast hücre infiltrasyonu, HE	32
Şekil 3.2.1. Onkojenik Serotip 1 (VKME17-M01) hedefi sonuçlar	33
Şekil 3.2.2. CVI988 aşı suşu sonuçları. A: CVI988 aşı suşu (FAM) sonuçları, B: CVI988 aşı suşu (CY5) sonuçları	33
Şekil 3.2.3. HVT aşı suşu sonuçları [Rismavac+HVT (sarı) ve İnnovac HVT (kırmızı)]	33
Şekil 3.3.1. FAM kanalında test edilen onkojenik MHV-1 (VKME17-M01) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu qPCR ile elde edilen ct grafiği.	34
Şekil 3.3.2. FAM kanalında test edilen CVI 988+HVT (Rismavac+CA 126) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu qPCR ile elde edilen ct grafiği	35
Şekil 3.3.3. CY5 kanalında test edilen CVI988+HVT (Rismavac+CA 126) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu qPCR ile elde edilen ct grafiği	35
Şekil 3.3.4. ROX kanalında test edilen CVI988+HVT (Rismavac+CA 126) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu qPCR ile elde edilen ct grafiği	36
Şekil 3.3.5. FAM kanalında test edilen CVI 988 (Poulvac Marek CVI) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu qPCR ile elde edilen ct grafiği	36
Şekil 3.3.6. CY5 kanalında test edilen CVI988 (Poulvac Marek CVI) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu qPCR ile elde edilen ct grafiği	37
Şekil 3.3.7. ROX kanalında test edilen infnovac HVT aşı suşlarının 10 katlı sulandırmalarına ait qPCR sonuçları	37

Şekil 3.4.1. Onkojenik MHV-1 hedefinin değerlendirildiği FAM kanalı okuması sonucu	39
Şekil 3.4.2. HVT aşısı hedefinin değerlendirildiği, Çankırı ili 8 nolu işletmenin sonuçları A) FAM kanalı sonuçları, B) (ROX) kanalı sonucu	39
Şekil 3.4.3. CVI988 aşısı hedefinin değerlendirildiği Çorum ili 2 nolu işletmenin sonuçları A) FAM kanalı sonuçları. B) CVI988 aşısı suşu (CY5) sonuçları	39



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.1. Çalışmada kullanılan örneklerin toplandığı iller, üretim tipi, örneklerin türü, sayıları ve sürülerin aşı durumları	23
Çizelge 2.2.2. Çalışmada kullanılan primer, prob dizileri ve özellikleri	26
Çizelge 2.2.4. Çoklu qPCR sonuçlarının değerlendirme tablosu	29
Çizelge 3.3.1. Onkojenik MHV-1 (VKME17-M01) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu elde edilen ct değerleri ve DNA konsantrasyonları	34
Çizelge 3.3.2. CVI 988+HVT (Rismavac+CA 126) aşısı suşunun 10 katlı sulandırma sonucu elde edilen ct değerleri ve DNA konsantrasyonları	35
Çizelge 3.3.3. CVI 988+HVT (Rismavac+CA 126) aşısı suşunun 10 katlı sulandırma sonucu elde edilen ct değerleri ve DNA konsantrasyonları	35
Çizelge 3.3.4. ROX kanalında test edilen CVI988+HVT (Rismavac+CA 126) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu elde edilen ct değerleri ve DNA konsantrasyonları	36
Çizelge 3.3.5. FAM kanalında test edilen CVI988 (Poulvac Marek CVI) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu elde edilen ct değerleri ve DNA konsantrasyonları	36
Çizelge 3.3.6. CY5 kanalında test edilen CVI988 (Poulvac Marek CVI) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu elde edilen ct değerleri ve DNA konsantrasyonları	37
Çizelge 3.3.7. ROX kanalında test edilen İnnovac HVT aşısı suşlarının 10 katlı sulandırma sonucu elde edilen ct değerleri ve DNA konsantrasyonları	37

1. GİRİŞ

Marek hastalığı evcil kanatlıların, periferik sinirlerinde demyelinizasyon, mononükleer infiltrasyonlarla kendini gösteren lenfoproliferatif ve oldukça kontagiyöz bir hastalıktır. İlk kez 1907’de tanımlanmıştır (Marek, 1907). Hastalığa neden olan etken, lenfotropik, onkojenik herpesvirüs, Marek hastalığı virüsü (MHV)’dür (Biggs, 1975; Buckmaster ve ark., 1988). Memeli herpesvirusundan 131 milyon yıl önce ayrılmış olan Mardivirus genusunda yer alan MHV, insanlarda enfeksiyona sebep olmamaktadır (Payne,1999).

MHV’in en önemli özelliği T hücrelerinde lenfomalar oluşturmastır (Biggs, 1975). Bunun yanı sıra immunitiyi de baskıladığından hayvanları diğer patojenlere duyarlı hale getirmektedir (Biggs, 1968; Miles, 2015).

MHV, tüy follikül epitellerinde replike olur ve kümesteki toz ile horizontal olarak yayılır (Rispen ve ark., 1972). MHV ile enfekte olan bir tavuk, tüm yaşamı boyunca MHV taşır, sporadik olarak kümes ve çevresine virüsü saçır (Miles, 2015). Marek, her yaştaki tavukta görülmekle birlikte 12-30 haftalık tavuklarda daha çok görülmektedir (OIE, 2017). Marek, tüm kümes tavukçuluğu yapan ülkelerde bulunmaktadır (Schat ve Nair, 2013). Ülkemizde de ilk kez 1960’larda bu hastalık tespit edilmiştir (Atılğan ve Yeşilada, 1961; Başkaya ve Minbay, 1974; Gürel ve Yeşilada 1993).

Etkili bir tedavisi bulunmayan, yapılan aşılama ile kontrol altına alınmaya çalışılan Marek hastalığı (MH)’nin dünya çapında kanatlı sektörüne maliyeti yılda bir ila iki milyar dolar arasındadır (Hildebrandt ve ark., 2014). Bu nedenle, MH’nin kontrolü ekonomik olarak önemlidir.

Tanımlandığı zamanlardan günümüze MHV’de 10-15 yılda bir evrim görülmekte hastalığın klinik-patolojik bulguları ve şiddeti değişmekte, virulensindeki

artışlar nedeniyle (Osterrieder ve ark., 2006; Witter, 1997) her geçen yıl daha da büyüyen kanatlı endüstrisi için ciddi bir problem olarak önemini korumaktadır.

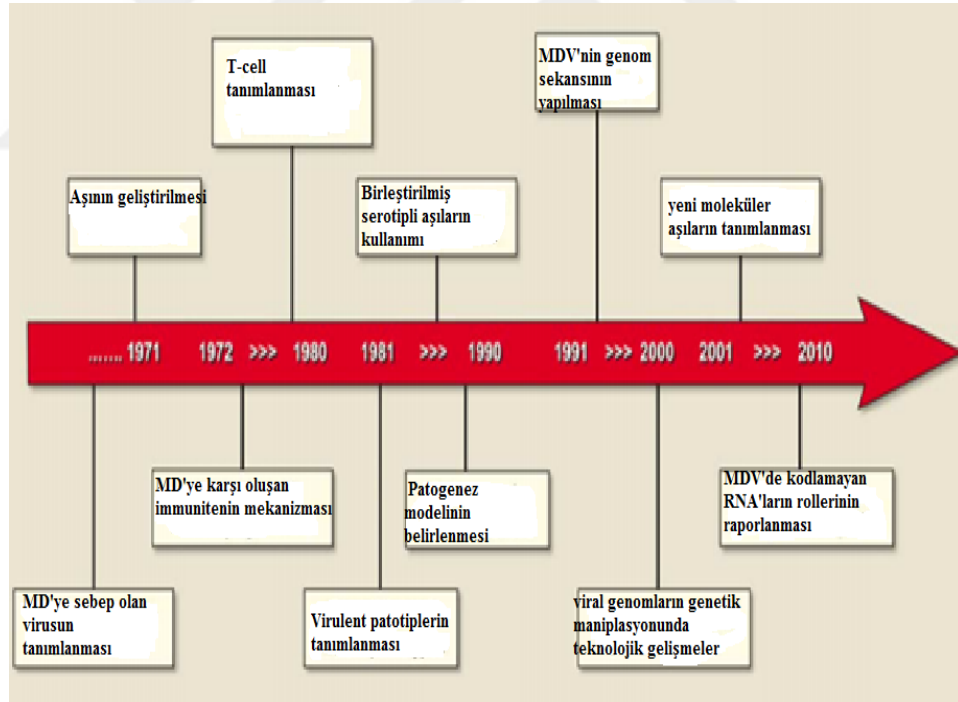
1.1. Tarihçe

Marek, uzun yıllar boyunca tavuklar ve hindiler arasında sporadik olarak gözlemlenmiştir (Pappenheimer ve ark., 1929). 1907'de Budapeşte Kraliyet Macar Veteriner Okulu'nda Veteriner Klinisyen ve Patolog olan Dr. Joseph Marek, 4 horozun kanat ve bacaklarındaki bir hastalığı multiplepolinöritis olarak tarif etmiştir. Horozları ayrıntılı olarak incelediğinde, sakral pleksusların kalınlaştığı ve omurga yolunun mononükleer hücreler tarafından infiltre olduğu dikkatini çekmiştir. Daha sonra Hastalığı bir "nevrit iltihabı" veya bir "polinörit" olarak tanımlamıştır (Biggs, 2001). Dr. Joseph Marek'in raporundan bir yıl sonra, 1908'de Ellerman ve Bang adlı iki araştırmacı hastalığı yeniden üretmeyi başarmışlardır. Daha sonra, 1921 yılında Kaupp (gözlerde körlüğü ilk kez teşhis etmiştir) Amerika'da, 1924'de Van der Walle ve Winkler-Jenius Hollanda'da, 1929'da Galloway İngiltere'de hastalığı tanımladıklarında bu hastalığın tüm dünyada yayılmaya başladığı anlaşılmıştır (Başkaya ve Minbay, 1974; Pastoret, 2004). Bu ilk çalışmalarda sinirleri etkileyen bir hastalık durumu olduğu bildirilerek, hastalık polyneuritis, tavuk felci ve neuromyelitis gallinarum olarak tanımlanmıştır. Ancak, o yıllarda Marek hastalığı lenfoid lökozla benzer semptomlar gösterdiği için iki hastalık birlikte Kanatlı Lenfoid Lökoid Kompleks olarak tanımlanmıştır (Biggs, 2004).

Marek Hastalığının tarihindeki önemli dönüm noktalarından biri, Pappenheimer ve ark. (1929)'nın 60 tavukta yaptıkları bir çalışmada sinirlerde görülen lezyonlara ek olarak 6 tavuğun dalak, yumurtalık gibi visseral organlarında lenfoid tümörlerin de olduğunu bildirmeleri ve bu hastalığı visseral lenfomatozis olarak tanımlamalarıdır (Pappenheimer ve ark., 1929).

Ticari sürülerde 1930 ve 1940 yıllar arasında mortalitede dikkate değer oranda artışlar gözlemlenmiştir. Mortalite artışına sebep olan bu klinik bulguları

değerlendiren Dr. Biggs, terminolojideki karışıklığı gidermek için 1960'da, Utrecht'te düzenlenen Dünya Veteriner Kumes Hayvanları Derneği Konferans'ında bu hastalığı, ilk kez tanımlayan "Marek" adıyla adlandırılmasını önermiştir. Bu isim kabul görmüş olmasına rağmen bazı araştırmacılar, gözlenen patolojik semptomlar ve lezyonlara dayanarak, Avian lökosis kompleks olarak adlandırmakta ısrar etmişlerdir (Biggs ve Payne, 1964). Daha sonra Churchill ve Biggs (1967) ve Nazerian ve ark. (1968), tarafından hastalığın etiyolojik ajanı olan herpesvirüs izole edilmiş ve "Marek hastalığı virüsü" (MHV) olarak adlandırılmıştır (Woniakowski ve Niczyporuk, 2016). Etkenin izolasyonu ile Marek hastalığının Lenfoid Lököz'dan farklı bir hastalık olduğu kabul edilmiştir. Ama ilginçtir ki hastalığın ilk tanımlanmasının üzerinden 60 yıl geçtikten sonra terminolojideki karışıklık giderilmiştir (Biggs 2004). Şekil 1'de Marek hastalığının araştırmalarının kırk yıllık özeti tanımlanmıştır.



Şekil 1.1. 40 yıllık MH araştırmalarının özeti (Biggs ve Venugopal, 2012).

1.2. Etiyoloji

Uluslararası Virüslerin Taksonomisi Komitesi (ICTV, 2011) tarafından yapılan son sınıflandırmaya göre, MHV, Herpesvirales takımı, Herpesviridae ailesi, Alpha herpesvirinae alt ailesi ve Mardivirus cinsi (Marek hastalık benzeri virüsler) içerisinde yer almıştır (Witter ve ark., 2005).

MHV, başlangıçta biyolojik özelliklerinden dolayı Gamma herpesvirinae içerisinde yer alırken 2002’de tüm genom analizleri tamamlandıktan sonra Mardivirus genusunda yeniden sınıflandırılmıştır (Tulman, 2000). Bu tarihe kadar bu genus 4 türden oluşuyordu: *Gallid herpesvirus-3* (GaHV-3), *Meleagrid herpesvirüs-1* (MeHV-1) [yaygın olarak hindi herpesvirüsü (HVT) olarak bilinen], *Anatid herpesvirüs-1* ve *Columbid herpesvirüs-1*’dir. Günümüzde GaHV-2 (*Gallid herpesvirus-2*) serotip 1, GaHV-3 (*Gallid herpesvirus-3*) serotip 2 ve MeHV-1 (*Meleagrid herpesvirus-1*) ise serotip 3 olarak adlandırılmaktadır (Osterrieder ve ark., 2006; Pandey ve ark., 2016; The Taxonomicon, 2013). Serotip 1 onkojenik, serotip 2 ve serotip 3 non-onkojenikler olarak ayrılmaktadırlar (Witter ve Schat, 2003). MHV’nin bu üç seropiti antijenik özelliklerine göre OIE’de aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır (OIE 2017).

1. Serotip 1

Bu serotip, virüsün tüm patojenik suşlarını içerir, virulent plus (örn., 648A), çok virulent (örn. Md/5, Md/11, Ala-8, RB-1B), virulent (ör. HPRS-16, JM GA), hafif virulent (örn., HPRS-B14, Conn A) ve son olarak zayıf bir şekilde virulent (örn., CU-2, CVI-988).

2. Serotip 2

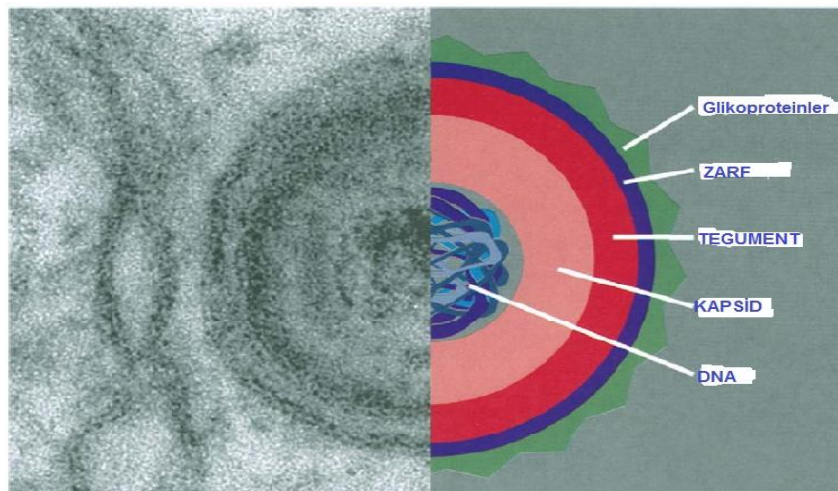
Bu serotip, doğal olarak avirulent MHV suşlarını (örn., SB-1, HPRS-24, 301B/1, HN-1) içermektedir. Bunlardan birkaçının virulent suşlara karşı koruma sağladığı gösterilmiştir.

3. Serotip 3

Bu serotip, doğal avirulent HVT (örn., FC126, PB1) suşlarını içerir. Genellikle monovalan aşı veya serotip 1 ve 2 suşlarının kombinasyonları olarak kullanılmaktadır (OIE, 2017).

Bu üç serotipin DNA dizilemesi ile gen içeriklerinin yakın olduğu belirlenmiştir. MHV-1 serotipinin 103 gen, MHV-2 serotipinin 102 gen ve MHV-3 serotipinin ise 99 gene sahip olduğu belirlenmiştir. Ama guanin ve sitozin (%G/C) oranları farklılık göstermektedir. MHV-1, MHV-2 ve MHV-3 sırasıyla %44,1, %53,2 ve %47,2 oranında G/C içermektedir (Lee ve ark., 2008).

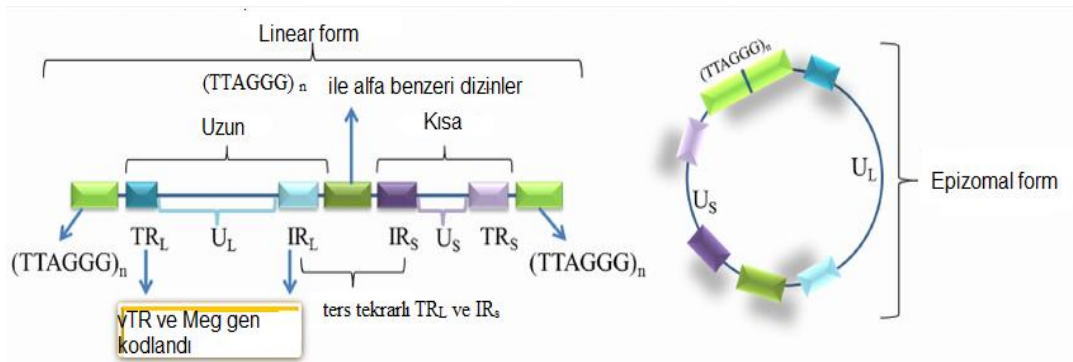
MHV, boyut olarak 160-180 kbp'lik lineer, çift zincirli bir DNA (dsDNA)'ya sahip bir virüstür (Witter ve ark., 1970; Witter ve ark., 2005;). Virionlar genellikle çekirdek içinde ve bazen sitoplazmada görülür (Schat ve Nair, 2013). Altıgen nükleokapsitli virüs partikülleri 85-100 nm çapında, zarflı virüs partikülleri ise 150-160 nm çapındadır (Calnek ve ark., 1970). MHV bir iç çekirdek, en dışta zarf (15 adet glikoprotein içerir) ve 256 kapsomerli bir kapsitten oluşmuştur. Zarf ve kapsid arasında tegument adılan verilen proteinden oluşan bir tabakaya sahiptir (Poonam ve ark., 2017).



Şekil 1.2. Zarflı bir MHV virusunun elektron mikroskop görüntüsü (Schumacher ve ark., 2000).

MHV'nin genomunda üç farklı gen grubu tanımlanmıştır. Birinci grup genler onkojenite ve patojeniteden sorumludur ve bunlar; *meg* (EcoRI-Q), fosfoprotein pp38 ve 132 bp tekrar gen bölgesi olarak adlandırılmıştır (Gimeno, 2004; Lee ve ark., 2008; Nair ve Kung, 2004). *Meg* gen, 339 aminoasitten oluşan bir proteini kodlamaktadır (Jones ve ark., 1992; Tulman ve ark, 2000). Ayrıca MHV, patogeneizde rol oynayan vIL8 (viral interlökin 8)'e sahiptir (Gimeno, 2004; Lee ve ark., 2008). vIL8 geni, serotip 2 ve HVT'de bulunmamaktadır (Parcells ve ark., 2001). İkinci grup genler glikoproteinleri kodlar. Üçüncü grup ise diğer bütün genleri kodlamaktadır (Nair ve Kung, 2004).

Marek hastalığı virüsünün DNA'sı, herpes simpleks virüsüne benzer DNA, uzun ters tekrarlı TR_L ve IR_L bölgeleri ve kısa ters çevrilmiş TR_S 'ler ve IR_S bölgeleri tarafından oluşturulan U_L ve U_S olarak isimlendirilen iki farklı bölgeyi kapsamaktadır. Patojenik ve nonpatojenik MHV DNA'larının restriksiyon enzimleri ile kesilen fragmentlerinin karşılaştırılması ile MHV'nin bu iki tipi arasında viral DNA'nın farklı olduğu, tavuklardaki tümör oluşumundan sorumlu olabilecek bölge olarak tanımlanmıştır. Yapılan çalışma sonuçlarında; nonpatojenik viral DNA'larda BamHI-D ve -H'de lokalize uzun ters çevrilmiş TR_L ve IR_L bölgelerinde özellikle genişleme görülmektedir (Fukuchi ve ark., 1985). Retroviral uzun terminal tekrarlarının (LTR) konak genoma eklenmesi, MHV'ye karşı kanser oluşumuna ve metastaza yol açan değiştirilmiş konak yanıtlarına neden olur (Cui ve ark., 2016). Şekil 3'de MHV'nin tüm genomu şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.3. MHV'nin tüm genomunun şematik görünümü (Pherson ve Delany, 2016).

1.3. Epizootiyoloji

1.3.1. Marek Hastalığının Konakları

Bu hastalıkta, tavuklar en önemli doğal konak olarak tanımlanmıştır. Bıldırcın, hindi, sülün, ördek ve bazı kaz türlerinin de hastalığa duyarlı olduğu bildirilmiştir. Primatlar dahil çeşitli memeli türlerinde yapılan deneysel inokulasyonlar, hastalığa dirençli olduklarını göstermiştir (Nair ve ark., 2008).

Japon bıldırcın ticari sürülerinde MH'nin doğal salgınlarının yaygın olduğu bildirilmektedir. Etkilenen hayvanlarda visseral organlarda lenfomalar gelişebilmektedir. Ancak periferik sinirler nadiren etkilenmektedir. Ölüm oranı %10-%20'ye ulaşabilmekte, ancak ölümler nispeten geç görülmektedir (Imai ve ark., 1990; Kobayashi ve ark., 1986; Pennycott ve ark., 2003; Smith ve ark., 1980).

Avrupa'da ticari hindi sürülerinde (Coudert ve ark., 1997; Gawel ve ark., 1998; Pennycott ve Venugopal, 2002; Voelckel ve ark., 1999) ve İsrail'de (Davidson ve ark., 2002) 1997 ile 2002 yılları arasında MH'nin ciddi salgınları olduğu bildirilmiştir. Bazı durumlarda, etkilenen hindi sürüleri broyler sürülerine yakın olarak yetiştirilmiştir. Felç, bazı hayvanlarda gözlenmiş ve periferik sinirler nadiren lenfositlerle infiltre olmuştur. Tümörlerden kaynaklı ölümler 8-30 haftalık yaşlar arasında %40-80'e ulaşmıştır (Coudert ve ark., 1997; Davidson ve ark., 2002).

Hastalık, ticari hindi popülasyonları içerisinde henüz endemik değildir. Yapılan deneysel çalışmalarda %70'e varan mortalite ile sonuçlanan MHV enfeksiyonlarına rastlanılmıştır (Sandelin ve Estola, 1974; Witter ve ark., 1974).

Deneysel çalışmalarda MHV inokule edilen ördeklerde klinik olarak hastalık gerçekleşmemiştir. Ancak antikolların varlığı görülmüştür (Baxendale, 1969). Son zamanlarda Japonya'da beyaz önlü kazlarda MH vakası bildirilmiştir (Murata ve ark., 2007; Tomikawa ve ark., 2001). Sonradan yapılan analizlerde bu türün büyük

bir çoğunluğunda ve birkaç farklı ördek türünde tüy uçlarında *meg* geninin varlığı tespit edilmiştir (Murata ve ark., 2012).

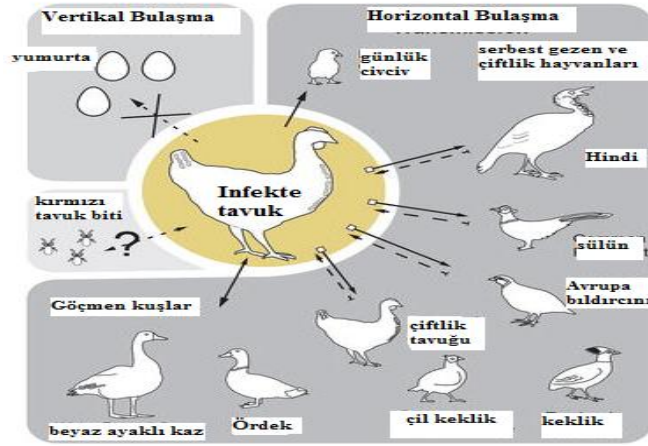
1.3.2. Marek Hastalığının Yayılışı, Taşıyıcılar, Vektörler

Marek hastalığı virüsü (serotip 1), hava yolu ile tavuklar arasında direkt veya indirekt yolla bulaşmaktadır (Biggs, 1985).

Tüy follikül epitelleri enfeksiyöz virüsü taşıyabilmekte ve üretebilmektedir (Calnek ve ark., 1970). MHV'li bu epitel hücrelerinin kümese saçılımı için kümeşte bulunan tavuklar enfeksiyon kaynağını oluşturmaktadırlar. Kontamine olmuş kümes tozu, 20°C–25°C'de en az birkaç ay ve 4°C'de yıllarca enfeksiyon kaynağı olabilmektedir (Calnek, 1986). MHV bir tavuk sürüsüne girdikten sonra aşı ve genetik direnç durumu etkili olmamakta enfeksiyon hızlıca hayvandan hayvana aktarılmaktadır (Kenzy ve Biggs, 1967; Nair ve ark., 2008).

MHV'nin yumurta yoluyla (vertikal) aktarılmadığı tespit edilmiştir. Ancak günlük civcivlerin ve piliçlerin, barınak üretim sistemleri içerisinde yer alan alet, ekipmanlar ve personel tarafından horizontal olarak enfekte olabilecekleri bildirilmektedir.

Göçmen kuşlar, ördekler ve beyaz ayaklı kazların MHV taşıyıcısı olduğu bildirilmiştir. Tavuk kırmızı akarları da kanatlı patojenlerinin taşıyıcıları olarak tanımlanmış ama MHV taşıyıp taşımadığı kesinlik kazanmamıştır. Şekil 1.4.'te MH'nin bulaşma modeli gösterilmiştir (Boodho, 2016). Çöp akarları, sinekler ve koksidual oositlerin MHV'yi aktarmadığı, kara böceklerin pasif olarak aktardığı bildirilmiştir (Beasley ve Lancaster, 1971; Brewer ve ark., 1968; Brewer ve ark., 1969).



Şekil 1.4. Kanatlı türleri arasında vertikal ve horizontal bulaşma modeli (Boodho, 2016).

Yapılan çalışmalarda hindi ve tavuklar arasında horizontal bulaşmanın olduğu belirlenmiştir (Coudert ve ark, 1997). Başka bir çalışma da tavuktan bıldırcınlara, bıldırcınlardan tavuklara MHV'nin transfer olduğu bildirilmiştir (Dutton ve ark., 1973; Witter ve Schat, 2003).

Marek hastalığı düzensiz yayılmakta, bazı bölgelerde daha sık görülürken bazı bölgelerde daha seyrek görülebilmektedir. Bunda da aşı uygulamalarının etkili olduğu bildirilmiştir (Biggs, 1967).

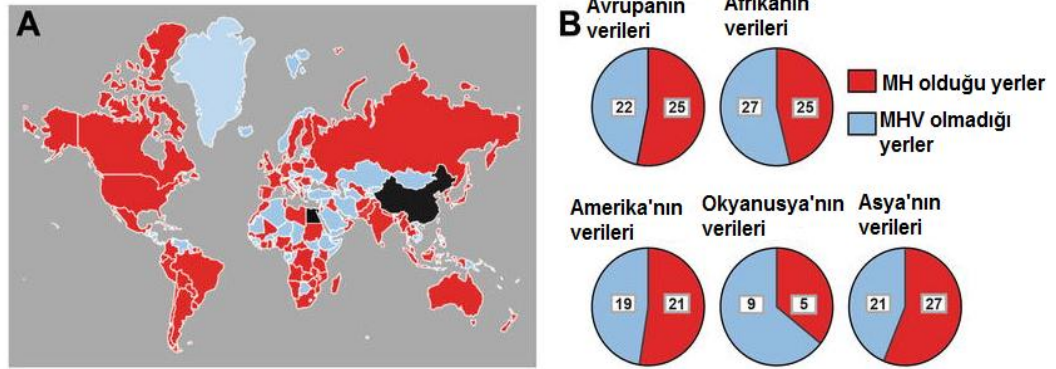
1.3.3. Marek Hastalığının İnkubasyon Periyodu ve İnsidensi

Doğal koşullarda gerçekleşen hastalıkta inkubasyon periyodunun belirlenmesi virüsle enfekte olma zamanının tam olarak bilinmemesinden dolayı henüz kesin olarak saptanamamıştır. Deneysel çalışmalarda inkubasyonun, bireyden bireye değişmekle birlikte 21-28 gün arasında olduğu belirlenmiştir. Ancak bazı bireylerde sürecin 2-3 aya kadar uzayabileceği de bildirilmektedir (Biggs, 1967). Klinik bulgular ve patolojik lezyonların genellikle deneysel inokulasyondan 3-4 hafta sonra ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Schat ve Nair, 2013). Saha koşulları altında, MH salgınları bazen aşılammış 3-4 haftalık yumurtacı tavuklarda görülebilmektedir.

Ciddi vakaların çoğunun ise 8-9 haftalık yaşlardan sonra görüldüğü bildirilmiştir (Morrow ve Fehler, 2004).

Marek hastalığına, yetişkin tavukların gençlere göre daha dirençli olduğu saptanmıştır (Witter ve ark., 1973). Bu hastalığa, her yaşta, 3-4 haftalık veya sonraki yaşlarda, en çok 12-30 haftalık yaşlarda rastlanılmaktadır (OIE, 2010). Broylerlerde MH'nin başlangıcı özellikle 4-6 haftalık yaşlar arasındadır (Okwor ve Eze, 2011). Yumurtacı sürülerde genellikle 10-12 haftalık yaşlarda olur. Bu aynı zamanda, yumurtlama periyodunun pik seviyeye ulaştığı 30 haftalık yaşlarda tümör oranının da en yüksek seviyeye ulaşacağının göstergesidir (Zhuang ve ark., 2015).

Bildirimi zorunlu bir hastalık olmadığından raporlama sistemleri farklıdır ve gerçek MH insidensini belirlemek zordur (Schat ve Nair, 2013). OIE verilerine göre tüm dünyada yaygındır (Couteaudier ve Denesvre, 2014). OIE'nin güncel verilerine göre, dünya ülkelerinin yaklaşık yarısında MHV enfeksiyonu vakaları bildirilmiştir ve aşağıda Şekil 1.5.'te şematize edilmiştir (Boodhoo ve ark, 2016).



Şekil 1.5. Dünya çapında MH virüsüne ilişkin dağılım haritası (Boodhoo ve ark, 2016).

Harita, OIE hayvan sağlık bilgi sistemi (WAHIS) aracılığıyla paylaşılan bilgilere göre oluşturulmuştur. Kırmızı yerler, MHV'nin 2009 yılından öncesi ve 2009-2016 yılları arasında raporlandığı alanları, mavi olan yerler ise MHV'nin olmadığı alanları göstermektedir. A) MHV pozitif olan ülkeleri resmeden dünya haritası. Hem Çin hem de Mısır (siyah) yılda bir MHV salgını bulunan endemik bölgelerdir. B) Dairesel grafikler coğrafi konumlarına (kıtalarına göre) göre OIE'ye MHV vakaları bildiren ülkelerin sayısını göstermektedir.

Yapılan çeşitli çalışmalarla ülkemizde de Marek hastalığının sık görüldüğü ortaya konulmuştur (Aydın ve ark., 1991; Köküuslu ve Özkul, 1975). Alkan ve Bayraktar'ın 1994'de Ankara, İstanbul, İzmir, Konya ve Manisa illerinde yaptıkları çalışmada Marek hastalığının kanatlı hayvanlarda en sık rastlanan ikinci viral hastalık olduğu ve en fazla Ankara ve Konya illerinde rastlanıldığı bildirilmiştir (Alkan ve Bayraktar, 1995).

MHV'nin insidensini birçok faktör etkilemektedir. Bunlar; MH virusuna maruz kalma yaşı, genetik yapı, maternal antikorların seviyesi, virüs suşunun virülansı, konağın cinsiyeti ve komplike edici faktörlerdir (örn., diğer immunosupresif ajanlarla enfeksiyon) (Miles, 2015). Genellikle dişiler tümör oluşumuna daha yatkındır. Maternal antikorların varlığı paralizi ve mortaliteyi geciktirir ve azaltır fakat MHV'ye maruziyetten birkaç gün sonra dokulardaki yayılımını önleyemez (Calnek, 1972; Payne ve Rennie, 1973).

Marek'te morbiditenin %10-50 arasında değiştiği, mortalitenin başlangıçta %80'e ulaşabileceği ve daha sonra azaldığı bildirilmiştir (Frederick ve ark., 1999). Hastalığın klasik formunda nadiren mortalite %10-15'i aşmaktadır ve bazen birkaç hafta veya aylar sonra da ortaya çıkabilmektedir. Akut formda insidensi %10-30 arasındadır, bazen bu oran %70'e ulaşabilir. Mortalite birkaç hafta içinde hızlı bir şekilde artabilir ve daha sonra durur ya da birkaç ay boyunca sabit veya yavaş yavaş düşen hızda devam edebilir. Akut formda, kanatlı hayvanlar sıklıkla şiddetli depresyona uğrar ve bazıları klinik hastalık belirtileri göstermeden ölebilir (OIE, 2017).

1.4. Patogenez

Marek hastalığının patogenezi çok farklı ayırt edici özelliklere sahiptir (Venugopal, 2018). Lenfoma oluşuma yol açan MHV'nin neden olduğu enfeksiyonlarda 4 faz tanımlanmıştır: a) Erken sitolitik faz; b) Latent faz; c) İkinci sitolitik faz ve tüy follikül epitelinde sitolitik enfeksiyon; d) Transformasyon, B

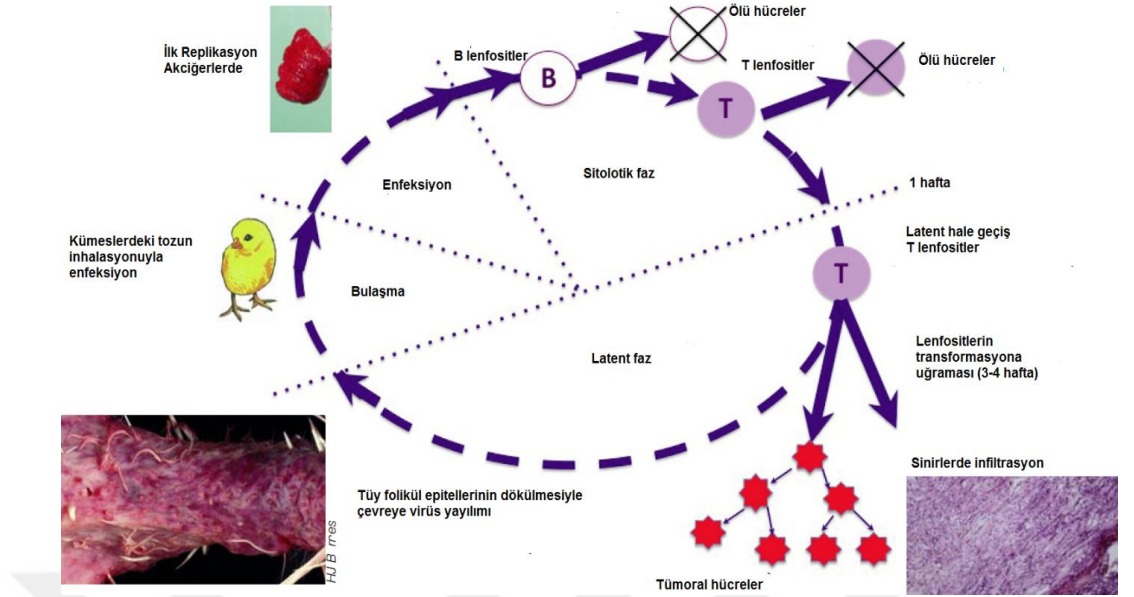
lenfomaların gelişimi (Schat ve Nair, 2013). Ardışık sıralanmalarına rağmen bu aşamaların birbirinden ayrı oluşması zorunlu değildir. İlk iki faz birbirinden keskin çizgilerle ayrılırken, latent ve transformasyon fazlarının her ikisi farklı hücre popülasyonlarında sitolitik enfeksiyonlarla karışık halde var olabilirler ve lenfomalar daha sonraki aşamada gerçekleşir (Calnek, 2001).

Serotip 1 (MHV), solunum yoluyla vücuda girmektedir. Virüs, ilk olarak solunum yollarındaki epitel hücrelerinde çoğalmaya başlar, akciğerlerde replikasyona uğrar, akciğerlerden makrofajlar yardımıyla bursa fabricus, timus ve dalak gibi lenfoid dokulara geçer (Nair, 2005). Makrofajların olaya dahil olmasıyla hücre bağımlı viremi gerçekleşmeye başlar (Nair ve ark., 2008; Venugopal ve Payne, 1995; Witter ve Schat, 2003). Virusun hücreden hücreye transferinde viral interleukin-8 (IL-8) etkili olmaktadır (Cortes ve Cardone, 2004; Engel ve ark, 2012). Bu organlarda 3-6 gün sonra sitoliz meydana gelir ve böylece erken sitolitik enfeksiyon dönemi başlar (Schat, 1981; Venugopal ve Payne, 1995). Sitolitik enfeksiyondaki asıl hedefin B lenfositleri olduğu bildirilmesine rağmen T lenfositleri aktive olur ve immun reaksiyon sonucu enflamatuvar bir cevap şekillenir (Delecluse ve Hammerschmidt, 1993; Venugopal ve Payne 1995). Bu aşamada, timus ve bursa Fabricius'ta oluşan atrofi sonucu bağışıklığın baskılandığı immunsupresyonun olduğu belirtilmektedir (Payne ve Venopopal, 2000; Witter ve Schat, 2003). Sitolitik fazın sonuna yakın MHV enfekte lenfositler aracılığıyla tüy folikül epiteli (TFE)'ne taşınır ve ortalama 10 gün sonra virüs saçılımı başlar (Calnek ve ark., 1970; Nair, 2005).

Sitolitik aşamadan sonra, MHV enfekte lenfositlerde latent döneme girer. Bu evre bazen CD4+ T hücrelerinde bazende CD8+ T ve B lenfositlerde görülür (Morimura ve ark., 1995; Osterreider ve ark., 2006). Yaklaşık 6-7 günlerde gelişir. Latent evre boyunca T hücrelerinde apoptozis şekillenir (Morimura ve ark., 1995). Tümör oluşumu şekillenmez (Morimura ve ark., 1995; Osterreider ve ark., 2006). Hücrelerde virus bulunmasına rağmen virusla ilgili antijenler immunohistokimyasal boyamalarda görülmez. Nononkojenik serotiplerle enfeksiyonda da latent evrenin şekillendiği bildirilmiştir (Shek ve ark., 1982).

Latent evreden sonra hastalığın 2-3'üncü haftalarda geç sitolitik dönem başlar (Witter ve Schat, 2003). Bu evre, çalışmalarda çok detaylandırılmamıştır ve her zaman gerçekleşmez. Bu evrenin süresi ve gelişimi MHV'nin virülensine ve konağın genetik direncine bağlıdır (Schat ve Nair, 2013). Lenfoid organlar dahil böbrek, pankreas, bezli mide, TFE etkilenir ve bu organlarda mononükleer lenfositik hücre infiltrasyonları ve atrofi gözlenmektedir (Witter ve Schat, 2003). Kalıcı immunosupresyon bu evre de sitolitik enfeksiyonlarla eş zamanlı olarak meydana gelmektedir (Calnek, 2001).

Transformasyon evresi, serotip 1 ile oluşan enfeksiyonlarda oluşur (Miles, 2015). Bu evrede asıl hedef CD4+ ve CD8+ T lenfositlerdir (Burgess ve Davison, 2002; Schat ve ark., 1991). İç organlarda görülen lenfomaların %75'i T lenfosit kökenli iken, %15'inin B lenfosit kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Payne ve Rennie 1976; Rouse ve ark., 1973). Bu evrede lenfoid organlardaki (timus, dalak, bursa fabrikus) aktif T lenfositler dejenerasyona uğrarlar. B lenfositlerin dejenerasyonu sonucunda ise T lenfositlerin aktive olmasıyla B lenfositlerde bulunan olgunlaşmamış virus partiküllerine karşı gelişen immun yanıt sonucunda yardımcı T lenfositlerde transformasyon şekillenir (Baigent ve Davison, 2004; Keleş, 2007; Witter ve Schat, 2003; Yavuz, 2014). Transformasyon geçirmiş T hücreleri perifer sinirlerde, iç organlarda ve dokularda çoğalır ve bu durum tümör oluşumuna kadar devam eder (Calnek ve Witter, 1997). Şekil 1.6'da MH'nin patogenezi şematize edilmiştir.



Şekil 1.6. Marek hastalığının patogenezi aşamalarının şematik olarak gösterimi (Miles, 2015).

MHV enfeksiyonu öncesi embriyonal bursektomi (tüm B hücrelerinin çıkarılmış) yapılanlarda sitolitik enfeksiyonun oluşmadığı, latent enfeksiyon ve lenfoma oluşumunun meydana geldiği görülmüştür (Schat, 1981).

Nitrik oksit (NO)'ın, MHV replikasyonunun kontrolünde önemli bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (Jarosinski ve ark., 2002).

1.5. Marek Hastalığında Klinik Bulgular ve Lezyonlar

Serotip 1 (MHV) ile enfekte kümeslerde, genellikle hastalığın 4 klinik formunun olduğu görülmüştür ve her forma spesifik klinik semptomların değiştiği bildirilmiştir (Payne ve Venopal, 2000). Bunlar;

a) Hastalığın klasik veya sinirsel formu; çoğunlukla sinirlerde felçle karakterizedir (OIE, 2012). Klasik formunda, MH'nin en yaygın klinik bulgusu, bacaklar ve kanatların kısmen veya tamamen felce uğramasıdır. Karakteristik bulgu, bir veya daha fazla periferik sinirin büyümesidir. En çok etkilenenler vagus, brachiyal ve siyatik sinir pleksuslarıdır. Etkilenen sinirler çoğunlukla normal

kalınlıklarının iki veya üç katı büyür, normal, çapraz çizgili ve parlak görünümlüdürler. Ayrıca sinirler gri veya sarımsı görünebilir, bazen de ödemli olabilirler. Periferik sinirlerin genişlemesi ile bacaklar ve kanatlar felce uğrar, ancak sinir tutulumu bazen yetişkin kuşlarda görülmez (OIE, 2012).

Bacak sinirleri (*Nervus ischiadicus*) etkilenen tavuklar, paraliz nedeniyle “*fowl paralysis*” veya “*range paralysis*” diye adlandırılan Türkçe karşılığı “balerin oturuşu” olarak belirtilen Marek hastalığına spesifik, bir bacağı öne diğerini arkaya uzatırlar (Atılgan ve Yeşilada, 1971; Calnek ve Witter, 1972; Minbay, 2002; Witter ve Schat, 2003). Genellikle 2 ile 12 haftalık tavuklarda görülür (Payne ve Venopal, 2000).

İrise lenfositik infiltrasyonlar sonucu gözlerde körlük ve anomaliler meydana gelmekte bu durum “*gri göz*” olarak tanımlanmaktadır. Çoğunlukla, bu anomaliler 16-18 haftalık yetişkin tavuklarda görülmektedir (Ficken ve ark., 1991; OIE, 2017).

b) Akut formda visseral organlarda tipik lezyonlar görülür. MHV'nin suşuna bağlı olarak ovaryumlarda, karaciğerde, dalakta, böbreklerde, akciğerlerde, kalpte, proventrikulusta ve deride lenfomatöz lezyonlar şeklinde görülmektedir. MHV tarafından üretilen tümörler aynı zamanda avian leukosis virüsü ve retiküloendoteliosis virüsü gibi retroviral patojenler tarafından indüklenen tümörlere benzeyebilir ve bunlarla ayrımı da önemlidir (OIE, 2017).

c) Geçici felç formu; nadir görülen bir durumdur. Genellikle 5 ile 18 haftalık yaşlarda oluşur. Beyin iltihabı ile ani başlayan 24-48 saat sonra sonlanan geçici felç durumudur. Bazı durumlarda ölüme şekillenebilir (Payne ve Venopal, 2000).

d) Akut mortalite formu; hastalığın bu formu günümüzde görülmüştür. Bu forma çok yüksek virulent suşların neden olduğu düşünülmektedir. Etkilenen hayvanlarda lenfomaların başlangıcından önce ölüm meydana gelir. Etkilenen hayvanlarda bursa fabricius ve timus'un atrofisi karakteristiktir (Payne ve Venopal, 2000).

1.6. Marek Hastalığının Tanı Metotları

Etken varlığını belirleyen başlıca yöntemler; virüsün izolasyonu, viral DNA veya antijenlerin dokuda gösterilmesi ve antikorun saptanmasıdır (OIE, 2010; Schat ve Nair, 2013; Zelnik, 2004). İmmunohistokimyasal analiz amacıyla yapılan çeşitli çalışmalarda immunoperoksidaz ve immünofloresan testleri kullanılmıştır (Bulow ve Biggs, 1975; Gürel ve ark., 2003; Özbilgin ve ark., 2001). Günümüzde moleküler yöntemlerde (PCR, Real Time PCR v.b) teşhis için kullanılmaktadır (Afonso ve ark., 2001; Baca, 2002; Biarn'es ve ark., 2013; Baigent ve ark., 2011; Baigent ve ark., 2016; Davidson ve ark., 1995; Gimeno ve ark., 2014; Handberg ve ark., 2001; Islam ve ark., 2006; Silva ve Gimeno, 2007).

1.6.1. MHV İzolasyonu

Marek hastalığı virüsü (serotip 1) enfekte hayvanların dokularından izole edilebilmektedir (OIE, 2010). Hücreler, MHV ile enfekte olduklarında morfolojileri değişir bu değişim sitopatik etki (CPE) olarak adlandırılmaktadır. Serotip 1'in in-vitro kültürlenmesi ilk olarak Churchill ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Churchill ve Biggs, 1968). Genellikle dalak hücreleri, lenfoma süspansiyonları, heparinize kandan buffy coat hücreleri izolasyon için kaynak olarak kullanılır. MHV, genellikle genç civcivler, embriyolu yumurta, doku kültüründe üretilir ve test edilir. Tavuk böbrek hücreleri veya ördek embriyo fibroblastları hücre kültürleri yeni suşların izolasyonu ve çoğaltılması en iyi seçeneklerdir. Enfekte inokulumun hücre kültürüne aktarımından 3-5 gün sonra plak olarak adlandırılan CPE'nin ortaya çıktığı ama yaklaşık 7-10 gün içerisinde bu plakların sayılabildiği bildirilmektedir (OIE, 2017). Virüs izolasyonu sırasında oluşan CPE etkileri, bazen kontaminasyon veya besin eksikliğinden de olabilir ve hücre kültürünün değerlendirilmesi uzmanlık gerektirmektedir (OIE, 2017).

1.6.2. Serolojik Testler

Yaklaşık 4 haftalık yaştaki tavuklarda MHV antikorlarının varlığının tespiti enfeksiyonun göstergesi olarak kabul edilebilmektedir. Bu yaştan önce, bu tür antikorlar, yumurta sarısı aracılığıyla antikorun maternal geçişini temsil edebilmekte ve aktif bir enfeksiyonun kanıtı olarak değerlendirilememektedir (OIE, 2017).

Aşı virüs suşları ve onkojenik MHV'lerinin (serotip1) glikoproteinleri arasında ortak antijenik determinantların varlığı sebebiyle konvensiyonel serolojik metodlar kullanılarak belirlenen antikorların gösterimiyle enfeksiyonunun kaynağının aşı veya saha tipi suşlardan hangisinden kaynaklandığının ayırımı yapılamamaktadır. Bir enfeksiyonda restriksiyon endonükleaz, in situ hibridizasyon analizleri ve serolojik analizlerle serotip ayırımı yapılabilse de, saha (patojenik) serotip 1 ve aşı olarak kullanılan antenüe serotip 1'in ayırımını yapılamamaktadır (Endoh ve ark., 1994; Fadly ve ark., 1996; Fan ve ark., 1995; Garcia ve ark., 1996). MH'nin tanısında serolojik olarak ELISA, Agar Jel İmmundifüzyon, Direkt ve İndirekt Florasan Antikor gibi testler kullanılmaktadır (Kutsal, 1989; OIE, 2017; Powell ve Payne, 1993).

1.6.3. Histopatolojik Yöntemler

Marek hastalığının teşhisinde hastalığın belirlendiği zamanlardan günümüze kadar klinik makroskopik ve histopatolojik bulgular yanısıra immunohistokimyasal (immunoperoksidaz ve immunoflorasan testi) testler tanı için oldukça fazla bir şekilde kullanılmıştır (Biggs ve Payne, 1967; Bulow ve Biggs, 1975; Çiftçi ve ark., 2011; Fujimoto ve ark., 1971; Gürel ve ark., 2003; Helmboldt, 1972; Keleş, 2007; Özbilgin ve ark., 2001; Sevoian ve Chamberlain, 1964; Yavuz, 2014). Halen "altın standart" test olarak kullanılmasına rağmen zaman alıcı ve uzmanlık gerektiren bir metottur (Woniakowski ve Niczyporuk, 2016).

MH'de deride, kaslarda, gonadlarda, visseral organlarda, iriste ve periferik sinirlerde mononuklear infiltrasyon görülür (Schat ve Nair, 2013). Teşhis amaçlı ölü hayvanların infiltrasyon görülen bu organlarından yararlanılmaktadır. Histopatoloji de MH lenfomaları içinde heterojen lenfoid hücre popülasyonlarının Hematoksilen Eosin boyalı kesitlerde veya lenfomalardan yapılan sürme preparatların May-Grünwald-Giemsa boyanmasıyla gözlenmektedir. MH kaynaklı lenfomalarda, B hücrelerinde T hücreleri antijenlerinin (MATSA: MD tumor Associated Surface Antigen) varlığı saptanmıştır (Çarlı, 2018).

Periferik sinirlerde A ve B tipi diye adlandırılan iki tip lenfotropik lezyon görülmektedir. Tip A lezyonlar neoplastiktir ve çoğunlukla CD30+ ve CD4+ T hücreleri bulunur. B tipinde inflamasyon ve ödem görülür (Burgess ve ark., 2001; Payne, 2004; Witter ve Schat, 2003). Bazı vakalarda ise ödem fazla olmamakla birlikte Schwann hücre ve fibroblast sayısında artış gözlenir. Makrofajlara da rastlanmaktadır (Payne ve Biggs, 1967).

1.6.4. Moleküler Teknikler

Aşılamanın etkinliğini veya kanatlı kümeslerinde farklı suşların varlığını saptamada serolojik teknikler yeterli değildir. Bu nedenle gerekli viral tespiti ve nicelendirmesini sağlayan diğer yöntemler kullanılmalıdır.

Moleküler testler, Mardivirüs'lerin tüy ve kan örneklerinde saptamasını sağlar ve serotiplerin ayırımı mümkün kılar (Baigent ve ark., 2011; Biarn'es ve ark., 2013) hatta serotip 1 suşlarının patotipini tespit edilebilmesini sağlayabilmektedir (Becker ve ark., 1992; Davidson ve Borenshtain, 2003). Bu moleküler teknikler arasında kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu teknikleri (qPCR), GaHV-2 (Baigent ve ark., 2005), GaHV-3 (Renz ve ark., 2006) ve MeHV-1'nin (Islam ve ark., 2006) mutlak miktar ölçümü için oldukça hassas bir testtir. Bu teknik aracılığıyla serotipe göre hücre başına düşen viral genomların ortalama sayısını belirlemek mümkündür.

Konvansiyonel PCR gibi tekniklerle ancak üç serotipin ayrımı ve varlığı belirlenebilir (Becker ve ark., 1992).

Zhu ve ark. (1992), yaptıkları deneysel çalışmalarında onkojenik suşla enfekte ettikleri hayvanların doku örneklerinden elde ettikleri DNA'larda hedef bölgenin 2-3 kopyasını elde ederken nonkojenik suşlarla enfekte ettikleri hayvanların DNA'larında ise hedef bölgenin çok fazla sayıda kopyalarını elde etmişlerdir.

Marek virusunun onkojeniteden sorumlu gen bölgesi moleküler yöntemlerle saptanabilmekte ve onkojenik ve nonkojenik serotipler birbirinden ayırt edilebilmektedir (Afonso ve ark., 2001; Lee ve ark., 2000; Silva, 1992; Zhu ve ark., 1992). Onkojenik MHV suşlarında hedef bölgenin 1-3 kopyası belirlenirken, aşı suşu olarak kullanılan viruslarda ise 4-9 kopya saptanmaktadır (Davidson ve ark., 1995).

1.7. Marek Hastalığında Koruma ve Kontrol Stratejileri

Marek Hastalığını önlemek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Aşılama, günümüzde ve yakın gelecekte, MH'nin önlenmesi ve kontrolü için esas stratejiyi temsil etmektedir. MH kontrolünde etkili aşılarda geliştirilmesi (Churchill ve ark., 1969; Nair ve Kung, 2004; Rispens ve ark., 1972) önemli bir başarıdır. Bununla birlikte, genetik direnç ve biyogüvenlik, doğru bir şekilde uygulanan aşılama prosedürlerinin önemli destekleridir (Miles, 2015).

1.7.1. Genetik Direnç

Tavukların MH duyarlılıkları doğuştan sahip oldukları özelliklere göre değişmektedir. Duyarlılıktaki değişime sebep olan genlerin tespiti yapılarak hastalığa dayanıklı hatların geliştirilmesi için çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalara örnek olarak 1935'te Hutt ve Cole'un yaptıkları çalışma verilebilir (Hutt ve Cole, 1947). MH'ya karşı dirençle ilişkili major histocompatibility complex (MHC) genleri,

tarafından kodlandığı tespit edilmiştir (Kaufman ve ark., 1999). Bu genlerin temelinde üç MHC lokusu bulunduğu saptanmıştır. Bunlar, B-F (class I), B-L (class II) ve B-G (class IV)'dir (Briles ve ark., 1983). Son çalışmalarda MHC olmayan (non-MHC) MH'ya karşı dayanıklılıkla ilişkili Rfp-Y olarak bilinen yeni bir bölge daha tanımlanmıştır (Lakshmanan ve ark., 1998).

1.7.2. Aşılama

Marek hastalığına karşı aşı ilk olarak Churchill ve ark. tarafından 1969'da hastalığın tanımından kısa bir süre sonra geliştirmiştir. Marek hastalığında koruma sağlamak için bir günlükken veya in-ovo aşılama ile yapılmaktadır (Powell, 1975; Rispens, 1972). Hem tek başına hem de çeşitli kombinasyonlarda farklı MH aşıları ortak kullanılmaktadır.

MH'ye karşı kullanılmak üzere üç tip aşı geliştirilmiştir. Bunlardan birincisi hindi herpes virüsü (HVT), 1970'lerde üretilmiştir. Yetmişlerin başında kanatlı kümeslerindeki mortalite ve morbiditenin sorumlusu olarak görülen MHV'ye karşı kümeslerde büyük ölçüde HVT aşılama yapılarak hastalığın yayılışı önlenmiştir (Pastoret, 2004). MHV suşlarının daha yüksek virülansa doğru sürekli evrimi aşı etkinliğinde eş zamanlı bir azalmaya sebep olduğundan daha etkili aşılar ihtiyacı duyulmuştur (Osterrieder ve ark., 2006; Witter, 1997). Bu yüzden ikinci olarak bivalan aşılar (HVT+serotip 2) kullanılmıştır. Son olarak CVI988 (Rispens) anttenüe serotip 1 (MHV) aşısı geliştirilmiştir (Gimeno ve ark., 2014). Yüksek virulans suşlara karşı üstün koruma sağlayan CVI988/Rispens tüm dünyada kullanılmaktadır.

Ülkemizde, Tarım ve Orman Bakanlığından ruhsatlı aşılar, (Vectormune HVT NDV Rispens, Cevac MD HVT Rispens, Innovax ND HVT, Nobilis Rismavac (CVI988) + CA (HVT) 126, Marek's Disease Vaccine Serotip 3, Marek's Disease Vaccine Serotip 1 ve 3, Poulvac Marek CVI, Poulvac Marek CVI + HVT) Marek hastalığıyla mücadelede aşılamada kullanılmaktadır. Ülkemizdeki yumurtacı sürüler Marek aşıları ile kuluçkahanede bir günlük civcivken aşılanmaktadır.

Aşılanmanın yapılmadığı durumlarda mortalite %25-30, bazen de %60 gibi oranlara ulaştığı, aşılama ile %5'ten daha aşağıya düştüğü bildirilmiştir (Calnek ve Witter, 1997; Meydan, 2012; Witter ve Schat, 2003). Ama yine de MH salgınları, tamamen engellenememektedir.

Marek aşı suşları, tümörlere ve mortaliteye karşı oldukça etkili koruma, yaşam boyu bağışıklık kazandırma ve kalıcı enfeksiyonları önleme de etkilidir. Fakat aşı; virülen virüsleri, süperenfeksiyonları, replikasyonu ve yayılımını tamamen önleyememektedir (Davison ve Nair, 2005; Gimeno, 2008), bu nedenle tavuklar hem aşı hem de öldürücü MHV suşlarıyla potansiyel olarak enfekte olabilirler. Onkojenik virüsle (serotip 1) aşı virüsü ayrımı yapmak aşının koruyuculuğunun değerlendirilmesi ve hastalığın tanısının yapılması için önemlidir (Gimeno ve ark., 2014).

Aynı tavukta aşı ve virülen virüsü tespit etme ve ölçme ve aralarındaki farkı ayırt etme, etkili koruma sağlamak ve izlemek için önemlidir. Aşı virüsünün etkili yönetiminin ve replikasyonunun doğrulamasının yapılması ve zayıf aşı alımının nedenlerinin tanımlanması için gereklidir. Ayrıca bir küme virulent virüsün varlığının veya yokluğunun tespiti, küme ve çevresindeki hayvanlarda Marek'in görülme sıklığının saptanmasına yardımcı olur (Baigent ve ark., 2016).

Tavuklar HVT ile aşılanmışsa, gerçek zamanlı kantitatif PCR testi ile virülen MHV-1 suşlarından, aralarındaki genetik farklılıktan dolayı kolayca ayrımı yapılabilmektedir. Fakat tavuklar CVI988/Rispens aşısı ile aşılanmışsa, farkı söylemek çok zordur. Çünkü aşı suşu genetik olarak virülen MHV-1'e %98 benzerlik göstermektedir (Spatz ve ark., 2007).

Bu tez çalışmasında amacımız, Marek hastalığının teşhisi ile MHV-1 ve CVI988 aşı suşunun farkının, bir diğer aşı suşu olan HVT'nin ayrımının, dünyada ilk defa çoklu-qPCR'la eş zamanlı olarak gerçekleştirilecek bir yöntem geliştirmektir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Klinik Örnekler

Bu tez çalışmasında, Çizelge 2.1.1.'de gösterilen illerde bulunan ticari yumurtacı ve ev tipi toplam 16 işletmeden, Marek şüpheli olarak ölmüş 100 adet tavuktan toplanan dalak örnekleri tasarlanan teşhis metodunun verifikasyonu amacıyla kullanıldı. Ayrıca dalak örneklerinin toplandığı 100 adet tavuğun her birinden toplanan bezli mide ve *Nervus ischiadicus* örnekleri Marek yönünden histopatolojik olarak test edildi. Ankara'da bulunan bir işletme dışındaki diğer bütün işletmelerden toplanan örnekler Marek aşılı ile aşılanmış sürülerden elde edildi. Toplanan doku ve organ örnekleri çalışmaya kadar -80°C saklandı. Toplanan örneklere ilişkin bilgiler Çizelge 2.1.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1.1. Çalışmada kullanılan örneklerin toplandığı iller, üretim tipi, örneklerin türü, sayıları ve sürülerin aşı durumları.

Numune No	Üretim Tipi	İl	Aşı Durumu	Alınan organ		
				Dalak	Bezli mide	<i>N. ischiadicus</i>
1	Ticari Yumurtacı	Kastamonu	Aşılı	15	15	15
2	Ticari Yumurtacı	Çorum	Aşılı	10	10	10
3	Ticari Yumurtacı	Ankara	Aşılı	5	5	5
4	Ticari Yumurtacı	Ankara	Aşılı	5	5	5
5	Ticari Yumurtacı	Kırıkkale	Aşılı	5	5	5
6	Ticari Yumurtacı	Karabük	Aşılı	5	5	5
7	Ticari Yumurtacı	Ankara	Aşılı	5	5	5
8	Ticari Yumurtacı	Çankırı	Aşılı	5	5	5
9	Ticari Yumurtacı	Ankara	Aşısız	10	10	10
10	Ev Tipi Yumurtacı	Ankara	Aşısız	5	5	5
11	Ticari Yumurtacı	Ankara	Aşılı	5	5	5
12	Ev Tipi Yumurtacı	Ankara	Aşılı	5	5	5
13	Ev Tipi Yumurtacı	Ankara	Aşılı	5	5	5
14	Ev Tipi Yumurtacı	Kırıkkale	Aşılı	5	5	5
15	Ev Tipi Yumurtacı	Yozgat	Aşılı	5	5	5
16	Ev Tipi Yumurtacı	Nevşehir	Aşılı	5	5	5
TOPLAM				100	100	100

2.1.2. Kullanılan Referans Suşlar

2.1.2.1. Onkojenik Serotip 1 Suşu

Tez çalışmasında, Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı'na Marek hastalığı şüphesi ile gelmiş hayvanların doku örneklerinden yapılan histopatolojik muayene ile Marek pozitif ve DNA dizi analizi sonucu ise onkojenik serotip 1 olduğu tespit edilen VKME17-M01 no'lu suş kullanıldı.

2.1.2.2. Serotip 1 CVI988 Suşu ve Serotip 3 HVT Suşu

Tez çalışmasında, MH Serotip 1 grubuna ait CVI988 referans suşu olarak, sadece attenüe CVI988 suşunu içeren Poulvac Marek CVI ve hem CVI988 hem de HVT attenüe suşlarını içeren Nobilis Rismavac+CA 126 aşıları pozitif kontrol olarak tüm testlerde kullanıldı. HVT referans suşu olarak ise HVT attenüe suşunu içeren Innovax ND HVT aşısı kullanıldı. Bahsi geçen aşılar İnervet ve Ceva firmalarından temin edildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Histopatolojik Yöntem

Histopatolojik inceleme için 100 adet *Nervus ishiadicus* ve 100 adet bezli mideden alınan örnekler, %10'luk tamponlu formalin solusyonunda tespit edildi. Formalin tespitindeki doku örnekleri 5 mm kalınlıkta ve uygun büyüklüklerde küçültülerek doku takip kasetlerine alındı. 12 saat akan suda yıkandı. Daha sonra doku takip cihazında (Leica TP 1020) sırasıyla %70, %80, %90, %96 ve absolut alkollerden sonra ksilol, ksilollü parafin, yumuşak parafin ve sert parafinde gerekli

sürelerde tutularak dokular tespit edildi ve parafin ile bloklandı. Hazırlanan parafin blokları 5 µm kalınlığında kesit alınarak hematoxilen-eozin (HE) ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekildi.

2.2.2. Primer ve Prob Tasarımı

Bu çalışmada virulent MHV-1 ve CVI988 ayırımı için pp38 geninin 320'nci bazında bulunan tek nükleotid polimorfizmi hedeflendi. HVT tespiti için ise sadece HVT genomunda bulunan, MHV-1 ve MHV-2 genomunda bulunmayan HVT070 genine ait dizi (Afonso ve ark., 2001) seçildi. İnternal kontrol amacıyla tavuk GAPDH geni hedef olarak kullanıldı. Hedef ve hedef olmayan DNA dizileri NCBI GenBank'tan elde edilerek Clustal Omega yazılımı ile hizalandı. Hizalanmış dizilerin, hedefler içinde korunmuş fakat hedef dışılarda farklı bölgeleri belirlenerek bu bölgelere spesifik oligo setleri manuel olarak tasarlandı. Tasarımda Dorak (2007), tarafından tanımlanan ilkeler temel alındı. Virulent MHV-1 tespiti için tasarlanan problemler FAM, internal kontrol problemleri HEX, HVT problemleri ROX ve CVI988 problemleri CY5 boyaları ile 5' ucundan, BHQ1 boyası ile ise 3' ucundan işaretlenerek kullanıldı. Tasarlanan oligo setlerinin, şu ana kadar tanımlanmış ve nükleik asit veri bankalarına girmiş tüm DNA dizilerinden hangilerini çoğalttığı, Primer Blast ile in-siliko test edildi. Tasarlanan primer ve prob setlerine ait diziler Çizelge 2.2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2.2.Çalışmada kullanılan primer, prob dizileri ve özellikleri.

Hedef	Oligo Sekansı	Ürün büyüklüğü	Bağlanma Sıcaklığı	Referans
MHV1 Onkogenik (Forward)	5'- GAGGGAGAGTGGCTGTCAAA-3'	188 bp	61.45°C	Gimeno ve ark., 2014
MHV1 Onkogenik (Reverse)	5'- TCCGCATATGTTCTCCTTC -3'	188 bp	60.04°C	Gimeno ve ark., 2014
MHV1 Onkogenik (prob)	5'- FAM-CCCCGGAGGTCAGGGAATGA-(BHQ1)-3'	188 bp	68.78°C	Bu çalışmada tasarlandı
CVI988 Spesifik (Forward)	5'-GAGCTAACCGGAGAGGGAGA-3'	99 bp	60.86°C	Baigent ve ark., 2016
CVI988 Spesifik (Reverse)	5'-CGCATACCGACTTTCGTCAA-3'	99 bp	62.12°C	Baigent ve ark., 2016
CVI988 Spesifik (prob)	5'-Cy5-CCCACCGTGACAGCC-(BHQ2)-3'	99 bp	57.76°C	Baigent ve ark., 2016
HVT (Forward)	5'-CACCAGCAATACGACGACG-3'	345 bp	61.30°C	Bu çalışmada tasarlandı
HVT (Reverse)	5'-AATGGACTTCCGTTGACGAC-3'	345 bp	59.97°C	Bu çalışmada tasarlandı
HVT (prob)	5'-ROX-GTAATTCGGCGGTGGGAGCG-(BHQ2)-3'	345 bp	68.98°C	Bu çalışmada tasarlandı
Tavuk GAPDH (Forward)	5'-GGAGTCAACGGATTTGGCC-3'	63 bp	62.75°C	Gimeno ve ark., 2014
Tavuk GAPDH (Reverse)	5'-TTTGCCAGAGAGGACGGC-3'	63 bp	62.50°C	Gimeno ve ark., 2014
Tavuk GAPDH (prob)	5'-HEX-TATTGGCCGCCTGGTCACCA-(BHQ1)-3'	63 bp	69.00°C	Bu çalışmada tasarlandı

2.2.3. Viral DNA İzolasyonu

Viral DNA ekstraksiyonu ticari kit ile ekstraksiyon robotunda gerçekleştirildi. Bu amaçla, 100 adet tavuktan alınan 100'er mg dalak örneği 5'erli gruplara ayrılarak, 20 adet tüpte (Magna Lyser Green Beads) havuzlandı. Her tüpe, 1000 µl 100 mM Tris-HCl (pH8.0) transfer edilerek ve içinde seramik boncukların bulunduğu tüpler, 3000 rpm'de Magna Lyser (Roshe, Germany) cihazında homojenize edildi. Elde edilen homojenattan 400 µl alınarak Qiagen EZ1 Virus Mini Kit v2.0 ekstraksiyon kiti ve EZ1 Advanced XL izolasyon robotu kullanılarak kit protokolüne göre viral DNA ekstrakte edildi. Aşı suşlarına ait viral DNA'lar ise çözdürüldükten sonra direkt Qiagen EZ1 Virus Mini Kit v2.0 ekstraksiyon kiti ve EZ1 Advanced XL izolasyon robotunda, kit protokolüne göre ekstrakte edildi. Elde edilen viral DNA ekstraktları kullanılıncaya kadar -20°C saklandı.

2.2.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Çoklu PCR (qPCR)

Bu çalışmada, qPCR reaksiyonları; 20 µl hacimlerde 4 µl kalıp DNA, 6 mg/ml BSA, 20 mg/ml PEG 400, %0,25 Tween 20, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix, 0,1U Hot-Start DNA Polimeraz ve her bir primerden 500 nM içerecek şekilde hazırlandı. Tüm primerlere özgü bağlanma sıcaklığı, gradient PCR ile 60°C olarak belirlendi. Çoklu qPCR amplifikasyon koşulları, 95°C'de 180 sn 1 döngü; 95°C'de 10 sn 45 döngü, bağlanma sıcaklığı 60°C'de 50 sn olarak belirlendi. Onkogenik MHV-1 pp38 geni hedefli (FAM boyası işaretli), CVI988 aşı suşu hedefli (CY5 boyası işaretli), HVT FC126 hedefli (ROX boyası işaretli), internal kontrol GAPDH hedefli (HEX boyası işaretli) floresan okuma profili Rotor-Gene Q (Qiaqen, Almanya) cihazında gerçekleştirildi. Şekli sigmoidal olan ve eşik döngü sayısı 40'ın altında olan reaksiyonlar pozitif olarak değerlendirildi.

Test değerlendirilirken HEX kanalında internal kontrolün pozitif olması beklendi, ardından FAM kanalında MHV-1, CY5 kanalında CVI988 ve ROX kanalında HVT için de çoğalma eğrileri incelendi.Tavuk GADPH hedefli oligolardan elde edilen sonuç inhibisyon ve reaktif kontrolü amaçlı kullanıldı. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde *treshold* (ct) değeri 0,05 olarak ayarlandı. Yapılan her çoklu qPCR çalışmasında her hedef için bir adet pozitif, bir adet de negatif kontrol kullanıldı. Test sonuçlarının değerlendirilmesi Çizelge 2.2.4.'de gösterilmiştir.



Çizelge 2.2.4. Çoklu qPCR sonuçlarının değerlendirme tablosu.

Onkojenik serotip-1 qPCR				CVI988 QPCR				HVT qPCR				Negatif Kontrol qPCR				Pozitif Kontrol qPCR				Sonuç
FAM	CY5	ROX	HEX	FAM	CY5	ROX	HEX	FAM	CY5	ROX	HEX	FAM	CY5	ROX	HEX	FAM	CY5	ROX	HEX	
P	N	N	P	-	-	-	-	-	-	-	-	N	N	N	P	P	N	N	P	Serotip-1 pozitif
-	-	-	-	P ct > CY5 ct	P ct > ct FAM	N	P	-	-	-	-	N	N	N	P	P	P	N	P	CVI988 pozitif, MHV-1 negatif
-	-	-	-	P ct < CY5 ct	P ct > ct FAM	N	P	-	-	-	-	N	N	N	P	P	P	N	P	Sürü CVI988 ile aşılı ve MHV-1 pozitif
-	-	-	-	-	-	-	-	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	P	P	HVT pozitif

N:negatif, P:pozitif

2.2.5. Çoklu qPCR Metodunun Optimizasyonu

Marek Serotip 1 grubuna ait CVI988 referans suşu olarak, sadece attenüe CVI988 suşunu içeren Poulvac Marek CVI ve hem CVI988 hem de HVT attenüe suşlarını içeren Nobilis Rismavac+CA 126 aşıları, HVT referans suşu olarak ise HVT attenüe suşunu içeren Innovax ND HVT aşısı ve onkojenik serotip 1 olarak VKME17-M01 no'lu suş duyarlılık çalışmalarında kullanıldı. Tasarlanan metodun duyarlılığını belirlemek için tüm pozitif kontrol suşlarının, ilk tüpte 100 ng/μL DNA olacak şekilde 10 katlı dilüsyonları hazırlanarak her bir dilüsyondan çoklu qPCR yapıldı.

Hedef dışı olarak ise Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Kanatlı Hayvan Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı suş koleksiyonunda yer alan IBV (İnfeksiyöz Bronşitis Virüs), NDV (Newcastle Disease Virüs), ILT (İnfeksiyöz Laringotracheitis Virüs), IBDV (Gumboro), *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Pasteurella multocida*, *Avibacterium paragallinarum*, *Salmonella Enteritidis* ve *Escherichia coli* suşlarına ait DNA/RNA'lar kullanıldı.

2.2.6. Çoklu qPCR Metodunun Saha Örnekleri ile Değerlendirilmesi

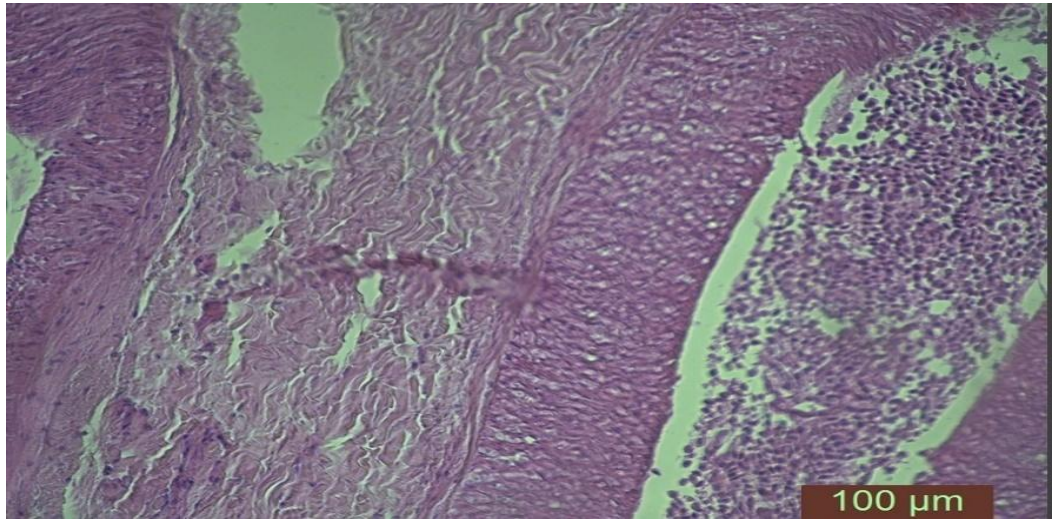
Klinik örnek olarak toplanan ve Marek teşhisinde “gold standart” yöntem olarak kabul edilen histopatolojik yöntem ile değerlendirilen örnekler çoklu qPCR metodunun validasyonu amacıyla kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1. Histopatolojik Bulgular

3.1.1. Bezli Mide

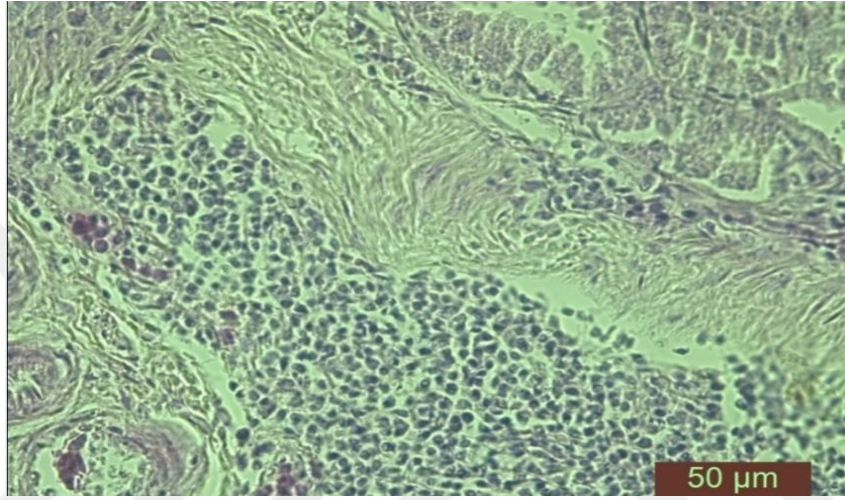
Nekropsi sonrası hayvanlardan alınan 100 adet organ örneklerinden 63 adedinde özellikle submukoza katmanındaki bezler arasında daha sık olmakla birlikte, bazen bezsel yapıların yerini alacak kadar geniş alanlara yayılma göstermiş olup lenfositler, atipik lenfoblastlar ve tek tük plazma hücreleri dikkati çekti (Şekil 3.1.1.). Submukozadaki lenfoid folliküllerde hücresel artış ve sıklıkla da tümöral hücrelerin mukoza içerisine ve daha aşağıdaki bez lobüllerinin arasına doğru uzandığı gözlemlendi. Yüzey epitelleri arasında submukozada diffuz, bezler arasında fokal yerleşimli küçük lenfositler, atipik lenfoblastlar ve makrofajlar seçildi.



Şekil 3.1.1. Bezli mide de anizomorfizm ve plemorfizm özellik gösteren lenfosit ve lenfoblast hücre infiltrasyonu, HE.

3.1.2. *Nervus ischiadicus*

Nekropsi sonrası hayvanlardan alınan 100 adet sinir örneklerinden 37'sinde, sinir lifleri arasında değişen yoğunlukta küçük ve orta boy lenfositler, lenfoblastlar, tek tük makrofaj ve plazma hücreleri ile oldukça büyük, veziküler sitoplazmalı, koyu bazofilik çekirdekli MH hücreleri gözlendi (Şekil 3.1.2).

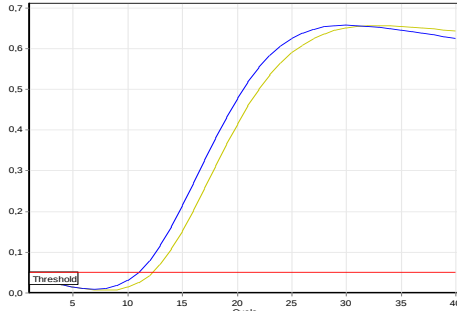


Şekil 3.1.2. *N. ischiadicus* anizomorfizm ve plemorfizm özellik gösteren lenfosit ve lenfoblast hücre infiltrasyonu, HE.

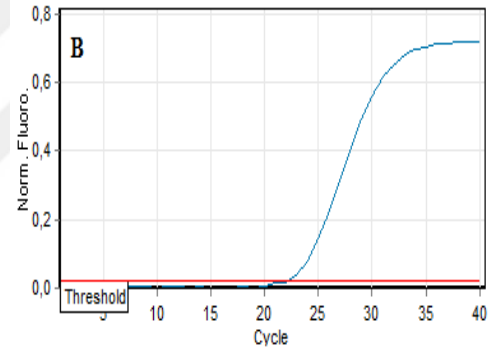
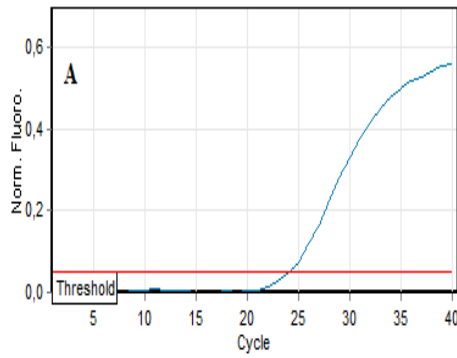
3.2. Çoklu qPCR Metodunun Referans Suşlarla Amplikasyon Sonuçları

Çoklu qPCR çalışması eş zamanlı, referans suşlar olan; CVI988 aşısı, HVT aşısı, onkojenik serotip-1 (VKME17-M01)'e ait viral DNA'lar ile tavuk GAPDH DNA'sı, kullanılarak bir tüp içerisinde gerçekleştirildi. Onkojenik Serotip 1 spesifik qPCR çalışmasının FAM kanalı sonuçlarında referans suş olan serotip-1 (VKME17-M01) viral DNA'sında çoğalma eğrileri görülürken (Şekil 3.2.1), CY5 ve ROX kanalında çoğalma eğrilerine rastlanmadı. CVI988 aşısı viral DNA'sıyla yapılan çoklu qPCR çalışmasında ise hem onkojenik serotip 1 hedefi olan FAM kanalında hemde kendi spesifik kanalı olan CY5'te çoğalma eğrileri görüldü (Şekil 3.2.2). Ancak çoğalma eğrileri CY5'te daha önde görüldü. CVI988 viral DNA'sı HVT spesifik ROX kanalında amplikasyon göstermedi, çoğalma eğrisine rastlanılmadı. HVT aşısı

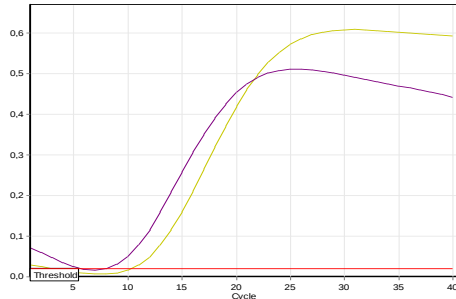
viral DNA'sıyla çoklu qPCR çalışmasında ise FAM ve CY5 kanal hedeflerinde çoğalma eğrileri göstermedi ve HVT'e spesifik özgül sonuçlar elde edildi (Şekil 3.2.3). Tavuk GADPH DNA'sı tüm hedeflerde beklenildiği gibi çoğalma eğrisi gösterdi ve sonucun pozitif olmasıyla reaksiyonda inhibisyon olmadığı görüldü.



Şekil 3.2.1. Onkogenik Serotip 1 (VKME17-M01) hedefi sonuçlar.



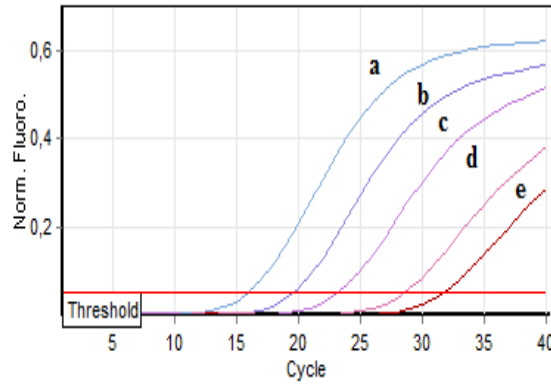
Şekil 3.2.2. CVI988 aşı suşu sonuçları. A) CVI988 aşı suşu (FAM) sonuçları, B) CVI988 aşı suşu (CY5) sonuçları.



Şekil 3.2.3. HVT aşı suşu sonuçları [Rismavac+HVT (sarı) ve İnnovac HVT (kırmızı)].

3.3. Çoklu qPCR Metodunun Optimizasyonu

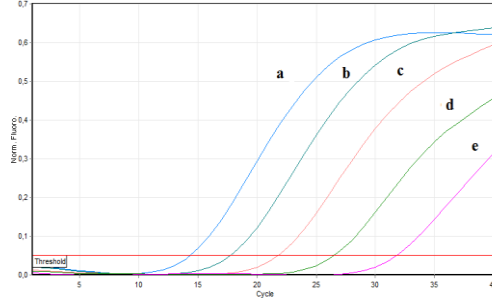
Geliştirilen çoklu qPCR metodunun optimizasyonu için her bir hedef için pozitif kontrollerin 10 katlı sulandırılmaları ve hedef dışı organizmalar kullanıldı. Hedef organizmalardan onkojenik serotip-1 VKME17-M01; HVT ve CVI988 için Rismavac+CA126; yalnızca CVI988 için Poulvac Marek CVI ve HVT için İnnovac HVT aşı suşlarının 10 katlı sulandırılmalarına ait qPCR sonuçları farklı kanallarda olmak üzere grafikleri Şekil 3.3.1., Şekil 3.3.2., Şekil 3.3.3., Şekil 3.3.4., Şekil 3.3.5., Şekil 3.3.6. ve Şekil 3.3.7.'de; ct değerleri ve DNA konsantrasyonları ise Çizelge 3.3.1., Çizelge 3.3.2., Çizelge 3.3.3., Çizelge 3.3.4., Çizelge 3.3.5., Çizelge 3.3.6. ve Çizelge 3.3.7.'de gösterilmiştir. Viral DNA konsantrasyonlarındaki azalmayla birlikte qPCR sonucu elde edilen ct değerlerinde de kademeli olarak azalma görüldü. Yapılan analizler, 10 tekrarlı çalışılmış olup hepsinde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu da geliştirilen yöntemin uygun tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.3.1. FAM kanalında test edilen onkojenik MHV-1 (VKME17-M01) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu qPCR ile elde edilen ct grafiği.

Çizelge 3.3.1. Onkojenik MHV-1 (VKME17-M01) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu elde edilen ct değerleri ve DNA konsantrasyonları.

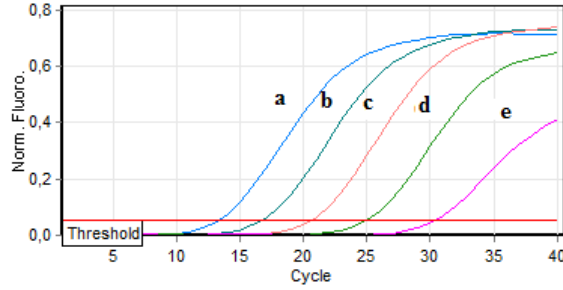
Eğriler	Sulandırma oranları	ct değeri	DNA Konsantrasyonu
A	10^{-1}	16,02	261,4 ng/μl
B	10^{-2}	19,6	26,14 ng/μl
C	10^{-3}	23,26	2,61 ng/μl
D	10^{-4}	28,57	0,26 ng/μl
E	10^{-5}	31,78	0,02 ng/μl
F	Negatif kontrol	0	



Şekil 3.3.2. FAM kanalında test edilen CVI 988+HVT (Rismavac+CA 126) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu qPCR ile elde edilen ct grafiği.

Çizelge 3.3.2 CVI 988+HVT (Rismavac+CA 126) aşısı suşunun 10 katlı sulandırma sonucu elde edilen ct değerleri ve DNA konsantrasyonları.

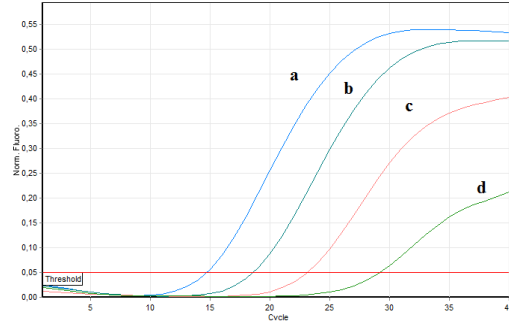
Eğriler	Sulandırma oranları	Ct değeri	DNA Konsantrasyonu
A	10^{-1}	14,33	152,6 ng/μl
B	10^{-2}	17,77	15,27 ng/μl
C	10^{-3}	21,8	1,52 ng/μl
D	10^{-4}	26,53	0,15 ng/μl
E	10^{-5}	31,8	0,015 ng/μl
F	Negatif kontrol	0	



Şekil 3.3.3. CY5 kanalında test edilen CVI988+HVT (Rismavac+CA 126) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu qPCR ile elde edilen ct grafiği.

Çizelge 3.3.3. CVI 988+HVT (Rismavac+CA 126) aşı suşunun 10 katlı sulandırma sonucu elde edilen ct değerleri ve DNA konsantrasyonları.

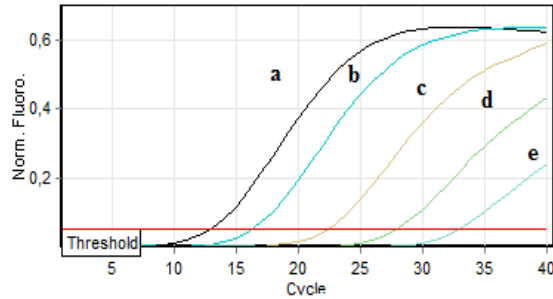
Eğriler	Sulandırma oranları	Ct değeri	DNA Konsantrasyonu
A	10^{-1}	13,22	152,6 ng/μl
B	10^{-2}	16,67	15,27 ng/μl
C	10^{-3}	20,58	1,52 ng/μl
D	10^{-4}	24,89	0,15 ng/μl
E	10^{-5}	30,35	0,015 ng/μl
F	Negatif kontrol	0	



Şekil 3.3.4 ROX kanalında test edilen CVI988+HVT (Rismavac+CA 126) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu qPCR ile elde edilen ct grafiği.

Çizelge 3.3.4. ROX kanalında test edilen CVI988+HVT (Rismavac+CA 126) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu elde edilen ct değerleri ve DNA konsantrasyonları.

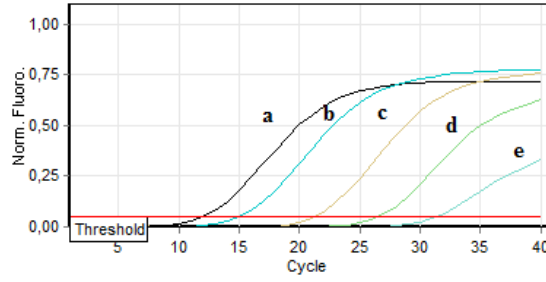
Eğriler	Sulandırma oranları	ct değeri	DNA Konsantrasyonu
A	10^{-1}	14,74	152,6 ng/μl
B	10^{-2}	18,63	15,27 ng/μl
C	10^{-3}	23,12	1,52 ng/μl
D	10^{-4}	29,19	0,15 ng/μl
E	10^{-5}	N/A	0,015 ng/μl
F	Negatif kontrol	0	



Şekil 3.3.5 FAM kanalında test edilen CVI988 (Poulvac Marek CVI) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu qPCR ile elde edilen Ct grafiği.

Çizelge 3.3.5. FAM kanalında test edilen CVI988 (Poulvac Marek CVI) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu elde edilen ct değerleri ve DNA konsantrasyonları.

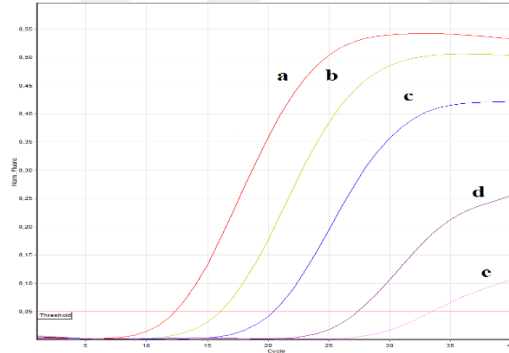
Eğriler	Sulandırma oranları	ct değeri	DNA Konsantrasyonu
A	10^{-1}	12,95	52 ng/μl
B	10^{-2}	16,27	5,2 ng/μl
C	10^{-3}	22,35	0,52 ng/μl
D	10^{-4}	27,91	0,052 ng/μl
E	10^{-5}	32,91	0,0052 ng/μl
F	Negatif kontrol	0	



Şekil 3.3.6. CY5 kanalında test edilen CVI988 (Poulvac Marek CVI) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu qPCR ile elde edilen ct grafiği.

Çizelge 3.3.6. CY5 kanalında test edilen CVI988 (Poulvac Marek CVI) suşunun 10 katlı sulandırma sonucu elde edilen ct değerleri ve DNA konsantrasyonları.

Eğriler	Sulandırma oranları	ct değeri	DNA Konsantrasyonu
A	10^{-1}	12,03	52 ng/μl
B	10^{-2}	15,07	5,2 ng/μl
C	10^{-3}	21,25	0,52 ng/μl
D	10^{-4}	26,45	0,052 ng/μl
E	10^{-5}	31,32	0,0052 ng/μl
F	Negatif kontrol	0	



Şekil 3.3.7. ROX kanalında test edileninnovac HVT aşı suşları 10 katlı sulandırmalarına ait qPCR sonuçları

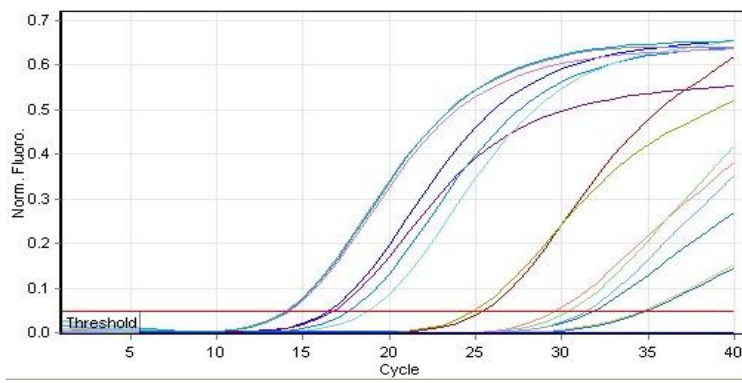
Çizelge 3.3.7. ROX kanalında test edilen Innovac HVT aşı suşlarının 10 katlı sulandırma sonucu elde edilen ct değerleri ve DNA konsantrasyonları

Eğriler	Sulandırma oranları	Ct değeri	DNA Konsantrasyonu
A	10^{-1}	12,36	130,6 ng/μl
B	10^{-2}	16,07	13,06 ng/μl
C	10^{-3}	20,43	1,31 ng/μl
D	10^{-4}	27,39	0,31 ng/μl
E	10^{-5}	33,5	0,03 ng/μl
F	Negatif kontrol	0	

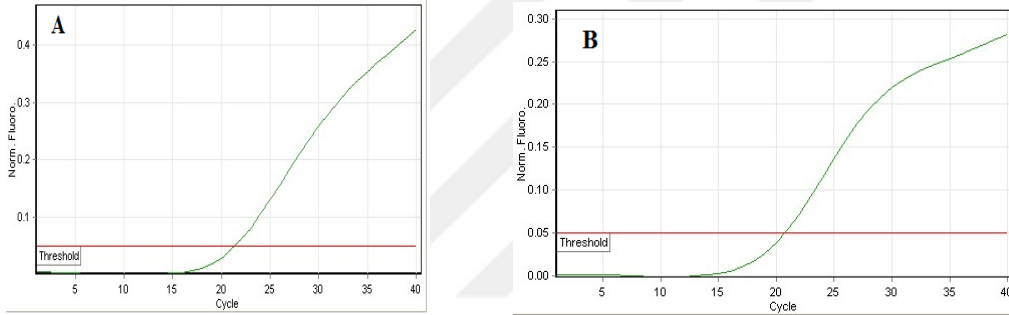
Optimizasyonun ikinci aşamasında hedef dışı organizmalar ile yöntem test edildi. Bu amaçla; IBV (İnfeksiyöz Bronşitis Virüs), NDV (Newcastle Disease Virüs), ILT (İnfeksiyöz Laringotracheitis Virüs), IBDV (Gumboro), *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Pasteurella multocida*, *Avibacterium paragallinarum*, *Salmonella Enteritidis* ve *Escherichia coli* suşlarına uygulanan çoklu qPCR yöntemi tamamı için negatif bulundu.

3.4. Çoklu qPCR Metodunun Saha Örnekleri ile Değerlendirilmesi

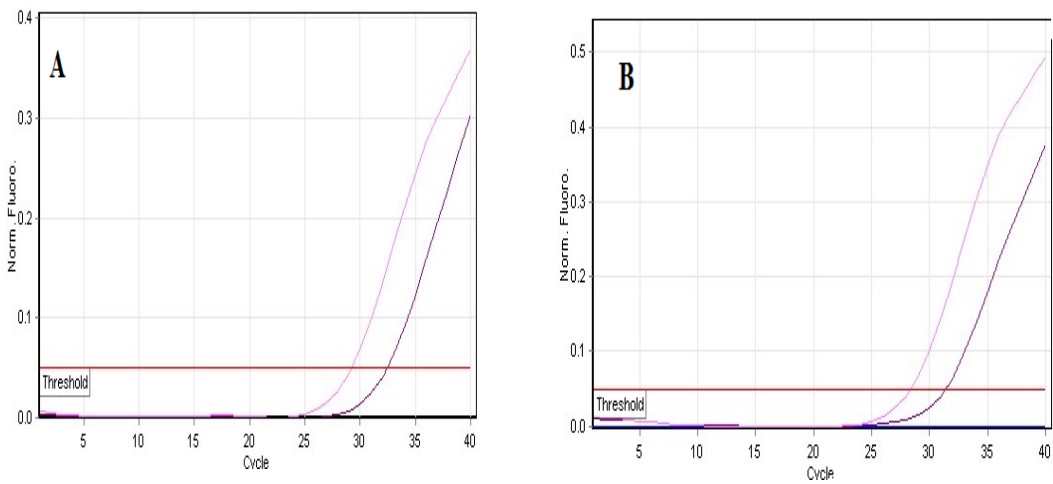
Bu çalışmada 16 işletmeden alınan dokulardan oluşturulan toplam 20 tüp dalak örneğinden elde edilen viral DNA'lara çoklu qPCR yapıldı. Serotip-1'de (FAM kanalında) sonuç diyagramında 12 işletmeye ait 15 örnekte (75 adet dalak) sigmoidal eğriler görülüp pozitif olarak değerlendirilirken (Şekil 3.4.1) diğer hedeflere ait sonuç grafiğinde çoğalma eğrileri tespit edilmedi. Çankırı'da yer alan ve HVT ile aşıları bir işletmeye ait viral DNA örneğinden hem onkojenik serotip-1 hemde HVT aşısına ait pozitif sonuç tespit edildi (Şekil 3.4.2). Çorum'daki bir işletmede ise iki adet viral DNA örneğinin hem onkojenik MHV-1 hem de CVI988 aşısı yönünden çoklu qPCR sonucunun pozitif ancak farklı ct değerlerine sahip oldukları belirlendi (Şekil 3.4.3). Bu sonuç, CVI988 aşı suşu tespiti için yapılan çoklu qPCR sonuç diyagramında, çoğalmanın daha fazla (CVI988'e ait eğrinin 1-2 Ct daha önde oluşması) olması nedeniyle onkojenik MHV-1'in negatif, CVI988'in pozitif olduğu şeklinde yorumlandı. Histopatolojik olarak Marek negatif olduğu belirlenen 2 işletmeye ait 15 adet örneği, onkojenik MHV-1, attenuue HVT ve attenuue CVI988 yönünden çoklu qPCR yöntemiyle de negatif bulunmuştur. Reaksiyonların kontrolü için bütün testlerde kullanılan internal kontrolün okunduğu HEX kanalı tüm denemelerde pozitif olarak sonuç verdi.



Şekil 3.4.1. Onkojenik MCV-1 hedefinin değerlendirildiği FAM kanalı okuması sonucu.



Şekil 3.4.2. HVT aşısı hedefinin değerlendirildiği, Çankırı ili 8 nolu işletmenin sonuçları A) FAM kanalı sonuçları, B) (ROX) kanalı sonucu.



Şekil 3.4.3. CVI988 aşısı hedefinin değerlendirildiği, Çorum ili 2 nolu işletmenin sonuçları. A) FAM kanalı sonuçları. B) CVI988 aşısı suşu (CY5) sonuçları.

4. TARTIŞMA

Marek, broyler, damızlık ve ticari yumurtacıları da etkilediğinden beyaz et-yumurta üretimini sınırlandırarak ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Genç hayvanlarda immunsupresyon oluşturarak sekonder enfeksiyonlara yol açmakta, yetişkin tavuklarda kanat ve bacak sinirlerinde felç ve visseral organlarda tümöral oluşumlar meydana getirmektedir.

Son yarım asırdır hem klinik hem de laboratuvar verileri, saha MHV-1 izolatlarında virulensin arttığını göstermesine rağmen henüz bu patojenitenin genetik temeli anlaşılamamıştır (Pandey ve ark., 2016). Marek hastalığının kontrolünde bu virulens artışı nedeniyle serotip 1 tabanlı aşılar gittikçe fazla kullanılmaya başlanmış onkojenik ile attenuue suş ayrımını yapmak; Marek hastalığını teşhis etmek, aşılanmanın başarılı olduğunu belirlemek veya aşı başarısızlığının nedenlerini araştırmak için zamanla daha da önem kazanmıştır (Baigent ve ark., 2016; Handberg ve ark., 2001).

Değişken virülansa sahip MHV-1'lerin tekrarlı uzun genomik bölgelerindeki dizi farklılıkları; polinükleotid dizi uzaması, kısa peşpeşe sıralı tekrar polimorfizmleri, dizi silinmeleri, okuma çerçeve kayması mutasyonları ve tek nükleotid polimorfizmleri olarak isimlendirilmektedir (Spatz ve Silva, 2007). Saha suşundan aşı suşunun ayırımında, *meq* genindeki 132 bp'lik tekrar bölgesi sayısı, *meq* genindeki 177 bp'lik dizi silinmesi veya pp38 genindeki SNP'ler ile virülen ve virülen olmayan MHV-1 suşlarını birbirinden ayırmak için kullanılmaktadır. Ancak, 132 bp tekrar bölgesi temelli uygulamalar duyarlı, kesin sonuç veren ve kantitatif ayırıcı testler değildir (Silva ve Gimeno, 2007). 177 bp silinmesi bazı CVI988'lerde bulunmakta, bazılarında bulunmamaktadır, bu nedenle ayırıcı testler için uygun değildir (Lee ve ark., 2000).

MHV-1 fosforilasyonlanmış protein 38 (pp38) H19 epitopunda bir SNP yer almaktadır. Bu SNP pp38 geninin 320'nci bazında yer almaktadır. SNP-pp38-320

istikrarlı bir şekilde virülan MHV-1'lerde "A", CVI988'lerde ise "G"dir (Cui ve ark., 1991; Endoh ve ark., 1994; Spatz ve ark., 2007). OIE, SNP-pp38-320 hedefli qPCR ile virülan ve avirülan suş ayırımı için iki farklı yöntem önermektedir (OIE, 2017). Önerilen yöntemlerden Baigent ve ark., hidroliz problemleri ile (Baigent ve ark., 2016), Gimeno ve ark., ise ileri primerler ile (Gimeno ve ark., 2014) SNP-pp38-320'yi hedeflemiştir. Baigent'in qPCR testi CVI988 için özgül, virülan MHV-1 için özgül olmayan sonuçlar verirken (Davidson ve ark., 2017) Gimeno ve ark. (2014)'nın qPCR testi onkojenik MHV-1 için özgül, CVI988 aşı suşu için özgül olmayan sonuçlar vermektedir (Gimeno ve ark., 2014). Yapılan bu çalışmalar değerlendirilerek onkojenik MHV-1 için Gimeno ve ark. (2014)'nın primerleri ve bu çalışma da tasarlanan probu, CVI988 aşı suşu için Baigent ve ark. (2016)'nın primer ve probu, HVT için bu çalışmada için hazırlanan primer-probu ve internal kontrol için Gimeno ve ark. (2014)'nın primer-probunu kullanılarak onkojenik MHV-1, aşı suşu CVI988 ve aşı suşu HVT'nin ayırımı için bir tüpte çoklu-qPCR yapılarak gerçekleştirilen çalışma sonuçlarında 12 işletme onkojenik MHV-1 yönünden pozitif bulunurken, CVI988 aşı suşu tespit edilmedi ancak bir işletmede HVT aşı suşu tespit edildi. Bir viral DNA örneğinde sadece virülan MHV-1 mevcutsa (CVI988 yokken) hem Gimeno testi hem de bu tez çalışmasında geliştirilen testin doğru sonuç verdiği görüldü ve virüs, standart eğrilerle, geniş bir dinamik aralıkta doğru bir şekilde ölçülebildi. Bu sonuçlar aynı zamanda, *meg* gen (Baca, 2002; İslam ve ark., 2006; Jones, 1992) ve pp38 gen bölgesi hedefli (Baigent ve ark., 2016; Davidson ve ark., 2017; İslam ve ark., 2006) yapılan diğer çalışmalarla benzerlik göstererek onkojenik MHV-1 tespiti ve aşı suşları ile ayırımı gerçekleştirildi.

Bu çalışmada onkojenik MHV-1 tespiti için kullanılan probun CVI988 hedefli CY5 kanalında sigmoidal bir eğri göstermediği belirlendi ve onkojenik MHV-1 için doğru sonuç verdiği anlaşıldı. Ancak CVI988 aşı suşu hedefli probun onkojenik MHV-1'de hedefli FAM kanalında sigmoidal eğri oluşturduğu gözlemlendi. CVI988 aşı suşu ve onkojenik MHV-1'in ayırımı, çoğalmanın hangi kanalda daha önde olmasına göre (ct daha önde 1-2 farkla) yorumlanarak, eğer CVI988'de çoğalma daha önde ise CVI988 aşısının olduğu onkojenik serotip 1'in olmadığı sonucuna varıldı. Eğer onkojenik serotip 1 daha önde ise ortamda onkojenik serotip 1

ile CVI988'in her ikisinde olduğu sonucuna varıldı. Bu da Çizelge 2.2.2'de Çoklu qPCR sonuçlarının değerlendirme tablosunda verildi. Bu çalışmanın sonuçlarında Çorum'da bulunan bir işletmenin sonuçlarında hem CVI988 hedefi olan CY5 kanalında hem de onkojenik serotip 1 hedefi olan FAM kanalında çoğalma eğrilerine rastlanılmış, CVI988'de çoğalma eğrilerinin daha önde olması nedeniyle ortamda aşı virusuna ait viral DNA'nın bulunduğu sonucu çıkarıldı. Bu sonuç, Gimeno ve ark. (2014), pp38 hedefli çalışmalarıyla benzerlik göstermiştir. CVI988 aşı suşu için benzer primer ve prob kullanılarak yapılan bu çalışma sonuçları Baigent ve ark. (2016) ve Davidson (2017) çalışmalarıyla benzerlik göstermemiştir. Yapılan tekrarlı çalışmalarda da aynı sonuç alınmıştır. Bu nedenle bu araştırmacıların CVI988 aşı tespiti için kullandıkları probun belli bir viral DNA yükü olduğunda spesifik olduğu her aralıktaki viral DNA için uygun olmayabileceği düşünüldü.

HVT aşısının, serotip 1 ve CVI988 aşı suşu ayrımı için yapılan çoklu qPCR çalışmasında bir işletmeye ait viral DNA örneğinde hem onkojenik serotip 1 ve hem de HVT aşı suşu saptandı. Bu sonuç, Handberg ve ark. (2001)'nin serotip 1 ve serotip 3 tespiti için yaptıkları konvansiyonel PCR çalışmalarıyla HVT ile aşıli kümeslerdeki onkojenik serotip 1 tespitleriyle ve Çin'de (Gong ve ark., 2013) yapılan bir survey çalışması sonuçlarıyla HVT ile aşıli kümeslerdeki onkojenik serotip 1 saptanmaları ile benzerlik göstermiştir. Bu işletmenin biyogüvenliği ve aşılama prosedürüne dair detaylı bilgi edilememiştir.

Bu çalışma da yapılan çoklu qPCR analizlerinde MHV-1 pozitif bulunan hayvanların bezli mide ve *N. ischiadicus*'larına halen Marek hastalığının tespitinde tavsiye edilen standart metot olan histopatolojik inceleme (OIE, 2017) yapılmış, histopatolojik analiz sonuçlarında da inceleme yapılan dokularda Marek hastalığı tespit edilerek her iki analiz sonucunun birbiriyle paralel olduğu tespit edilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Küresel gereksinim arttıkça, yoğun tavukçuluk üretim tesislerine olan bağımlılığımız da artmaktadır. Bu nedenle tavukçuluk endüstrisi her geçen gün daha da büyümekte; hastalıklarla mücadele ve kontrolü için yeni teşhis metotları, sağaltım yöntemlerine ve aşlamaya ihtiyaç duyulmaktadır. Marek'te, tavukçuluk endüstrisi için ciddi ekonomik kayıplara sebebiyet veren bir tehdit unsurudur.

Marek hastalığı etkeninin tespitinde serolojik metodların kullanımının sınırlı olması, virüs izolasyonunun güç ve zaman alması, histopatolojik yöntemlerle hastalığın diğer neoplastik hastalıklarla karışması nedeniyle, bu çalışmada geliştirilen kitin teşhisteki bu sorunlara cevap oluşturacağı düşünülmektedir. Bu kit ile, etkenin hızlı tespiti ve aşı-saha suşu ayrımı yapılarak hastalığın hızlı, kolay, duyarlı teşhisinin yapılarak, yayılımını önlemede zaman kaybının önüne geçilebileceği düşünülmektedir. Geliştirilen yöntem ile farklı kanallarda virülen MHV-1 ile CVI988 ve HVT aşıları özgül bir şekilde tespit edilebildiği için virülen MHV-1 ve CVI988 sayımı gerçekleştirilebileceği anlaşıldı. Başarılı aşılama ve aşı virüsü replikasyonunu teyit etmek, optimal aşı dozunu belirlemek ve virülen saha suşlarını tespit etmek geliştirilen bu metotla mümkün olmuştur.

Saha suşu evrimiyle aşı gelişimi arasındaki yarış kanatlı endüstrisi için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Saha suşları daha yüksek virulense sahip patotiplere doğru evrimleştikçe aşılama başarısız olacaktır. Daha virülen MHV suşlarının ortaya çıkması, kanatlı endüstrisi için önemli bir sorundur ve bu nedenle, bu onkojenik virüsün artan patojenitesi ve virülansının tüm nedenlerini güncelleyecek çalışmalara ihtiyaç vardır. Bunun için tavuk kümeslerinin düzenli prevalansı ortaya konulmalıdır. Farklı bölgelerden elde edilen MHV izolatlarının moleküler epidemiyolojisi üzerine çalışmalar yapılması önerilmektedir. Bunun da, sahada daha iyi bir immünizasyon protokolünün seçilmesine yardımcı olacağına inanılmaktadır.

ÖZET

Marek Hastalığının teşhisi ve Türkiye’de kullanılan aşılardan ayırımına yönelik çoklu Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR hızlı tanı kiti geliştirilmesi

Marek hastalığı evcil kanatlıların, periferik sinirlerinde demyelinizasyon, mononükleer infiltrasyonlarla kendini gösteren lenfoproliferatif ve oldukça kontagiyöz bir hastalıktır. Marek, tüm kümes tavukçuluğu yapan ülkelerde bulunmaktadır. Marek hastalığı virüsü, 1960’lı yılların sonunda ilk başarılı aşı geliştirilen onkojenik virüstür. Günümüzde kullanılan aşılardan canlı üç viral suştan türetilen aşılardır: HVT FC126 suşu, GaHV-3 SB-1 suşu ve GaHV-2 CVI988/Rispens suşudur. CVI988/Rispens aşısı MHV-1’in doğal olarak zayıflatılmış bir suşudur ve CVI988 /Rispens aşısı Marek hastalığının virülan suşlarından kolaylıkla ayırt edilemez. MHV aşısı suşları, kalıcı enfeksiyon ve yaşam boyu bağışıklık kazandırarak tümörlere ve mortaliteye karşı etkili koruma sağlamasıyla birlikte, aşı bazı virülan virüslerle enfeksiyonu engelleyemez. Dolayısıyla tavuklar hem aşı hem de virülan MHV-1 suşlarıyla potansiyel olarak enfekte olabilirler. Bu tez çalışmasında referans suşlarla ve ticari/ev tipi kanatlı işletmelerinden toplanan organlarla valide edilen eş zamanlı, virülan MHV-1, CVI988, HVT ve tavuk DNA’sının özgül ve duyarlı tespitinin yapılabildiği bir çoklu-qPCR yöntemi geliştirildi. Bu yöntemle çoklu qPCR analizlerinde MHV-1 pozitif bulunan hayvanların bezli mide ve *N. ischiadicus*’larından Marek hastalığının tespiti için hispatolojik inceleme yapılmış ve her iki yöntemle ait sonuçlar paralellik göstermiştir. Çoklu-qPCR yönteminin kullanım kolaylığı, güvenilirliği, teknik olarak basit, full otomasyon, spesifik, hassas, hızlı olmasından dolayı teşhiste daha fazla avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Marek, qPCR, Tavuk.

SUMMARY

Multiplex Quantitative Real-Time PCR developing rapid diagnostic kit for the detection of discrimination and Marek's Disease vaccine used in Turkey

Marek disease is a multifoproliferative and highly contagious disease of domestic poultry, demyelination of peripheral nerves, manifested by mononuclear infiltrations. Marek is in all of the countries that are engaged in cluster culture. Marek's disease virus is the first successful vaccine developed oncogenic virus in the late 1960s. Vaccines currently used are vaccines derived from live three viral strains: HVT FC126 strain, GaHV-3 SB-1 strain and GaHV-2 CVI988/Rispens strain. The CVI988/Rispens vaccine is a naturally attenuated strain of MHV-1 and the CVI988/Rispens vaccine cannot be easily distinguished from virulent strains of Marek's disease. The vaccine cannot prevent infection with certain virulent viruses, as MHV vaccine strains provide effective infection and lifelong immunization and effective protection against tumors and mortality. Thus, chickens may be potentially infected with both vaccine and virulent MHV-1 strains. In this thesis, a multiple qPCR method was developed in which specific and sensitive detection of simultaneous, virulent MHV-1, CVI988, HVT and chicken DNA was validated with reference strains and organs from commercial-household poultry enterprises. In this study, histopathological examination was performed for the detection of Marek's disease from proventriculus and *N. ischiadicus* of animals with MHV-1 positivity in multiple qPCR analyzes. It is thought that multiple qPCR method will provide more advantages in diagnosis because of its ease of use, reliability, technically simple, full automation, specific, sensitive and fast.

Keywords: Marek, qPCR, Chicken.

KAYNAKLAR

- AFONSO CL, TULMAN ER, LU Z, ZSAK L, ROCK DL, KUTISH GF (2001). The genome of turkey herpesvirus. *J Virol*, **75**: 971-978
- ALKAN R, BAYRAKTAR R (1995). Türkiye’de tavuk hastalıklarının yayılışı. IV. Hayvancılık ve Beslenme Sempozyumu 95. Tavuk yetiştiriciliği ve hastalıkları. Selçuk Üniversitesi. Konya.
- ATILGAN T, YEŞİLADA İ (1961). Marek hastalığında korunma. *Born Vet Araş Ent Derg.* **23** (12), 17-31.
- AYDIN Y, ATASEVER A, KÖKÜUSLU C (1991). 1974-1991 yıllarında incelenen kanatlı hayvan hastalıkları ve tümörleri *A.Ü. Vet. Fak. Derg.* **38**:352-58.
- BACA AÜ (2002). Tavuklarda Marek Hastalığı Virusunun Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Saptanması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul. Doktora tezi.
- BAIGENT S, DAVISON F (2004). Marek’s disease virus: biology and life cycle. In: Davison F., Nair V., editors. *Marek’s Disease, an Evolving Problem*. 1st ed. Elsevier Academic Press; Oxford: pp. 62–77.
- BAIGENT SJ, PETHERBRIDGE LJ, HOWES K, SMITH LP, CURRIE JW, NAIR VK (2005). Absolute quantitation of Marek’s disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using realtime PCR. *J Virol Methods* **123**:53–64.
- BAIGENT SJ, SMITH LP, PETHERBRIDGE LJ, NAIR VK (2011). Differential quantification of cloned CVI988 vaccine strain and virulent RB- 1B strain of Marek’s disease viruses in chicken tissues, using real-time PCR. *Re Vet Sci.* **91**:167–174.
- BAIGENT SJ, NAIR VK, GALLUDEC LE H (2016). Real-time PCR for differential quantification of CVI988 vaccine virus and virulent strains of Marek’s disease virus. *J Virol Methods.* **233**: 23–36. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.03.002.
- BAŞKAYA H, MİNBAY A (1974). Marek Hastalığı. *A.Ü. Veteriner Fak. Yayınları.* 299. A. Ü. Basımevi. Ankara.
- BAXENDALE W (1969). Preliminary observations on Marek’s disease in ducks and other avian species. *Vet Rec.* **85**:341–342.
- BEASLEY JN, LANCASTER JL (1971). Studies on the role of arthropods as vectors of Marek’s disease. *Poult Sci.* **50**:1552–1552.
- BECKER Y, ASHER Y, TABOR E, DAVIDSON I, MALKINSON M, WEISMAN Y (1992). Polymerase chain reaction for differentiation between pathogenic and non-

pathogenic serotype 1 Marek's disease (MDV) and vaccine viruses of MDV-serotypes 2 and 3. *J Virol Meth.*, **40** (3), 307-322.

BIARNÉS M, BLANCO A, JOVÉ QCR (2013). Monitorización de la vacunación frente a la enfermedad de Marek mediante PCR en tiempo real a partir de pulpa de la pluma. Congreso Científico de Avicultura. Asociación Española de Ciencia Avícola - AECA- WPSA, Lleida, Spain.

BIGGS PM, PAYNE LN (1964). Relationship of Marek's disease (neural lymphomatosis) to lymphoid leukosis. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* **17**, 83-97.

BIGGS PM, PAYNE LN (1967). Studies on Marek's disease. 1. Experimental transmission. *J Natl Cancer Inst.* **39**:267-280.

BIGGS PM, VENUGOPAL N (2012). The long view: 40 years of Marek's disease research and Avian Pathology. *Avian Pathol.* **41**(1), 3-9.

BIGGS PM (1968). Marek's disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology: Ergebnisse der Mikrobiologie*. W. Arber, W. Braun, F. Cramer, R. Haas, W. Henle, P. H. Hofschneider, N. K. Jerne, W. Kikuth, P. Koldowsky, H. Koprowski, O. Maaløe, R. Rott, H.-G. Schweiger, M. Sela, L. Syruček, P. K. Vogt, E. Wecker. 43 pp.: 91-96.

BIGGS PM (1975). Marek's disease-the disease and its prevention by vaccination. *Br J Cancer Suppl.* **2**: 152-155.

BIGGS PM (1985). Spread of Marek's disease. In: *Marek's Disease, Scientific Basis and Methods of Control*. L.N. Payne, ed. Martinus Nijhoff, Boston, MA. 329-340.

BIGGS PM (2001). History and biology of Marek's disease virus. In: Kanji Hirai Eds. *Marek's disease*. 1st ed. *Springer Co*, 2-4.

BIGGS PM (2004). Marek's disease-long and difficult beginnings. In: *Marek's Disease, an eEvolving Problem*. F. Davison and V. Nair, eds. Elsevier Academic Press, London. 8-16.

BOODHOO N, GURUNG A, SHARIF S, BEHBOUDI S (2016). Marek's disease in chickens: a review with focus on immunology. *Vet Res*, **47**:119 DOI 10.1186/s13567-016-0404-3.

BREWER RN, REID WM, BOTERO H, SCHMITTLE SC (1968). Studies on acute Marek's disease. 2. The role of coccidia in transmission and induction. *Poult Sci.* **47**:2003-2012.

BREWER RN, REID WM, JOHNSON J, SCHMITTLE SC (1969). Studies on the acute Marek's disease. VIII. The role of mosquitoes in transmission under experimental conditions. *Avian Dis.* **13**: 83-88

- BRILES WE, BRILESRW, TAFFS RE (1983). Resistance to malignant lymphoma in chickens is mapped to sub region of Major Histocompatibility (B) complex. *Poultry Science*. **219**:977–979.
- BUCKMASTER AE, SCOTT SD, SANDERSON MJ, BOURSNEILL ME, ROSS NL, BINNS MM (1988). Gene sequence and mapping data from Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys: implications for herpesvirus classification. *J Gen Virol*. **69**:2033-2042.
- BULOW VV, BIGGS PM (1975). Differentiation between strains of Marek's disease virus and turkey herpesvirus by immunofluorescence assays. *Avian Pathol*. **4**: 133–146.
- BURGESS SC, DAVISON TF (2002). Identification of the neoplastically transformed cells in marek's disease herpesvirus-induced lymphomas: recognition by the monoclonal antibody av37. *J Virol*. **76**:7276-92.
- BURGESS SC, BASARANBH, DAVISON TF (2001). Resistanceto Marek's disease herpesvirus-induced lymphoma is multiphasic and dependent on host genotype. *Vet Pathol*. **38**:129–142.
- CALNEK BW, ADLDINGER HK, KAHN DE (1970). Feather follicle epithelium: A source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *AvianDis*. **14**:219–233.
- CALNEK BW, WITTER RL (1997). Marek's disease. In Diseases of poultry, 10th Ed. (B.W. Calnek with H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald & Y.M. Saif, eds). Iowa State University Press, Ames, 369-413.
- CALNEK BW (1972). Effects of passive antibody on early pathogenesis of Marek's disease. *Infect Immun*. **6**:193–198.
- CALNEK BW (1986). Marek's disease—a model for herpesvirus oncology. *CRC Crit Rev Microbiol*. **12**:293–320.
- CALNEK B W (1998). Lymphomagenesis in Marek's disease. *Avian Patho.,* **27**: 54-64.
- CALNEK BW (2001). Pathogenesis of Marek's disease virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, **255**:25–55.
- CORTES PL, CARDONA CJ (2004). Pathogenesis of a Marek's Disease Virus Mutant Lacking vIL-8 in Resistant and Susceptible Chickens. *Avian Dis*, **48**:50-60.
- CHURCHILL AE, BIGGS PM (1967). Agent of Marek's disease in tissue culture. *Nature*, **215**:528–530.

- CHURCHILL AE, BIGGS PM (1968). Herpes-Type Virus Isolated in Cell Culture From Tumors of Chickens With Marek's Disease. I. Studies in Cell Culture. *J Nat Cancer Inst*, Vol **41**, Issue 4, pp.: 939–950, <https://doi.org/10.1093/jnci/41.4.939>
- CHURCHILL AE, PAYNE LN, CHUBB RC (1969). Immunization against Marek's disease using a live attenuated virus. *Nature*, **221**:744–747.
- COUDERT F, VUILLAUME A, WYERS M, CHAUSSÉ AM. (1997). Marek's disease in turkeys. *World Poultry*, S 28–29.
- COUTEAUDIER M, DENESVRE C (2014). Marek's disease virus and skin interactions. *Veterinary Research*, **45**(36):10-12
- CUI N, LI X, CHEN C, HAO H, SU S, CUI Z (2016). Transcriptional and Bioinformatic Analysis Provide a Relationship between Host Response Changes to Marek's Disease Viruses Infection and an Integrated Long Terminal Repeat. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6**:46. doi: 10.3389/fcimb.2016.00046.
- ÇARLI KT (2018). Kanatlı Hayvanların Enfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri. S 177-186.
- ÇİFTÇİ MK, ÇELİK G, TUZCU M, SUR E, ORUÇ E (2011). The evaluation of enzyme histochemical and histopathological findings in the diagnosis of marek's disease. *Dicle Üniv Vet Fak Derg.* **2**:50-57.
- DAVIDSON I, BOROVSKAYA A, PERL S, MALKINSON M (1995). Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of natural infection of chickens and turkeys with Marek's disease virus and reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathol*, **24**:69-94.
- DAVISON F, NAIR V (2005). Use of Marek's disease vaccines: could they be driving the virus to increasing virulence? *Expert Rev. Vaccines*. **4**:77–88.
- DAVIDSON I, MALKINSON M, WEISMAN Y (2002). Marek's disease in turkeys. I.A seven-year survey of commercial flocks and experimental infection using two field isolates. *Avian Dis.* **46**:314–321.
- DAVIDSON I, BORENSHTAIN R (2003). Novel applications of feather tip extracts from MDV-infected chickens; Diagnosis of commercial broilers, whole genome separation by PFGE and synchronic mucosal infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **38**:199–203.
- DAVIDSON I, NATOUR-ALTOURY A, RAIBSTEIN I, DAHAN, Y (2017). Differential amplification of Marek's disease CVI988 vaccine and of wild-type isolates from organs of commercial chickens using single or duplexed probes in real-time PCR. *Avian Patho*, **46**:610–614.

- DELECLUSE HJ, SCHFILLER S, HAMMERSCHMIDT W (1993). Latent Marek's disease virus can be activated from its chromosomally integrated state in herpesvirus-transformed lymphoma cells. *EMBO J*. **12** pp.: 3277-3286.
- DUTTON RL, KENZY SG, BECKER WA (1973). Marek's disease in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Poult Sc*, **52**:139-143.
- ENDO H, D, NIIKURA M, HIRAI K, INAGAKI N, HAYASHI M, NAKAJIMA K, SATO F (1994). Expression and purification of recombinant Marek's disease virus serotype 1 specific phosphorylated protein pp38 in E. coli. *J Vet Med Sci*, **56**, 823-6.
- ENGEL AT, SELVARAJ RK, KAMIL JP, OSTERREIDER N, KAUFER BB (2012). Marek's disease viral interleukin-8 promotes lymphoma formation through targeted recruitment of b cells and cd4 cd25 t cells. *J Virol.*, **86**:8536-45.
- FADLY AM, WITTER RL, SMITH EJ, SILVA RF, REED WM, HOERR FJ, PUTNAM MR (1996): An outbreak of lymphomas in commercial broiler breeder chickens vaccinated with a fowlpox vaccine contaminated with reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathol*. **25**: 35-47.
- FAN HH, KLEVEN SH, JACKWOOD MW (1995). Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis*, **39** (4): 729-735.
- FICKEN MD, NASISSE MP, BOGGGAN GD, GUY JS, WAGES DP, WITTER RL, ROSENBERGER JK, NORDGREN RM (1991). Marek's Disease Virus Isolates with Unusual Tropism and Virulence for Ocular Tissues: Clinical Findings, Challenge Studies and Pathological Features. *Avian Pathol*. **20**:461-474.
- FUJIMOTO Y, NAKAGAWA M, OKADA K, OKADA M, MATSUKAWA K (1971). Pathological Studies of Marek's Disease. I. The Histopathology on Field Cases in Japan. *Jpn J Vet Res*, **19**:7-26.
- FUKUCHI K, TANAKA A, SCHIERMAN LW, WITTER RL, NONOYAMA M (1985), The structure of Marek disease virus DNA: The presence of unique expansion in nonpathogenic viral DNA *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **82**: 751-754.
- FREDERICK A, MURPHY E, PAUL JG, MARIAN CH (1999). Herpesviridae. Veterinary virology. (3rd Edtn), Academic Press Co, USA.
- GARCIA M, JACKWOOD MW, HEAD M, LEVISOHN S, KLEVEN SH (1996). Use of species specific oligonucleotide probes to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *M.synoviae*, and *M.iowae* PCR amplification products. *J Vet Diagn Invest*, **8** (1): 56-63.

- GAWEL A, SAMOREK-SALAMONOWICZ E, MAZURKIEWICZ M, KOZDRUN W (1998). Przebieg choroby Mareka u indyków rzeźnych. *Nowa Weterynaria*. **3**:1–3.
- GIMENO IM, WITTER RL, HUNT HD, REDDY SM, REED WM (2004). Biocharacteristics shared by highly protective vaccines against Marek's disease. *Avian Pathol.* **33**: 59–68.
- GIMENO IM, DUNN JR, CORTES AL, EL-GOHARY, A.EG, SILVA RF (2014). Detection and Differentiation of CVI988 (Rispens Vaccine) from Other Serotype 1 Marek's Disease Viruses. *Avian Dis.* **58**, 232–243.
- GIMENO IM (2008). Marek's disease vaccines: a solution for today but a worry for tomorrow? *Vaccine*. **26**:C31–41.
- GONG Z, ZHANG L, WANG J, CHEN L, SHAN H, WANG Z, MA H (2013). Isolation and analysis of a very virulent Marek's disease virus strain in China. *Virology Journal*. **10**:155-158.
- GÜREL A, YEŞİLDERE T (1993). Civcivlerde Deneysel olarak oluşturulan Marek Hastalığında bursa Fabricius lezyonları. **19** (2) 183-195. *J Vet Fak Derg.* İstanbul.
- HANDBERG KJ, NIELSEN OL, JORGENSEN PH (2001). The use of serotype 1- and serotype 3- specific polymerase chain reaction for the detection of Marek's disease virus in chickens. *Avian Pathol.* **30**:243-49.
- HELMBOLDT CF (1972). Histopathologic Differentiation of Diseases of the Nervous System of the Domestic Fowl (*Gallus Gallus*). *Avian Dis.*, **16**:229-240.
- HILDEBRANDT E, DUNN JR, PERUMBAKKAM S, NIKURA M, CHENG HH (2014). Characterizing the Molecular Basis of Attenuation of Marek's Disease Virus via In Vitro Serial Passage Identifies De novo Mutations in the Helicase-Primase Subunit Gene UL5 and Other Candidates Associated with Reduced Virulence. *J Virol.*, pp.: 6232– 6242.
- HUTT EB, COLE RK (1947). Genetic control of lymphoblastosis in the fowl. *Science*, **106**: 379-384.
- IMAI K, YUASA N, KOBAYASHI S, NAKAMURA K, TSUKAMOTO K, HIHARA H (1990). Isolation of Marek's disease virus from Japanese quail with lymphoproliferative disease. *Avian Pathol.* **19**:119–129.
- ISLAM A, CHEETHAM BF, MAHONY TJ, YOUNG PL, WALKDEN-BROWN SW (2006). Absolute quantitation of Marek's disease virus and Herpesvirus of turkeys in chicken lymphocyte, feather tip and dust samples using real-time PCR. *J Virol Methods*. **132**: 127–134.
- JAROSINSKI KW, YUNIS R, O'CONNEL PH, MARKOWSKI-GRIMSRUD CJ, SCHAT KA (2002). Influence of genetic resistance of the chicken and virulence of Marek's

disease virus (MDV) on nitric oxide responses after MDV infection. *Avian Dis.* **46**:636-49.

JONES D, LEEL, LIU JL, KUNG HJ, TILLOTSON JK (1992). Marek disease virus encodes a basic-leucine zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid tumors. *Proc Natl Acad Sci. USA* **89**:4042–4046.

KAUFMAN JF, MILNE S, GOBEL TW, WALKER BA, JACOB JP, AUFRAY C, ZOOROB R, BECK S (1999). The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. *Nature*. Vol. **401**; pp.:923-925.

KELEŞ H (2007). Tavuklarda marek hastalığının patolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle tespiti. Sağ Bil. Ens. Doktora tezi. ANKARA

KENZY SG, BIGGS PM (1967). Excretion of the Marek's disease agent by infected chickens. *Vet Rec.* **80**:565–568.

KOBAYASHI S, KOBAYASHI K, MIKAMI T (1986). A study of Marek's disease in Japanese quails vaccinated with herpesvirus of turkeys. *Avian Dis.* **30**:816–819.

KÖKÜUSLU C, ÖZKUL İA (1975). Evcil kanatlılarda gördüğümüz tümör çeşitleri. *A.Ü. Vet Fak Derg.* **22**:41-49.

KÖKÜUSLU C, ÖZKUL İA, ALÇIĞIR G (1989). Tavukların Lenfoid Lökaz, Retikoloendoteliosis Marek Hastalıklarının Teşhisi üzerinde İmmunfloresan (IF) Histopatolojik Yöntemlerle Karşılaştırılmalı olarak Araştırmalar. *Doğa T UVet Hayvan Derg.* **13**(2). 181-191.

KUTSAL O (1987). Bursa Yöresi Tavuklarında Görülen Marek Hastalığının Teşhisinde, Deri ve İç Organ Bulguları Üzerinde Floresan Antikor (FA) ve Histolojik Yöntemler Kullanarak Yapılan Araştırmalar. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

LAKSHMANAN N, LAMONT SJ (1998). Rfp-Y Region Polymorphism and Marek's Disease Resistance in Multitrait Immunocompetence-Selected Chicken Lines. *Poultry Science.* **77**: 538-541.

LEE SI, TAKAGI M, OHASHI K, SUGIMOTO C, ONUMA M (2000). Difference in the meq gene between oncogenic and attenuated strains of Marek's disease virus serotype 1. *J Vet Med Sci.* **62**: 287–92.

LEE LF, LUPIANI B, SILVA RF, KUNG HJ, REDDY SM (2008). Recombinant Marek's disease virus (MDV) lacking the Meq oncogene confers protection against challenge with a very virulent plus strain of MDV. *Vaccine.* **26**:1887–1892.

LONGENECKER BM, MOSMANN TR (1981). Nomenclature for chicken MHC (B) antigens defined by monoclonal antibodies. *Immunogenetics.* **13**: 25–28.

- MAREK J (1907). Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hühnern. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, **15**, 417-421.
- MEYDAN H (2012). Tavuklarda Marek Hastalığının SNP Genetik Markerlerinden Yararlanılarak Araştırılması, Zootekni Ana bilim Dalı. Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi. Ankara.
- MILES A (2015). Marek's Disease. Manual of poultry diseases. Jeanne Brugère-Picoux & Jean-Pierre Vaillancourt. Section II pp.: 221-225.
- MİNBAY A (2002). Marek hastalığı, In: İzgür M, Akan M, editors. Kanatlı hayvan hastalıkları, Medisan Yayınları, 1. Basım. Ankara, 195-200.
- MORIMURA T, HATTORI M, OHASHI K, SUGIMOTO C, ONUMA M (1995). Immunomodulation of peripheral t cells in chickens infected with marek's disease virus involvement in immunosuppression. *J Gen Virol.* **76**:2979–85.
- MORROW C, FEHLER F (2004). Marek's disease: a worldwide problem. In: *Marek's Disease: An Evolving Problem*. F. Davison and V. Nair, eds. Elsevier Academic Press, London. 49–61.
- MURATA S, CHANG KS, YAMAMO TOY, OKADA T, LEE SI, KONNA IS, ONUMA M, OSA Y, ASAKAWA M, OHASHI K (2007). Detection of the virulent Marek's disease virus genome from feather tips of wild geese in Japan and the Far East region of Russia. *Arch Virol.* **152**:1523–1526.
- MURATA S, HAYASHI Y, KATO A, ISEZAKI M, TAKASAKI S, ONUMA M, OSA Y, ASAKAWA M, KONNAI S, OHASHI K (2012). Surveillance of Marek's disease virus in migratory and sedentary birds in Hokkaido, Japan. *Vet J.* **192**:538–540.
- NAIR V, KUNG HJ (2004). Marek's disease virus oncogenicity: molecular mechanisms. In: *Marek's Disease: An Evolving Problem*. F. Davison and V. Nair, eds. Elsevier Academic Press, London. pp.: 32–48.
- NAIR V, JONES RC, GOUGH RE (2008). Herpesviridae, In: Pattison M, McMullin PF, Alexander DJ, editors. *Poultry disease*, Saunders Elsevier, Sixth Edition. 258-67.
- NAIR V (2005). Evolution of Marek's disease – A paradigm for incessant race between the pathogen and the host. *Vet J.* **170**(2):175–83.
- NAZERIAN K, SOLOMON JJ, WITTER RL, BURMESTER BR (1968). Studies on the etiology of Marek's disease. II. Finding of a herpesvirus in cell culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, **127**:177–182.
- OIE (2010). Marek's Disease. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.3.13 Marek's disease. World Organisation for Animal Health.
- OIE (2017). Marek's Disease. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.3.13. Marek's disease. World Organisation for Animal Health.

- OKWOR EC, EZE DC (2011). Outbreak and persistence of Marek's disease in batches of birds reared in a poultry farm located in Nsukka, south east Nigeria. *Int J Poult Sci*. **10**:617–620.
- OSTERREIDER N, KAMIL JP, SCHUMACHER D, TISCHER BK, TRAPP S (2006). Marek's disease virus: from miasmato model. *Nature Rev. Microbiol*. **4**:283-94.
- ÖZBİLGİN S, ŞEN A, ÜLGEN M, ÇARLI KT, SÖNMEZ G (2001). Tavuklarda Lenfoid Leukozis (LL) Hastalığının ELISA (Enzim Linked Immunosorbent Assay) ve Marek Hastalığının (MD) IF (İmmunoflorasan) Tekniği ile Tanısı. *Turk J Vet Anim Sci*, **25**: 839-846.
- PANDEY U, BELL AS, RENNER DW, KENNEDY DA, SHREVE JT, CAIRNS CL, JONES MJ, DUNN PA, READ AF, SZPARA ML (2016). DNA from dust: comparative genomics of large DNA viruses in field surveillance samples. *mSphere*. **1**:e00132–16.
- PARCELLS MS, LIN SF, DIENGLEWICZ RL, MAJERCIAK V, ROBINSON DR, CHEN HC, WU Z, DUBYAK GR, BRUNOVSKIS P, HUNT HD, LEE LF, KUNG HJ (2001). Marek's disease virus (MDV) encodes an interleukin-8 homolog (vIL-8): characterization of the vIL-8 protein and a vIL-8 deletion mutant MDV. *J Virol*. **75**:5159–5173.
- PAPPENHEIMER AW, DUNN LC, CONE V (1929). Studies on fowl paralysis (*Neurolymphomatosis gallinarum*). I. Clinical features and pathology. *J Exp Med*. **49**, 87–102.
- PASTORET PP (2004). Introduction In: Davison F, Nair V, editors. Marek's disease an evolving problem, Second edition, London, Elsevier Academic Press. pp.:1-7.
- PAYNE LN VE RENNIE M (1973). Pathogenesis of Marek's disease in chicks with and without maternal antibody. *J Natl Cancer Inst*. **51**:1559–1573.
- PAYNE LN, RENNIE M (1976). Sequential changes in the numbers of B and T lymphocytes and other leukocytes in the blood in Marek's disease. *Int J Cancer*. **18**:510–520.
- PAYNE LN, VENUGOPAL K (2000). Neoplastic diseases: Marek's disease, avian leukosis and reticuloendotheliosis. *Rev Sci Tech off Int Epiz*. **19** (2) 544-564.
- PAYNE LN (1999). Marek's disease. Poultry disease. (4th Edtn), NS Saunders, London, UK.
- PENNYCOTT TW, AND VENUGOPAL K (2002). Outbreak of Marek's disease in a flock of turkeys in Scotland. *Vet Rec*. **150**:277–279.
- PENNYCOTT TW, DUNCAN G, VENUGOPAL K (2003). Marek's disease, candidiasis and megabacteriosis in a flock of chickens (*Gallus gallus domesticus*) and Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Vet Rec*. **153**:293–297.

- PHERSON MC, DELANY ME (2016). Virus and host genomic, molecular, and cellular interactions during Marek's disease pathogenesis and oncogenesis. *Poult Sci*. <http://www.poultrydvm.com/condition/mareks-disease>.
- POONAM, KHATRI R, MOHAN H, MINAKS HI, PUNDIR CS (2017) Etiology, Epidemiology, Pathogenesis and Diagnosis of Marek's Disease in Chickens: A Mini review. *J Vet Sci Med Diagn* 6:4. doi: 10.4172/2325-9590.1000238.
- POWELL PC, PAYNE LN (1993). Marek's disease. In J. B. McFerran & M.S. McNulty (Eds.). *Virus Infections of Birds*. pp.:37-77. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.
- POWELL PC (1975). Immunity to Marek's disease induced by glutaraldehyde-treated cells of Marek's disease lymphoblastoid cell lines. *Nature* (London) **257**:684-685.
- RENZ KG, ISLAM A, CHEETHAM BF, WALKDEN-BROWN SW (2006). Absolute quantification using real-time polymerase chain reaction of Marek's disease virus serotype 2 in field dust samples, feather tips and spleens. *J Virol Methods*, **135**, 186–191.
- RISPENS BH, VAN VLOTEN H, MASTENBROEK N, MAAS HJ, SCHAT KA (1972). Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI988) and its use in laboratory vaccination trials. *Avian Dis*, **16**:108–125.
- ROUSE BT, WELLS RJH, WARNER NL (1973). Proportion of B and T lymphocytes in lesions of Marek's disease: theoretical implications for pathogenesis. *Journal of Immunology*, **110**: 534-539.
- SANDELIN K, ESTOLAT (1974). Occurrence of different subgroups of avian leukosis virus in Finnish poultry. *Avian Pathol*. **3**:159–168.
- SCHAT KA, CHEN CLH, CALNEK BM, CHAR D (1991). Transformation of T-lymphocyte subsets by Marek's disease herpesvirus. *J Virol* **65**:1408–1413.
- SEVOIAN M, CHAMBERLAIN DM (1964). Avian Lymphomatosis. IV. Pathogenesis. *Avian Dis.*, **8**:281-310.
- SCHAT KA, NAIR V (2013). Marek's Disease. In: *Diseases of Poultry*. 13th ed. David E. Swayne John R. Glisson, Larry R. McDougald, Lisa K. Nolan, David L. Suarez, and Venugopal Nair eds. chapter 15. S 515-553.
- SCHAT KA (1981). Role of the spleen in the pathogenesis of marek's disease. *Avian Pathol*. **10**:171-82.
- SHEK WR, CALNEK BW, SCHAT KA, CHEN CH (1983). Characterization of Marek's disease virus-infected lymphocytes: discrimination between cytolytically and latently infected cells. *J Natl Cancer Ins*. **70**: 485 – 91.

- SCHUMACHER D, TISCHER BK, FUCHS W, OSTERRIEDER N (2000). Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MDV-1 mutant. *J Virol.* **74**:11088-11098.
- SILVA RF, GIMENO I (2007). Oncogenic Marek's disease viruses lacking the 132 base pair repeats can still be attenuated by serial in vitro cell culture passages. *Virus Genes*, **34**, 87–90.
- SMITH EJ, NEUMAN NU, OKAZAKI W (1980). Immune response to avian leukosis virus infection in chickens: Sequential expression of serum immunoglobulins and viral antibodies. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* **2**:519–529.
- SPATZ SJ, PETHERBRIDGE L, ZHAO Y, NAIR V (2007). Comparative full-length sequence analysis of oncogenic and vaccine (Rispens) strains of Marek's disease virus. *J Gen Virol.* **88**: 1080–1096.
- SPATZ SJ, SILVA RF (2007). Polymorphisms in the repeat long regions of oncogenic and attenuated pathotypes of Marek's disease virus 1. *Virus Genes* **35**: 41–53.
- TOMIKAWA T, OHASHI K, ONUMA M (2001). Incidence of Marek's disease virus infection of a white-fronted goose (*Anser albifrons*) at Lake Miyajima-numa, Hokkaido. *Zoo Wild life News.* **13**:28–29.
- THE TAXONOMICON (2013). Erişim Adresi: URL: <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=214571>. Erişim Tarihi: 14.12.2017.
- TULMAN ER, AFONSO CL, LU Z, ZSAK L, ROCK DL, KUTISH GF (2000). The genome of a very virulent Marek's disease virus. *J Virol.* **74**:7980–7988.
- VENUGOPAL N, PAYNE LN (1995). Molecular pathogenesis of marek's disease recent developments. *Avian Pathol.* **24**:597-609.
- VENUGOPAL N (2018). Spotlight on avian pathology: Marek's disease *Avian Pathol.* **47**: 440–442 <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1484073>.
- VOELCKEL K, BERTRAM E, GIMENO I, NEUMAN NU, KALETAE F (1999). Evidence for Marek's disease in turkeys in Germany: detection of MDV-1 using the polymerase chain reaction. *Acta Virol.* **43**:143–147.
- YAVUZ O (2014). Konya ve Afyon Bölgesindeki Ticari Tavuk İşletmelerinde Marek Hastalığının Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Yöntemlerle Araştırılması. Selçuk Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Entitüsü. Doktora tezi. KONYA.
- WITTER RL, NAZERIAN K, PURCHASE HG, BURGOYNE GH (1970). Isolation from turkeys of a cell-associated herpes virus antigenically related to Marek's disease virus. *Am J Vet Res*, **31**:525–538.

- WITTER RL, SOLOMON JJ, SHARMA JM (1974). Response of turkeys to infection with virulent Marek's disease viruses of turkey and chicken origins. *Am J Vet Res.* **35**:1325–1332.
- WITTER RL, SCHAT KA (2003). Marek's disease In: Saif YM, Barnes HJ, Fadly AM, Glisson JR, McDouglad LR, Swayne DE, editors. *Diseases of poultry*, 11 ed, Iowa, Iowa State University Press;.p.: 407-65.
- WITTER RL, CALNEK BM, BUSCAGLIA C, GIMENO IM, SCHAT KA (2005). Classification of Marek's disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology. *Avian Pathol.* **34**:75–90.
- WITTER RL (1997). Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Dis.* **41**: 149-163.doi: 10.2307/1592455.
- WONIAKOWSKI G VE NICZYPORUK JS (2016). Mareks Disease Virus (Gallic Herpesvirus 2) and Herpesvirus of Turkey (Melagrid Herpesvirus 1) from: Molecular Detection of Animal Viral Pathogens Routledge. Accessed on: 14 Oct 2018 <https://www.routledgehandbooks.com/doi/10.1201/b19719-ch87>.
- ZELNIK V (2004). Diagnosis of Marek's disease. In: *Marek's Disease: An Evolving Problem*. F. Davison and V. Nair, eds. Elsevier Academic Press, Oxford. 157–167.
- ZHUANG X, ZOU H, SHI H, SHAO H, YE J, MIAO J, WU G, QIN A (2015). Outbreak of Marek's disease in a vaccinated broiler breeding flock during its peak egg-laying period in China. *BMC Vet Res.* **11**: 157.
- ZHU GS, OJIMA T, HIRONAKA T, IHARA T, MIZUKOSHI N, KATO A, USEDAS, HIRAI K (1992). Differentiation of oncogenic and nononcogenic strains of Marek's disease virus type 1 by using polymerase chain reaction DNA amplification *Avian Dis.* **36**(3):637-45.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Özlem KARDOĞAN

Doğum yeri ve tarihi: Tatvan

Uyruğu: TC

Medeni durumu:

Askerlik durumu:

İletişim adresi ve telefonu:

II- Eğitimi

Doktora: Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı (2013).

Yüksek Lisans: Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı (2003)

Lisans: Veteriner Hekim (Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2001)

Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları

IV- Mesleki Deneyimi

- Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvar Şefi (Ağustos 2017- Devam ediyor).
- Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Epidemiyoloji Birimi (Nisan 2016- Ağustos 2017).
- Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı (Haziran 2013- Nisan 2016).
- Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Bakteri Teşhis Laboratuvarı. (Eylül 2012-Haziran 2013).
- Bolu Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü/ Göynük İlçe Müdürlüğü.
- Bitlis Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü / Güroymak İlçe Müdürlüğü.
- 2001-2003 Tatvan Et ve Balık Kombinası.

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI- Bilimsel İlgili Alanları Yayınları

- KARDOĞAN Ö (2003). Köpeklerde Xylazin Hidroklorürle premedikasyon propofolle induksiyon halotanla genel anestezi. Yüksek. Lisans Tezi. VAN
- KARDOĞAN Ö (2013). Tavuk ve Hindilerde Xylazin Hidroklorürle Premedikasyon Etomidat, Ketamin Hidroklorür ve Propofol ile Sağlanan Anestezinin bazı Hematolojik Biyokimyasal ve Klinik parametreler açısından araştırılması. Sağlık Bilimleri Entitüsü. Doktora Tezi. VAN.
- KARDOĞAN Ö, TAŞ A (2014). Tavuk ve Hindilerde Xylazin Hidroklorürle Premedikasyon Etomidat, Ketamin Hidroklorür ve Propofol ile Sağlanan Anestezinin Klinik Parametreler Açısından Araştırılması *Veteriner Mikrobiyoloji Derg.* 25, 1.
- KARDOĞAN Ö, TAŞ A (2015). The effects of anesthesia by etomidat, propofol and ketamine hydrochloride on some hematological biochemical parameters in chickens and turkeys. International Congress on Applied Biological Sciences Abstrat Book. Sy.1.
- DAKMAN A, MÜŞTAK HK, KARDOĞAN Ö, DİVANOĞLU Y, AKAN M (2014). Türkiye’de 2013 Yılında İzole Edilen Newcastle Viruslarının Biyolojik, Moleküler ve Filogenetik Tiplendirilmesi. XI Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi. Antalya.
- DAKMAN ASİYE, MÜŞTAK HAMİT KAN, KARDOĞAN ÖZLEM, KESKİN EMRE, DİVANOĞLU YÖRÜK, YENER YAVUZ, YAŞARER AYLİN, COŞAR MUSTAFA, GÜLEÇ METİN, EKİCİ SEDA, AKAN MEHMET (2015). Phylogenetic Analysis and Biological Characterisation of Newcastle Disease Viruses isolated in Turkey between 2012 to 2014. 32. Dünya Veteriner Hekimliği Kongresi (Sözlü Bildiri).
- GÜNAYDIN ELÇİN, SEN SELAHATTİN, DİKER KADİR SERDAR, KARATAŞ YENİ DERYA, KARDOĞAN ÖZLEM, MÜŞTAK HAMİT KAN, SAHAN ÖZLEM, ZAFER MÜBECCEL (2015). Molecular Typing of Common Salmonella Serovars in Turkey. 32. Dünya Veteriner Hekimliği Kongresi (Sözlü Bildiri).
- GÜNAYDIN ELÇİN, S ŞEN ELAHATTİN, DİKER K. SERDAR, YENİ KARATAŞ DERYA, KARDOĞAN ÖZLEM, MÜŞTAK H. KAN, ŞAHAN ÖZLEM (2017). Yaygın Salmonella Serovarlarının Moleküler Tekniklerle Tiplendirilmesi Molecular Typing of Common Salmonella Serovars *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 2017; 28 (2): 85-95.
- MÜŞTAK İNCİ BAŞAK, KARDOĞAN ÖZLEM, MÜŞTAK HAMİT KAN (2018). Molecular Typing Of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis Isolated from Gull, Goose and chickens with Pulsed Field Gel Electrophoresis. 2nd International Congress of Veterinary Microbiology. Poster