



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM
DALI



**ÖNEMLİ KANATLI SOLUNUM YOLU VİRUSLARININ REAL-
TIME POLYMERASE CHAIN REACTION (rPCR) İLE
ARAŞTIRILMASI**

ÖZGE ARDIÇLI

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2021





T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**ÖNEMLİ KANATLI SOLUNUM YOLU VİRUSLARININ REAL-TIME
POLYMERASE CHAIN REACTION (rPCR) İLE ARAŞTIRILMASI**

Özge ARDIÇLI

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof. Dr. K. Tayfun CARLI

DDP(V)-2016/11- BUÜ BAP

BURSA-2021

**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum “Önemli Kanatlı Solunum Yolu Viruslarının Real-Time Polymerase Chain Reaction (rPCR) ile Araştırılması” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden olduğunu belirtir ve beyan ederim.

**Özge Ardıçlı
24.05.2021**

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

24/05/2021

Adı Soyadı: Özge ARDIÇLI

Anabilim Dalı: Veteriner- Mikrobiyoloji

Tez Konusu: Önemli Kanatlı Solunum Yolu Viruslarının Real-Time Polymerase Chain Reaction (rPCR) ile Araştırılması

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>AÇIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. K. Tayfun CARLI

İmza:

İÇİNDEKİLER

DIŞ KAPAK	
İÇ KAPAK	
ETİK BEYANI.....	II
KABUL ONAY.....	III
TEZ KONTROL BEYAN FORMU.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TÜRKÇE ÖZET.....	VII
İNGİLİZCE ÖZET.....	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus (IBV)	3
2.2. Infectious Laryngotracheitis Virus (ILT)	13
2.3. Avian Metapneumovirus (aMPV)	21
2.4. Avian Reovirus (ARV).....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. Etik Kurul İzin Belgesi.....	37
3.2. Örnekler.....	37
3.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	40
3.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	41
3.5. Çalışmada Kullanılan Primer Dizileri	44
3.6. Çalışmada Kullanılan Solüsyon ve Tamponların Hazırlanması.....	45
3.7. rPCR’da Kullanılan Pozitif ve Negatif Kontroller	47
3.8. AIV İzolasyonu	47
3.9. NDV İzolasyonu.....	48
3.10. IBV İzolasyonu.....	48
3.11. ILTV İzolasyonu	49
3.12. aMPV İzolasyonu	49
3.13. ARV İzolasyonu	50
3.14. AIV ve NDV için HA ve HI testleri.....	50
3.15. SPF ETY Örneklerinden Nükleik Asit İzolasyonu	51
3.16. rPCR	53
3.16.1. IBV’nin Real-Time Reverse Transcriptase PCR (rRT-PCR) ile İdentifikasyonu	53
3.16.1.1. PCR ürünlerinin görüntülenmesi.....	55
3.16.1.2. PCR ürünlerinin saflaştırılması	55
3.16.1.3. Dizileme İşlemleri.....	55
3.16.1.4. Filogenetik analiz	56
3.16.2. ILTV’nin rPCR ile İdentifikasyonu	56
3.16.2.1. PCR ürünlerinin görüntülenmesi.....	58
3.16.2.2. PCR ürünlerinin saflaştırılması	58

3.16.2.3. Dizileme İşlemleri.....	58
3.16.2.4. Filogenetik analiz.....	58
3.16. 3. aMPV'nin rRT-PCR ile identifikasyonu	60
3.16. 4. ARV'nin rRT-PCR ile identifikasyonu	60
4. BULGULAR	62
4.1. ETY'ye inokulasyon sonuçları.....	62
4.2. Hemaglutinasyon sonuçları	62
4.3. rPCR	63
4.4. Çoklu viral enfeksiyon varlığı	63
4.5. IBV için rRT-PCR bulguları	65
4.5.1. Dizileme İşlemleri ve Filogenetik Analiz Bulguları.....	68
4.6. ILTV için rPCR bulguları.....	70
4.6.1. Dizileme İşlemleri ve Filogenetik Analiz Bulguları.....	73
4.7. aMPV	76
4.8. ARV.....	79
4.9. Enfeksiyonların görüldüğü bölgeler	82
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	83
6. KAYNAKLAR	94
7. SİMGE ve KISALTMALAR	114
8. EKLER.....	116
9. TEŞEKKÜR	119
10. ÖZGEÇMİŞ.....	120

TÜRKÇE ÖZET

Bu çalışmada solunum yolu problemleri tavuklarda Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus (IBV), Infectious Laryngotracheitis Virus (ILTV), Avian Metapneumovirus (aMPV) ve Avian Reovirus (ARV) aranması ve IBV ve ILTV izolatlarının genetik karakterizasyonlarının yapılması hedeflendi. Bu amaçla Türkiye’de 15 ilde yer alan 45 yumurtacı ve 48 broyler kümeslerindeki tavuklara ait trakeal svablardan virus izolasyonu için ‘Specific Pathogen Free’ embriyolu yumurtalara ekim yapıldı. Bu yumurtaların koryoallantoik sıvılarında Newcastle Disease Virus (NDV) ve Avian Influenza Virus (AIV) varlığı Hemagglutinasyon ve Hemagglutinasyon İnhibisyon testleri ile saptandı. IBV, ILTV, aMPV ve ARV’ları ise Real-Time PCR (rPCR) testleri ile tanımlandı. İdentifikasyon işlemleri sonucunda örneklerin hiçbirinde NDV ve AIV saptanmazken, yumurtacı örneklerinin 21’inde (%46,67) IBV, 10’unda (%22,22) ILTV, 6’sında (%13,33) aMPV ve 2’sinde (%4,44) ARV, broyler örneklerinin ise 28’inde (%58,33) IBV, 1’inde (%2,22) ILTV, 4’ünde (%8,33) aMPV ve 10’unda (%20,83) ARV varlığı tespit edildi. İncelenen yumurtacı ve broyler tavuklara ait örneklerin sırasıyla 5’inde (%11,11) ve 1’inde (%2,08) IBV+aMPV, 1’inde (%2,22) ve 5’inde (%10,42) IBV+ARV ikili olarak bulunurken, broyler örneklerinin ise 2’sinde (%4,17) IBV+aMPV+ARV üçlü olarak saptandı. Birden fazla etken bulunan toplam örnek oranı %15,05 olarak hesaplandı. ILTV saptanan örneklerde başka bir virus belirlenmedi. Ayrıca yumurtacı ve broyler tavuk örneklerinin hiçbirinde ARV+aMPV ikili olarak saptanmadı. ILTV izolatlarının genetik karakterizasyonları sonucunda hepsinin saha suşu ve düşük virulensli oldukları kararına varıldı. IBV’ye ait *S1* gen bölgesinin dizileme işlemi 5 örnekte başarılı oldu. Bu örneklerden 3’ünün 4/91 genotipi ile; diğer 2’sinin ise IS/1494/06 (İsrail Var2) genotipi ile %99 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. Elde edilen sonuçların kanatlı endüstrisine faydalı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kanatlı solunum virusları, Tavuk, PCR, ILTV, IBV

İNGİLİZCE ÖZET

Investigation of important avian respiratory virus infections by Real-Time PCR.

In this study, it was aimed to search Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus (IBV), Infectious Laryngotracheitis Virus (ILTV), Avian Metapneumovirus (aMPV), and Avian Reovirus (ARV) and to perform genetic characterization of IBV and ILTV isolates in chickens with respiratory problems. For this purpose, “Specific Pathogen Free” embryonated chicken eggs were inoculated for virus isolation from tracheal swabs of chickens in 45 layers and 48 broiler flocks located in 15 provinces in Turkey. The presence of Newcastle Disease Virus (NDV) and Avian Influenza Virus (AIV) in the chorioallantoic fluid of these eggs was detected by Hemagglutination and Hemagglutination Inhibition tests. IBV, ILTV, aMPV, and ARV were identified by Real-Time PCR (rPCR) tests. As a result of the identification process, NDV and AIV were not detected in any of the samples; concerning layer samples, the presence of 21 (46.67%) IBV, 10 (22.22%) ILTV, 6 (13.33%) aMPV, and 2 (% 4.44) ARV were detected, whereas, IBV in 28 (58.33%), ILTV in 1 (2.22%), aMPV in 4 (8.33%) and 10 (20.83%) ARV were detected in broiler samples. Of the layers and broiler chickens examined, respectively, IBV+aMPV in 5 (11.11%) and 1 (2.08%), IBV+ARV in 1 (2.22%), and 5 (10.42%) were found to be dual infections while IBV+aMPV+ARV were detected as triple in 2 (4.17%) broiler samples. The total sample rate with more than one agent was calculated as 15.05%. No other virus was detected in ILTV detected samples. In addition, ARV+aMPV was not detected as a dual infection in any of the layers and broiler chicken samples. Regarding the genetic characterization of ILTV isolates, it was concluded that they were all field strains and low virulence. Sequencing of the S1 gene region of IBV was successful in 5 samples. It was determined that 3 of these samples to 4/91 genotype and the other 2 were 99% similar to the IS / 1494/06 (Israel Var2) genotype. It is thought that the present results will be beneficial in the poultry industry.

Keywords: Avian respiratory viruses, Chicken, PCR, ILTV, IBV

1. GİRİŞ

Bu çalışmada, Türkiye’de tavukçuluk sektörü için ekonomik yönden oldukça önemli olan solunum yolu hastalıklarında rol oynayan solunum viruslarının varlığı saptanmış olup; enfeksiyonların birliktelikleri değerlendirilmiştir. Bunun yanı sıra, güncel olarak büyük öneme sahip Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus (IBV) ve Infectious Laryngotracheitis Virus (ILTV) enfeksiyonlarında elde edilen izolatların genetik karakterizasyonu yapılmıştır. Kanatlı solunum yolu enfeksiyonları kanatlı sektörü açısından son derece önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu enfeksiyonlarla mücadele amacıyla enfeksiyonların endemik olduğu yörelerde uygun aşı ve aşılama programları düzenlemektedir. Bu aşı programlarının ve stratejilerinin oluşturulması için öncelikle solunum yolu viruslarının hastalık vakalarındaki sıklıklarının ortaya koyulması ve etkili bir şekilde teşhis edilmeleri gerekmektedir. Bu viruslardan IBV ve ILTV’nin genetik karakterizasyonlarının gerçekleştirilerek tanımlanması gerekmektedir. Bu amaçla IBV için *SI* gen bölgesi, ILTV için Infected Cell Polypeptide 4 (*ICP4*) ve Thymidine Kinase (*TK*) gen bölgeleri hedef alınarak gerçekleştirilen genotiplendirme işlemleri özel önem arz etmektedir. Rutin teşhis laboratuvarlarında kanatlı solunum yolu enfeksiyonlarının tanısı genellikle ELISA gibi bir serolojik test ile spesifik antikorların artışı temel alınarak yapılmakta ve çoğu zaman virusun izolasyonu ve identifikasyonunu gerektirmektedir. Virus izolasyonu enfeksiyonların teşhisinde ‘gold standart’ (altın standart) yöntemdir. Bu bağlamda bu çalışmada da örnekler spesifik patojen ari (Specific Pathogen Free: SPF) embriyolu tavuk yumurtalarında (ETY) izole edilmiş ve virus izolatlarına ait genetik değerlendirme her virusa özel geliştirilmiş olan primerler kullanılarak Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time Polymerase Chain Reaction: rPCR) metodu ile gerçekleştirilmiştir. Günümüzde, gelişen PCR teknikleri ile virus izolatlarının tiplendirilmesi etkili bir şekilde yapılabilmektedir. Daha da ötesi bu teknikler, teşhislerin

virusun izolasyonuna bile gerek kalmadan güvenilir, hızlı ve göreceli olarak ekonomik bir şekilde gerçekleştirilebilmesine olanak sağlamıştır. Dolayısıyla, bu nükleik asit tabanlı-tanı teknikleri rutin tanıda da yaygın olarak yerlerini almıştır. Solunum yolu viruslarından ILTV'nin PCR-temelli yöntemler yardımıyla yapılan genetik karakterizasyonu, elde edilen izolatların saha suşu veya aşı suşu kökenli olduğunun belirlenmesi ILTV'ye ait klinik vakaların sahada aşılama sonucunu meydana gelip gelmediğinin ortaya konulması açısından büyük öneme sahiptir. Bununla birlikte, bu yöntemler ile virulensin genetik açıdan değerlendirilmesi, sahada hastalığın verdiği ekonomik zararın virusun virulensi ile ne oranda örtüştüğünün belirlenebilmesine de izin verecektir. IBV izolatlarının *SI* gen bölgesi analizleri, sahada enfeksiyon tablolarından sorumlu IBV suşları ile hali hazırda bölgede kullanılan aşı suşlarının birbirlerinin protektotipleri olarak ne derece yakın olduklarına karar vermede son derece pratik öneme sahiptir. Bu bağlamda bu çalışmanın sonuçları, Türkiye kanatlı sektöründe solunum yolu viruslarının tam olarak ne sıklıkla ve aynı zamanda hangi düzeyde birlikte bulduklarının tablosunu sunacak ve IBV ve ILTV açısından kullanılan veya kullanılacak aşılama tipleri ve aşılama stratejilerine yön verecek, literatürde olmayan orijinal veriler niteliğindedir.

2. GENEL BİLGİLER

Kanatlı solunum yolu enfeksiyonları ülkemizde ve tüm dünyada ekonomik açıdan çok önemli bir yere sahiptir. Bu enfeksiyonlardan korunmanın ana stratejisini sıkı biyogüvenlik tedbirleri içinde özellikle aşılama oluşturur. Aşılamaların anlamlı bir şekilde yapılması için, ilgili enfeksiyonun prevalans ve insidansının iyi belirlenmesi gerekir. Bu bağlamda bir enfeksiyonun güvenilir teşhisi, bu enfeksiyonun ne denli bir yaygınlıkta olduğunun belirlenmesinde kritik öneme sahiptir. Bundan dolayı aşağıda kanatlı viral solunum yolu enfeksiyonlarının etkenleri, tanısı, etkenlerinin karakterizasyonu ve kısmen de olsa korunmaları konusunda burada yürütülen çalışmayla ilgili sınırlı kalmak kaydı ile bilgi verilecektir. Çalışmamıza ihbarı mecburi olduğu için ve diğer solunum yolu etkenleriyle ilgili sahadaki enfeksiyon sıklığı tablosunu daha net görebilmek için, Newcastle Disease (ND) ve Avian Influenza (AI) Virusları dahil edilmemiş, bu etkenlerin olmadığı klinik saha örneklerinde diğer viral etkenler saptanarak sahadaki viral enfeksiyonların sıklıkları ve birliktelikleri irdelenmiştir.

2.1. Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus (IBV)

Infectious Bronchitis (IB) ilk kez 1930 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nin Kuzey Dakota eyaletinde civcivlerde görülen yeni bir solunum yolu hastalığı olarak tanımlanmıştır. IB'ye ait olguların klinik bulguları ve laboratuvar çalışmalarını içeren ilk rapor Schalk ve Hawn tarafından 1931'de bildirilmiştir (Schalk & Hawn, 1931). Beaudette ve Hudson ilk defa 1937 yılında virüsü ETY'de izole etmiştir (Beaudette, 1937). 1941'de Van Roekel günümüzde kullanılan aşılama programlarının gelişmesi yönünde ilk adımı atmıştır (Van Roekel, Bullis, Flint, & Clarke, 1942). Jungherr ve ark.'ın raporunda 1951 yılında izole edilen Connecticut izolatu ile 1941 yılında izole edilen Massachusetts izolatu aynı hastalığı meydana getirdiği fakat çapraz koruma

veya çapraz n3tralizasyon oluşturmadığı bildirilmiştir. Jungherr'in raporu, Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus'un (IBV) birden fazla serotipinin olduğunu g3steren ilk bildiridir (Cavanagh & Gelb Jr, 2008; Jungherr, Chomiak, & Luginbuhl, 1956). 1960'lı yıllarda Winterfield & Hitchner (1962), bazı IBV suşlarının nefritise sebep olduğunu ve Gray ve Holte nefropatojenik suşların izole edildiğini bildirmiştir.

IBV *Nidovirales* takımından, *Cornidovirineae* alt takımından, *Coronaviridae* ailesinden *Orthocoronavirinae* alt ailesinden bir *Gammacoronavirus*'tur (ICTV Taxonomy, 2018b). *Gammacoronavirus* genusu, IBV, Turkey Coronavirus (TCoV) ve diğer kanatlı t3rlerinden ve bazı memelilerden (SW1) izole edilen coronavirusları içermektedir (Cavanagh, 2005; Jackwood & de Wit, 2013; ICTV Taxonomy, 2018b). IBV, 3zellikle tavuklarda 3nemli enfeksiyonlara neden olmakla birlikte s3l3n ve tavus kuşlarında da g3r3lebilmektedir. Ayrıca hindi, çamur 3rdeği, kaz, g3vercin, be tavuğu, keklik ve 3rdeklerden de IBV benzeri viruslar izole edilmiştir (Cavanagh, 2005; Hughes et al., 2009).

D3nya çapında g3r3len IBV, inhalasyon ya da enfekte olmuş kuşlara direkt temas veya kontamine altlık, ekipman ve fomitler ile bulaşmaktadır. Virus kuluçkadaki yumurtaların kabuk y3zeyinde bulunabilir ancak vertikal olarak bulaşmamaktadır. Kabuktaki virusun kaynağı, ovidukt ve gastrointestinal yoldan geçiştir. İnsanlarda ise IBV enfeksiyonu ile ilgili bir bildirim bulunmamaktadır (Jackwood & de Wit, 2013).

IBV, ekonomik y3nden 3nemli, oldukça bulaşıcı, akut 3st solunum yolu hastalığına neden olan bir virustur (OIE, 2018a). Bununla birlikte virus b3brek, ovaryumlar ve enterik alanlardaki epitelyal h3crelerde de çoğalabilmektedir (Chac3n et al., 2014; Ganapathy et al., 2012; Jones & Jordan, 1972; Meulemans, Carlier, Gonze, Petit, & Vandenbroeck, 1987). IBV'nin genellikle g3z ardı edilen dikkat çekici bir 3zelliği de farklı tavuk ırklarında hastalığın şiddetinin değişkenlik g3sterebilmesidir (Cavanagh, 2007).

Genç tavuklarda IBV enfeksiyonu 3zellikle 3st solunum yolu hastalığına neden olmaktadır. Broylerlerde solunum yolu bulgularıyla birlikte d3ř3k canlı ağırlık artışı ve yemden yararlanma g3r3lmektedir. Ayrıca enfeksiyon, broylerleri sekonder fırsatçı bakteriyel enfeksiyonlara predispoze hale getirerek airsacculitis, perikarditis ve

perihepatitise yol açabilir. Morbidite her zaman %100 olmakla birlikte yaş, konakçının immun durumu, suş tipi ve sekonder bakteriyel veya viral patojenlerle enfekte olup olmaması gibi faktörler nedeniyle mortalite %0 ile %82 arasında değişebilmektedir (Jackwood & de Wit, 2013). Bunun yanı sıra nefropatojenik olan bazı IBV suşları böbrek hasarına bağlı olarak yüksek mortaliteye neden olmaktadır (Cook et al., 2001; Li & Yang, 2001).

Yumurtacı ve damızlık tavuklarda enfeksiyon yumurta üretiminde %70'e varan azalmaya ve düşük kabuk kalitesine yol açmaktadır. Virus ovidukta çoğalabildiği için genç tavuklarda ve yarkalarda meydana gelen çok uzun süreli verim düşüklükleri ve "sessiz veya yalancı yumurtacı sendromu" oluşumu ile karakterizedir. Koyu renkli yumurta üreten ırklarda ise soluk kabuk rengi ve albümin vizkozitesinde azalma görülür (Cook, Jackwood, & Jones, 2012; Jackwood & de Wit, 2013; Jones & Jordan, 1972).

IBV zarflı, küresel yapılı, pleomorfik şekilli bir virustur. Yaklaşık 120 nm çapında olan virus partikülleri yüzeyde diken şeklinde çıkıntılar (spike) içermektedir. Her biri yaklaşık 20 nm olan bu yüzeysel çıkıntılar virusa taç şeklinde bir görünüm kazandırmaktadır. Virusun isminin kaynağı da bu görüntüdür ("Corona" Latince de taç anlamına gelmektedir) (Cavanagh & Gelb Jr, 2008; Jackwood & de Wit, 2013).

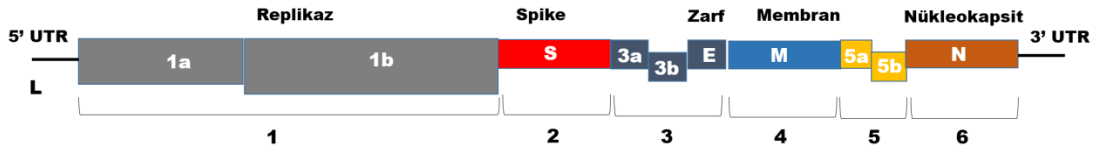
IBV suşları sükröz içeriklerine göre dansite farklılıkları ile ayrılabilir. Bu bağlamda yüzeysel çıkıntıları tam olarak taşıyan suşlarda dansite, 1,18 g/ml ve daha az çıkıntı taşıyanlarda ise 1,15 g/ml gibi çok daha az değerler alabilir (Jackwood & de Wit, 2013). IBV diğer coronaviruslar gibi ısıya duyalı olup 15 dakika boyunca 56°C'de tutulduğunda inaktive olur. Ancak protein içeren örneklerde virusun inaktive edilebilmesi için 60°C'de en az 30 dakika bekletilmelidir (Rabenau et al., 2005). IBV'nin uzun süre depolanabilmesi için -20°C'de tutulması önerilmektedir. Hayatta kalma süresi ilkbahar aylarında 12 gündür. Ancak hava sıcaklığının donma seviyesinin altına olduğu durumlarda 56 gün boyunca hayatta kaldığı bildirilmiştir. Bununla birlikte teşhis için yapılan laboratuvar işlemlerinde her zaman soğuk zincirin korunması gerekmektedir (Jackwood & de Wit, 2013). İnfeksiyöz allantoik sıvıdaki viruslar liyofilize edilmiş vakumlanmış ve soğutucuda muhafaza edilmiş şekilde en az 30 yıl boyunca varlığını sürdürebilir (Cavanagh & Gelb Jr, 2008). IBV'ye ait pH stabilitesi

farklı virus suşlarında oldukça yüksek değişkenlik gösterebilmektedir. Hücre kültüründeki IBV, pH 7,0-8,0 değerlerine göre pH 6,0-6,5 olan mediumlarda daha stabildir (Alexander & Collins, 1975). IBV, 4°C'de 18 saat boyunca yapılan inkübasyonda, eter, %50 kloroform ve %0,1 sodyum deoxycholate gibi kimyasallara duyarlıdır (Jackwood & de Wit, 2013).

Mutasyon ve rekombinasyon süreçleri, RNA viruslarında genetik ve fenotipik varyasyonların ortaya çıkmasıyla birlikte yeni varyant suşların oluşmasına sebep olmaktadır. Tavuklardaki IBV enfeksiyonlarında sıklıkla görülen bu süreçler aynı zamanda konakçının immun sistemi ile de ilişkili olmakla birlikte virus popülasyonuna çeşitlilik kazandırmaktadır (Montassier, 2010).

IBV'ye ait viral genom, tek zincirli pozitif anlamlı ve yaklaşık 27,5-28 kb uzunluğunda RNA'dan oluşmaktadır (Jackwood & de Wit, 2013). IBV genomuna ait temsili şema Şekil 1'de gösterilmiştir. Coronavirus ailesinin diğer üyeleri gibi IBV genomu da yapısal ve yapısal olmayan proteinlerden oluşur. Yapısal proteinler arasında spike (S), zarf (envelope: E), membran (M) ve nükleokapsid (N) bulunur (Bande et al., 2016). S glikoproteini S1 ve S2 olmak üzere (sırasıyla yaklaşık 520 ve 625 aminoasit) iki alt üniteden oluşmaktadır (Cavanagh, 2007; Lai & Cavanagh, 1997). Spike glikoproteininin S1 kısmı, virusun, sialik asit reseptörlerine bağlanarak hücreye girişinde önemli rol oynar. S1'e kovalent olmayan bir şekilde bağlanan S2 alt birimi, viral membranı kapsayan ve S1'i viriona sabitleyen bir trans-membran alanına sahiptir. S glikoproteini virus-hücre zarı füzyonunda ve konakçı hücreye girmesinde rol oynar ve nötralize edici antikörleri indükleyen epitoplara içerir. S1 genindeki değişkenlik, virusun çok sayıda farklı genotip ve serotipinden sorumludur (Jackwood, Hall, & Handel, 2012). S1 gen bölgesi varyasyondan ve bağışıklık savunmasından kaçışından sorumlu olan üç hiper değişken bölge (HVR) içerir. HVR1, HVR2 ve HVR3, sırasıyla 38-67, 91-141 ve 274-387 amino asit pozisyonlarında bulunur (Houta et al., 2021). E proteini virusun bir araya gelmesinde görevli olan bir küçük integral membran proteini ve dolayısıyla E proteininin aminoasit dizilimini kodlayan sekansta meydana gelen bir mutasyon virusun hücrelerde bir arada toplanmasını etkileyebilir (Fischer, Stegen, Masters, & Samsonoff, 1998). Virusa ait M integral proteini, çift katmanlı lipid tabakası içinde yerleşmiş olup

virusun en büyük bölümünü oluşturur. Bu protein aynı zamanda virusu yapısal olarak sağlamlaştıran bir proteindir. M proteininin en önemli özelliklerinden birisi diğer yapısal proteinlerle bağlantılar kurması ve dolayısıyla virus parçalarını bir arada tutarak regülasyon görevi yapmasıdır (Godet, L'Haridon, Vautherot, & Laude, 1992; Abro, 2013). N fosfoproteini viral genomu sarmalar ve bu da virionda helikal nükleokapsid formunun oluşturulmasını ve virus toplanması için gerekli olan M ve E proteinlerindeki interaksiyonların gerçekleştirilmesini sağlar (Jackwood & de Wit, 2013). Farklı virus izolatlarına ait aminoasit dizilimleri değerlendirildiğinde N proteinin oldukça korunmuş olduğu ve sınırlı bir düzeyde (yaklaşık % 2-6) farklılık gösterdiği görülmektedir (Williams, Li, Sneed, & Collisson, 1992). Bu protein aynı zamanda virusa ait replikasyon ve transkripsiyon süreçlerinde etkin rol alması nedeniyle virusun temel yapı unsurlarından birisidir (Jackwood et al., 2012).



Şekil 1. IBV genomu (Jackwood & de Wit, 2020)

Popülasyon genetiği açısından değerlendirildiğinde popülasyonların genetik yapılarının şekillenmesinde mutasyon, rekombinasyon, doğal seleksiyon, genetik sürüklenme ve migrasyon gibi evrimsel olgular büyük rol oynamaktadır. Bu ve benzeri olgular RNA viruslarının evrimini anlamak için vazgeçilmezdir (Moya, Holmes, & González-Candelas, 2004). IBV'nin evrimi kompleks ancak az aydınlatılmış bir süreçtir. Ancak yakın zamanda yapılan çalışmalar bazı 3 önemli faktörün bu süreçte önemli rol oynadığını göstermektedir. 1. RNA polimeraz proofreading özelliğinin bulunmaması nedeniyle RNA genomunda replikasyon hatalarına bağlı mutasyonların 10^{-4} düzeyinde meydana gelmesi 2. Farklı IBV suşları ile formüle edilmiş canlı ve çoğunlukla multiple attenüe aşuların yaygın kullanımı ile meydana gelen etkileşimler 3. Farklı tavuk popülasyonlarında virusların karşılaştığı farklı immun sistem baskıları (Montassier, 2010).

IBV ve diğerk birçok RNA viruslarının genomlarında transkripsiyon sırasında gerçekteşen yüksek hata oranı dikkati çekmektedir (Lai & Cavanagh, 1997). Yeni varyantların oluşmasını sağlayan bu durum konakçıda birçok viral genotipin aynı anda sirkülasyona uğramasına ve virusa ait konakçıda farklı seviyelerde uyum özelliklerinin gelişmesine neden olmaktadır (Quasispecies fenomeni) (Domingo et al., 1985). Bu durum virusun evrimi ve persistensinin değerlendirilmesinde önemlidir ve doğada yeni varyantların sürekli ortaya çıkmasına ve virusların konakçının immun sisteminden kaçmaları için mekanizmalar geliştirilmesine zemin hazırlamaktadır (Montassier, 2010). Bu bağlamda IBV sürekli evrimleşmekte ve yeni antijenik ve/veya patotip varyantlar üretmektedir (Lee, 2002). Bu olgunun önemini vurgulamak amacıyla bir örnek vermek gerekirse IBV'nin ilk izole edildiği 1930'lardan günümüze 50'nin üzerinde farklı serotip bulunmuştur (de Wit, Cook, & Van der Heijden, 2011; Jackwood, 2012).

IBV izolatlarının ayrılabilmesi ve sınıflandırılabilmesi iki ana test türüne dayanmaktadır: 1. Fonksiyonel veya biyolojik testler ve 2. Fonksiyonel olmayan testler. Fonksiyonel sınıflandırma ile viral izolatlar immünotipler, protektotipler ve serotipler olarak gruplandırılabilirken, fonksiyonel olmayan testler, farklı genotiplerin belirlendiği S genindeki dizi varyasyonlarına dayanır. İmmünotip veya protektotip sınıflandırma çok önemlidir çünkü aşı suşlarının koruyucu etkinliği hakkında bilgi sağlar (de Wit, 2000). Ancak günümüzde S proteinin sekansına dayalı olan genotipik sınıflandırmanın daha uygun olduğu bildirilmekte olup bu yöntem yaygın şekilde kullanılmaktadır. Serotip sınıflandırması virusun nötrale edici antikorlarla muamelesi işlemleri, genotipik sınıflandırma ise S1 proteinine ait sekansın değerlendirilmesi ile karakterizedir. Her zaman geçerli bir kural olmamakla birlikte, S1 proteini baz alınarak yapılan dizileme işlemleri sonucunda %90 üzerinde aminoasit benzerliği olan genotipler serolojik olarak yakındır (Jackwood & de Wit, 2013).

Virusun serotiplendirilmesinde, virus nötralizasyon (VN) veya hemagglütinasyon-inhibisyon (HI) testleri kullanılabilir. VN bilinen suşlara karşılık bilinmeyen virus antiserumunun tepkisinin değerlendirilmesine dayanan ve serotip-spesifik antikorların kullanıldığı konvansiyonel bir yöntemdir. Bazı laboratuvarlar ELISA, indirekt immunofloresans testi veya VN testi gibi yöntemlerde bu monoklonal antikorları

kullanmaktadır. Ancak bu antikorlar sadece az sayıda serotip için mevcuttur (de Wit, 2000; Karaca, Naqi, & Gelb Jr, 1992). Suş sınıflandırılmasında kullanılan diğer bir yöntem de HI'dır. Ancak birçok IBV suşu spontan olarak hemaglutinasyon (HA) göstermez ve HA aktivitesi için neurominidase ile muamele edilmesi gerekir (Ruano, El-Attrache, & Villegas, 2000). Günümüzde birçok laboratuvar ise IBV suşlarının karakterize edilmesinde nükleik asit tabanlı genotiplendirme yaklaşımını benimsemektedir. Bu amaçla *S1* geni ya da *S1* genine ait çok değişken bölgenin amplifiye edilmesi için Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) ve bunu takiben yaygın olarak nükleik asit dizilemesi (Lee, Hilt, & Jackwood, 2003; Worthington, Currie, & Jones, 2008) veya daha az olarak Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP) analizi tercih edilmektedir (Kwon, Jackwood, & Gelb Jr, 1993). Birçok suş için tüm genom sekansı yayınlanmıştır ve tüm dünyadan farklı IBV suşlarına ait yapısal protein gen sekansları Genbank veritabanında sunulmuştur (Jackwood & de Wit, 2013).

Uzun yıllar boyunca IBV suşlarının isimlendirilmesinin standardizasyonunda eksiklikler mevcut olmakla birlikte son yıllarda araştırmacılar Cavanagh (2001)'in önerdiği sistemi kullanmaktadır. Temelde IBV suşlarının tanımlanmasında kullanılan düzen şu şekildedir: IBV/kanatlı tipi/köken aldığı ülke/genotip veya serotip/suş ismi/izolasyon yılı. Genellikle IBV yazısı ve kanatlı tipi (tavuktan izole edilen bir izolat olduğu göz önünde bulundurulursa) kullanılmaz ancak izolat bir tavuktan elde edilmemişse bu bilgiyi eklemek önemlidir. Bu bağlamda verilebilecek bazı örnek virus isimleri şu şekildedir: US/Ark/arkdpi/81, US/Mass/Mass41/41, Italy/Italy-02/497/02, China/LX4/QX/99 ve IBV/Pheasant/UK/24/B171-3/99 (Jackwood & de Wit, 2013).

Filogenetik analizler ve Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) yardımıyla *S1* protein sekansının karşılaştırılması sonucunda birçok genotip tanımlanmıştır. Bu genotipler arasında genellikle %10 ve üzeri farklılıkların oluşu koruyuculukla ilgili önemli olarak değerlendirilmektedir. Ancak istisnalar da mevcuttur (Jackwood et al., 2007; Lee et al., 2003). Örneğin US/Conn/Conn46/51 ve US/FL/FL18288/71 suşları farklı genotiplerdir ancak bunların *S1* proteinleri yalnızca %6,2 oranında farklılık göstermektedir. Benzer şekilde, D274 izolatı ile % 97 civarında

benzerlik taşıyan birkaç izolat, serum VN testlerinde farklı serotiplere ait olarak tanımlanmıştır (Cavanagh et al., 1992). Bu sonuçlar ve VN testi ile farkı ortaya konulamayan ancak genetik olarak farklı olduğu bilinen suşlara ait sekanslar, oldukça az sayıda nükleotid değişikliğinin S1 proteininde yer alan nötralizasyon epitoplarının konformasyonel olarak değişiminde etkili olabileceğini göstermektedir (Kant et al., 1992). Çalışmalar suşlar arasındaki çapraz koruma derecesinin bu suşlara ait S1 sekanslarındaki farklılığın artmasıyla düştüğünü göstermektedir (Cavanagh, Elus, & Cook, 1997; Ladman, Loupos, & Gelb Jr, 2006).

IBV için tam S1 dizisinin çeşitliliğine dayalı yeni bir sınıflandırma sistemi önerilmiştir. Bu sistem, 35 genetik soydan oluşan yedi genotipin (GI-GVII) ve aynı zamanda soylar arası rekombinantların varlığını ortaya çıkarmıştır. Genotip GI, 29 genetik soy içerirken, diğer genotiplerin her biri yalnızca bir soy içerir. Massachusetts (Mass) tipi GI-1, 4/91 tipi GI-13, D274 tipi ise GI-12 soyuna aittir. GI-23 soyu, Orta Doğu'da sirküle eden IBV varyantlarını içerir (Houta et al., 2021; Valastro et al., 2016).

Patolojik etkileri değerlendirildiğinde IBV'nin kanatlı sektöründe tek başına çok önemli ekonomik kayıplara yol açtığı görülmektedir (Cavanagh, 2007). IBV'nin önemi, S proteinine ait genetik varyasyonun ve dolayısıyla buna bağlı olarak gelişen çok yüksek antijenik varyasyonun yarım yüzyıl önce fark edilmesiyle oldukça artmıştır. Meydana gelen genetik varyasyonlar delesyon ve insersiyon gibi nokta mutasyonlar ve bazı durumlarda rekombinasyonları içermektedir. Bu genetik varyasyonlar doğada sürekli olarak meydana gelmekte ve patotipleri ve immunitipleri içeren çoklu fenotiplerin oluşmasına neden olmaktadır (Cavanagh & Naqi, 2003).

Moleküler çalışmalar, S1 proteininde meydana gelen çok az sayıda bir değişimin, virus genomunun geriye kalan büyük bölümü hiçbir değişikliğe uğramamasına rağmen, yeni serotip ya da varyantların ortaya çıkabilmesi için yeterli olduğunu göstermiştir (Cavanagh, 2007). Bu durumun meydana gelmesinde yaygın aşı kullanımı nedeniyle meydana gelen immunolojik baskı, miks enfeksiyonlardaki rekombinasyon olasılığı ve aşılama ile yaygın serotiplerin azalması ancak bunun bir sonucu olarak yeni saha suşlarının ortaya çıkması gibi faktörler yer almaktadır (Lee, 2002; Liu et al., 2006). Aşılardan tavuklardan izole edilen IBV'ye ait S1 glikoproteininin çok değişken

bölgelerinde meydana gelen evrim ve mutasyon oranları sırasıyla %2,5 ve %1,5'a ulaşmıştır ancak yapılan aşılama uygulamalarıyla bu oranların değiştiği ve hatta daha düşük seviyelere (%0,3) düştüğü gözlenmiştir (Lee & Jackwood, 2001; McKinley, Hilt, & Jackwood, 2008). IBV enfeksiyonlarına ait epidemiyolojik araştırmalarda elde edilen sonuçlara göre bir suşun bir bölgeden ya da bir ülkeden bir diğerine yayılmasında kuşların uygun olmayan koşullarda yapılan ticareti, vahşi kuşların göçleri ve/veya attenüe aşılarda kullanımı rol oynamaktadır (Cavanagh, 2005; Liu et al., 2006).

IBV için ideal koruma yönetimi sıkı bir izolasyon, yüksek biyogüvenlik ve kümeslerin, kümes ve altlıkla temas eden ekipmanların temizlik ve dezenfeksiyonunu takiben günlük civcivlerin kümese alınması gibi uygulamaları içermektedir (Jackwood & de Wit, 2013). Ancak çiftliklerde bulunan kümes yoğunluğu göz önüne alınırsa IBV'ye karşı etkili bir korunmanın çok zor olduğu ve biyogüvenlik yöntemlerinin sınırlı bir etkisinin olduğu görülmektedir (Cavanagh, 2007). IBV'nin çok yüksek derecede enfeksiyöz olmasından dolayı bronşite bağlı olarak meydana gelebilecek üretim kayıplarının engellenebilmesi için immunizasyonun yaygın bir şekilde gerçekleştirilmesi gerekmektedir (Jackwood & de Wit, 2013). IBV tarafından meydana getirilen enfeksiyonun şiddetinin ve meydana gelebilecek olası kayıpların değerlendirilmesinde, enfeksiyon meydana geldiğinde kümesteki sürünün yaşı ve beslenme durumu ve benzeri çevresel faktörler ve aynı zamanda virus suşunun orijini de önemli bir yer tutmaktadır (Cavanagh, 2007). Enfeksiyondan kurtulan ya da aşılanmış olan tavuklar aynı virusla enfekte olmaya karşı dirençlidir (homolog koruma). Ancak farklı IBV suşlarıyla karşılaşmada korunma durumuna (heterolog koruma) değişiklik gösterebilmektedir (Jackwood & de Wit, 2013).

Aşılama programlarının amacı izolatlarla ait antijenik spektrumun belirli bir ülke ya da bölgede korunmasıdır. Bu amaçla, Massachusetts serotipine ait Mass/Mass41/41 ve Mass/H120/55 suşları birçok ülkede yaygın olarak kullanılmaktadır. Tek bir serotipten oluşan aşılarda yeterli korumayı sağlamadığı durumlarda başka aşı serotipleri programa dahil edilebilmektedir. IBV immunizasyonunda hem canlı hem de inaktif virus aşılarda kullanılmaktadır. Canlı aşılarda et-tipi tavuklarda tercih edilmektedir. Başlangıç aşılması olarak kuluçkahanelerde 1 günlük civcivlerde kullanılan bu aşılarda, damızlık ve

yarkalarda immunizasyonu sağlamak amacıyla uygulanmaktadır (Cavanagh, 2007; Jackwood & de Wit, 2013). Canlı aşılar da kullanılan IBV suşları, embriyolu yumurtada gerçekleştirilen bir dizi seri pasaj ve bazen de sıcak uygulaması kombinasyonu ile attenüe edilmektedir (Bijlenga, Cook, Gelb Jr, & de Wit, 2004). İmmünojenisitedeki düşüşleri engellemek amacıyla çok geniş pasajlamalardan kaçınılmalıdır. Attenüasyonun seviyesi ve stabilitesi genellikle aşılar arasında değişiklik gösterebilmektedir. Özellikle yetersiz aşılama programlarının bir sonucu olarak tavuklarda aşı viruslarının virulansının arttığı görülmekte ve bu da aşı uygulamalarıyla birlikte değişebilen virulans ve enfeksiyon potansiyelini göstermektedir (Jackwood & de Wit, 2013).

Ülkemizde Akan, İzgür, & Sareyyüpoğlu (2007) tarafından broyler, broyler damızlık ve yumurtacı tavuk kümeslerinden alınan örnekler IBV varlığı yönünden RT-PCR ve floresan antikor tekniği (FAT) ile karşılaştırılmış ve sonuç olarak RT-PCR'ın daha güvenilir ve spesifik olduğu bulunmuştur. Kahya, Coven, Temelli, Eyigor, & Carli (2013) IBV'nin genetik karakterizasyonunu yapmış ve Türkiye'deki damızlık ve broyler sürülerinde IS/1494/06 suşunu tespit etmiştir. Yılmaz et al. (2016) yaptığı çalışmada, yumurtacı tavuk ve broyler sürülerden saptanan IBV izolatlarından yapılan genotiplendirme sonucunda broylerlerde %48,9 oranında IS/1494/06 genotipi ve %17,2 oranında H120 genotipi, yumurtacılar da ise 7 adet IBV izolatının tümünü 4/91 genotipi olarak belirlemişlerdir. Aynı yıl Aral (2016) tarafından yapılan bir çalışmada da solunum sistemi problemi görülen tavuk sürülerinden elde edilen 41 IBV izolatının 35 adedini IS/1494/06 ilişkili ve 6 adedini ise M41-ilişkili olarak saptayarak IBV sorunlarının çoğunun Israel Var2 olduğunu desteklemişlerdir.

IBV hala ülkemizde hem yumurtacı tavuklarda hem de broylerlerde önemli verim düşüklüklerine neden olmakta dolayısıyla kanatlı sektörüne pratikte ciddi ekonomik kayıplar yaşatmaktadır. IBV'nin sürekli monitorize edilerek genotiplerinin saptanması bu virusun zaman içinde genetik yapısını değiştirdiği göz önünde bulundurulduğunda bir zorunluluktur. Bu nedenle SI-geni temelli genotiplendirme çalışmaları sahada bu enfeksiyondan korunmayla ilgili mantıklı aşı suşlarının seçiminde bize pratikte en yol gösterici olacaktır.

2.2. Infectious Laryngotracheitis Virus (ILTV)

Infectious Laryngotracheitis (ILT), tavuklarda Infectious Laryngotracheitis Virus'un (ILTV) neden olduğu bir solunum yolu hastalığıdır. Bu virus aynı zamanda Gallid alphaherpesvirus 1 (GaHV-1) olarak da bilinmektedir (García, Spatz, & Guy, 2013). Bu hastalık ilk olarak May & Tittsler (1925) tarafından 1925 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde bildirilmiştir. Bu hastalık başlangıçta infectious bronchitis, tracheolaryngitis, infectious tracheitis ve avian diphtheria olarak çeşitli isimlerle kullanılmış, 1931 yılında Amerika Veteriner Hekimleri Birliđi Kanatlı Hastalıkları Özel Komitesi hastalığın adını "Infectious Laryngotracheitis" olarak değiştirmiştir (Cover, 1996). 1934 yılında Brandly ve Bushnell virulent virusu kloakaya uygulayarak tavukların immunizasyonu için bir yöntem geliştirmişlerdir (Brandly & Bushnell, 1934). ILT kanatlılarda etkili aşı geliştirilen ilk viral hastalıktır (Guy & García, 2008).

ILTV, *Herpesviridae* ailesi içinde, *Alphaherpesviridae* alt ailesinde *Iltovirus* genusunda sınıflandırılmıştır (ICTV Taxonomy, 2015b). Virusun doğal konakçısı tavuktur. Her yaştaki kanatlılar duyarlı olmasına rağmen hastalığın en karakteristik belirtileri en erken üç haftalıktan itibaren görülür (Dufour-Zavala, 2008). Virusun sülünlerde, sülün-tavuk melezlerinde ve tavus kuşlarında da hastalığa neden olduğu bildirilmiştir (Crawshaw & Boycott, 1982). Embriyolu hindi ve tavuk yumurtaları ILTV'ye karşı duyarlı iken, ördek yumurtaları az duyarlı, beç tavuğu ve güvercin yumurtaları ise dirençlidir (Jordan, Evanson, & Bennett, 1967).

ILTV, tavuklarda önemli solunum yolu problemlerine yol açar. Klinik semptomlar genellikle doğal enfeksiyondan 6-14 gün sonra ortaya çıkmaktadır. Hastalığın şiddetli ve hafif olmak üzere iki klinik formu bulunmaktadır. Şiddetli epizootik formda kanlı mukus atılımıyla birlikte belirgin dispne ve ortadan şiddetliye kadar değişen konjunktivitis tablosu görülmüştür (García et al., 2013; Jordan, 1966). ILT'nin hafif enzootik formları da Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda ve Amerika Birleşik Devletleri'nin yoğun kanatlı yetiştiriciliği yapılan bölgelerinde gözlenmiştir. Hafif enzootik formda görülen klinik bulgular, depresyon, verim kaybı, azalan yumurta üretimi, hafif mukoid trakeitis, gözlerde sulanma, infraorbital sinüslerde şişme, nasal

akıntı ve hafif hemorajik konjunktivitis şeklinde sıralanabilir (Cover & Benton, 1958; Linares, Bickford, Cooper, Charlton, & Woolcock, 1994; Seddon, 1935; Sellers et al., 2004; Timurkaan, Yılmaz, Bulut, Ozer, & Bolat, 2003). Buna ek olarak Uluslararası Hayvan Sağlığı Organizasyonunda (World Organisation for Animal Health: OIE) yapılan sınıflandırmaya göre hastalık perakut, subakut ve kronik olmak üzere üç ayrı formda incelenmektedir (OIE, 2018b).

ILTV ile enfekte olmuş tavuklarda konjunktiva ve solunum sistemi boyunca gross lezyonlar bulunabilir, fakat en çok larinks ve trakeada gözlenir. Trakeal ve laringeal dokulardaki değişiklikler sadece yoğun mukusun görüldüğü hafif seyirde veya hemoraji ve/veya difterik değişikliklerin olduğu şiddetli seyirde görülebilir. Şiddetli formlarda, enfeksiyonun erken döneminde mukoid inflamasyon ile dejenerasyon ve nekroz, geç döneminde hemoraji görülür. Difterik değişiklikler yaygındır ve trakea boyunca uzanan mukoid döküntüler olarak görülebilir. Bazı olgularda trakeal boşluktaki ciddi hemorajiler kan döküntüleri ile sonuçlanabilir ya da mukus ve nekrotik dokuda kan bulunabilir. İnflamasyon akciğerlerdeki bronşlar ve hava keselerine kadar gidebilir. Hastalığın hafif formlarında, trakeadaki gross lezyonlar, larinks ve üst trakeada bulunan değişen derecelerde hemoraji ile birlikte orta derecede mukoid trakeitis içerebilir (García et al., 2013).

Enfeksiyonun seyri lezyonların şiddetine göre değişmektedir. Genel olarak, doğal salgınlarda birçok tavuk 10-14 günde iyileşir, ancak iyileşmenin üç haftayı aştığı da bildirilmiştir (Jordan, 1966). ILTV'nin konakçıya girişi üst solunum ve oküler yollarla olur (Jordan et al., 1967). Dış ortamda bulunan virusun yumurtaya bulaşması veya bir yumurtadan diğerine geçişi henüz kanıtlanmamıştır. Direkt bulaşma akut enfekte hayvanlarda klinik olarak iyileşmiş taşıyıcı hayvanlara göre daha kolay gerçekleşir (García et al., 2013). Şiddetli epizootik formda morbidite yüksek iken (%90-100), mortalite genellikle %10-20 düzeylerindedir (Jordan, 1966). Hafif enzootik formda morbidite %5'e, mortalite % 0,1-2'ye düşmektedir (Linares et al., 1994; Seddon, 1935; Sellers et al., 2004).

Canlı attenüe aşılarda aşılanmış veya hastalığı atlatan kanatlılar, virusu latent olarak taşımaktadır ve virus etkeni kendiliğinden veya sürünün stres koşullarına maruz

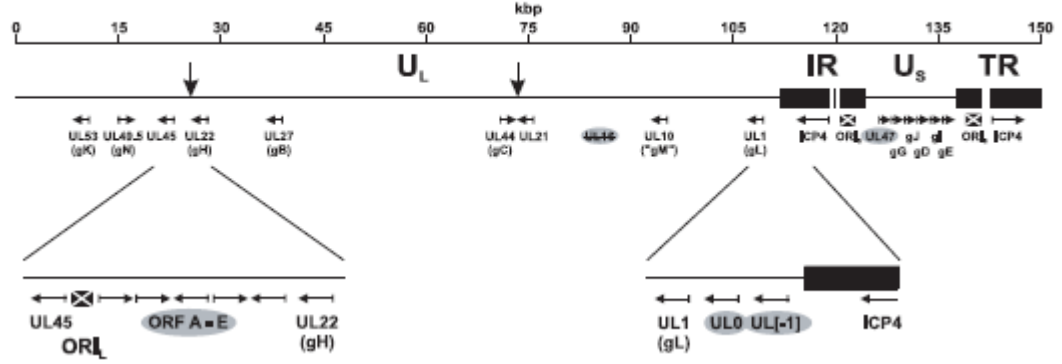
kalmayısıyla birlikte tekrar aktif hale gelebilir (Bagust, 1986; Hughes, Gaskell, Jones, Bradbury, & Jordan, 1989). Virusun yeniden aktive olmasıyla birlikte kanatlılar arasında direkt bulaşma meydana gelir ve hastalık duyarlı kanatlılarda yeniden ortaya çıkar (Hughes, Gaskell, Bradbury, Jordan, & Jones, 1991). İndirekt bulaşma, kontamine olmuş ekipmanlar, personel kıyafetleri ve ayakkabılar, kontamine çöp, gübre ve enfekte karkaslar ile gerçekleşir. Aile işletmelerinde, hastalığı atlatan tavuklar büyük oranda virusu latent olarak taşıdıklarından dolayı ticari kümesler için virus kaynağını oluşturmaktadır (Dufour-Zavala, 2008). Enfeksiyonun ortaya çıkışında aile işletmelerinde bulunan kümesler ve aşılanmış olan kanatlıların yanı sıra sahada virulens özelliğini tekrar kazanmış olan aşı suşları da büyük rol oynamaktadır (García et al., 2013).

ILTV morfolojik olarak Herpesvirus simplex'e benzeyen, ikosahedral simetri gösteren nükleokapsidde sahip zarflı bir virustur (Watrach, Hanson, & Watrach, 1963). Hekzagonal kapsomerlerden oluşan nükleokapsid 80-100 nm çapındadır. Tüm virus partikülü, nükleokapsidi saran düzensiz yapıdaki zarf ile birlikte 195-250 nm çapındadır. Nükleokapsid ile zarf arasındaki bölgede proteinlerden oluşmuş bir tegüment tabakası bulunur (Cruickshank, Berry, & Hay, 1963; Watrach et al., 1963). Zarfın yüzeyinde glikoprotein yapıda çıkıntılar bulunmaktadır. Virus, sitoplazmanın trans-Golgi bölgesinde iken, tegüment materyali ve ikincil katlanma ile olgun kapsidler oluşur. Olgun virionlar ekzositozis ile hücrelerden salınır (Fuchs et al., 2007).

ILTV'ye ait termostabilite çalışmaları taze ve kurutulmuş trakeal eksudatlar, karkaslardan alınan trakealar, koryoallantoik membranlar (CAM) ve gliserol ve nütrient brotha sulandırılmış virus süspansiyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Jordan, 1966). ILTV trakeal eksudatlarda ve tavuk karkaslarında, 13-23°C'de 10-100 gün enfektif özelliğini korumuştur. Ancak, ILTV, enfektivitesini 55-56°C ısıda 15-60 dakikada veya 38°C ısıda 48 saatte hızlı bir şekilde kaybetmektedir (García et al., 2013). Jordan et al. (1967) virusun ışığa karşı dayanıksız olduğunu, 11-24,5 °C aralığında dört gün boyunca nemli çöplerde ve 20 gün boyunca kuru çöplerde, 11-19,5 °C aralığında üç gün boyunca dışkıda varlığını sürdürebildiğini bildirmiştir. Virus zarflı olduğu için kloroform ve eter gibi lipolitik solventlere karşı duyarlıdır ve genel dezenfektanlar tarafından kolayca

tahrip edilebilir. Virus laboratuvar koşullarında %5 fenol, %3 krezol veya %1 sodyum hidrokisit çözeltileri ile bir dakikadan daha kısa sürede inaktive edilebilir. Ortamda organik madde varlığı ILTV'nin dezenfektanlar tarafından inaktive edilmesini zorlaştırır (García et al., 2013). Tavuk çiftliklerinde, ekipmanlara %5'lik hidrojen peroksit dumanlanması ile dezenfeksiyonun etkinliği arttırılmıştır (Neighbor et al., 1994).

ILTV genomu, linear, çift iplikçikli, yaklaşık 155 kb moleküler ağırlığa sahip bir DNA'dan oluşmaktadır. Bu genom, benzersiz uzun bölge (Unique long: U_L), benzersiz kısa bölge (Unique short: U_S) ve U_S kısmına katlanan iki ters (inverted) tekrar bölgesinden (Internal repeat: IR; Terminal Repeat: TR) oluşur (Şekil 2) (Fuchs et al., 2007; Johnson, Prideaux, Kongsuwan, Sheppard, & Fahey, 1991). Son yıllarda ILTV genomlarına ait karşılaştırmalı sekans analizleri hem aşı suşları hem de virulent suşlar için gerçekleştirilmiştir. ILTV tüm genom diziliminin ortaya çıkarılması, farklı suşların genomik bölümlerinin aynı anda değerlendirilmesi ve karşılaştırılmasıyla gerçekleşmiştir. Bu bağlamda ILTV genomuna ait ilk tüm genom sekansı 2006 yılında Thureen & Keeler (2006) tarafından yayımlanmış olup altı farklı laboratuvarda gerçekleştirilen ve farklı suşların genomik dizilerinin değerlendirilmesi ile elde edilen analiz sonuçlarını içermektedir. Bu genom dizisi 148,687 baz çifti (bç) uzunluğundadır ve genomdaki G/C oranı %48,2'dir. Belirlenen toplam 79 açık okunabilir bölgeden (Open reading frame: ORF), 64 adedi U_L bölgesinde, 8 adedi U_S bölgesinde, 6 adedi IR bölgesinde ve 1 adedi U_S /TR_S bölgesinde yer almaktadır. *Iltovirus* için spesifik olan 8 ORF (A, B, C, D, E, F, U_L-0 ve U_L-1) dışında geriye kalan ORF'lerin büyük çoğunluğu diğer *Alphaherpesvirus* genlerine homologtur. Diğer alphaherpesviruslar gibi ILTV de üç viral DNA replikasyonu orijini içermektedir. Bu replikasyon orijinlerinden *OriL*, U_L bölgesinde yer alırken; diploid olan *OriS* ise tekrar bölgelerine dahildir (García et al., 2013).



Şekil 2. ILTV genomu (Fuchs et al., 2007)

Transkripsiyon düzenleyici protein (transcriptional regulatory protein) veya diğer adıyla ICP4 replikasyon siklusunun başlamasından önce üretilir. Bu gen enfeksiyon sürecinde herpesvirusların erken ve geç genlerinin ekspresyonunu düzenlemekten sorumludur. ICP4 proteinini kodlayan ORF 4386 nükleotid içerir. Bu bölge alphaherpesviruslar arasında korunmuş olarak bildirilmiş olan yüksek derecede homoloji gösteren iki alana sahiptir (Chang, Lee, Shien, & Shieh, 1997; Johnson, Tyack, Prideaux, Kongsuwan, & Sheppard, 1995). UL23 bölgesinde yer alan tam *TK* geninin dizilenmesi ile düşük ve yüksek virulensli ILTV'lerin ayırımı yapılabilmektedir (Griffin & Bournsnel, 1990; Han & Kim, 2001).

Virus tavuk embriyosu karaciğeri, böbreği ya da tavuk böbreğine ait hücre kültürlerinden izole edilebilir (Chang, Yates, Dardiri, & Fry, 1960; McNulty, Allan, & McCracken, 1985; Van Kammen & Spradbrow, 1976). Bunlar arasında en duyarlı olanı monolayer embriyo karaciğer hücreleridir (Hughes & Jones, 1988). Virus aynı zamanda 10-12 günlük SPF ETY'lerinin CAM'ında da gelişebilir (Jordan, 1964). ILTV trakeal eksudatın elektron mikroskopuyla direkt olarak incelenmesiyle de teşhis edilebilir (Van Kammen & Spradbrow, 1976). Viral antijenler aynı zamanda immunofloresans, ELISA ya da VN yöntemleriyle de belirlenebilir (Braune & Gentry, 1965; Wilks & Kogan, 1979; York & Fahey, 1988). Histopatolojik incelemede ise herpesvirus için tipik olan intranükleer inklüzyonlar ve sinsityal hücre formasyonu bu virusta da görülmektedir

(Armstrong, 1959; Pirozok, Helmboldt, & Jungherr, 1957). PCR metodu ile ILTV'nin saptanmasının genel olarak virus izolasyonuna göre çok daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Williams, Savage, & Jones, 1994; Alexander & Nagy, 1997; Keam, York, Sheppard, & Fahey, 1991; McNulty et al., 1985). Virus izolasyonu ve ELISA'nın negatif olduğu durumlarda dot-blot hibridizasyon testi ve PCR yöntemleri virusun saptanmasında yüksek duyarlılık göstermektedir (Keam et al., 1991). Humberd, García, Riblet, Resurreccion, & Brown (2002) Nested-PCR yöntemini kullanarak etken DNA'sının formalin ile fikse edilmiş ve parafine gömülmüş dokulardan sınırsız hücreler ve intranükleer inklüzyonların ya da her ikisinin varlığından bağımsız olarak saptanabileceğini göstermiştir. PCR temelli yöntemler özellikle adenoviruslar gibi diğer kontaminant virusların da varlığının olduğu durumlarda da etkili bir yöntem olarak dikkati çekmektedir (Williams et al., 1994). Alexander & Nagy (1997) enfeksiyon fazının ortasından sonuna kadar olan süreçte PCR ve virus izolasyonu yöntemlerinin duyarlılık bakımından benzer olduklarını ancak PCR'in iyileşme fazında çok daha üstün olduğunu göstermiştir. Tek veya çoklu viral genlerin ya da genom bölgelerinin PCR-RFLP analizi bir ülke ya da bölgedeki farklı suşların karakterizasyonlarının yapılabilmesine olanak sağlamıştır (Chang et al., 1997). Bu bağlamda yapılan birçok çalışma bazı saha suşlarının aşı suşlarıyla oldukça yakın ilişkili olduğunu hatta bu suşlardan köken aldığını ve bazılarının ise gerçek yabanıl tip (wild type) olduklarını göstermiştir (Ojkic et al., 2006). Farklı araştırmacılar tarafından virusa ait yapılan genetik incelemelerde yaygın olarak kullanılan genler *ICP4*, *TK*, glikoprotein G (*gG*), glikoprotein E (*gE*) ve *UL47*'dir (Han & Kim, 2001; Humberd et al., 2002; Ojkic et al., 2006; Oldoni & García, 2007). PCR-RFLP'nin yanısıra rPCR ve nükleotid sekans analizleri de teşhiste etkili bir biçimde kullanılabilir (OIE, 2018b).

ILT salgınlarının kontrol altına alınmasındaki en etkili yaklaşım, çok hızlı gerçekleştirilen teşhis, uygun bir aşı programının oluşturulması ve virus saçılımının devamının engellenmesi basamaklarından oluşan prosedürün koordineli bir şekilde gerçekleştirilebilmesidir. Bu amaçla yapılan aşılama hem virus saçılımının sınırlanabilmesi hem de hastalığın seyri bakımından önem arz etmektedir. ILT için yapılan aşılama genellikle hastalığın endemik olduğu bölgelerde yapılmaktadır. Bunun

nedeni ise virusun gangliyalarda latent bir faza geçebilme kabiliyetinden dolayı hastalığı taşıyıcı kanatlıların ortaya çıkmasına neden olabilmesidir. Ayrıca kullanılan aşılardan bizzat kendileri düşük seviyede patojeniktir ve ekonomik yönden önemli performans özelliklerinde (büyüme, yemden yararlanma vb.) düşümlere neden olabilmektedir (Hidalgo, 2003). Guy, Barnes, & Smith (1991) sahada kanatlılar arasında bulaşma meydana gelirken oluşan mutasyonların sonucu virulensin arttığını bildirmiştir. Buna karşın, Keeler Jr, Hazel, Hastings, & Rosenberger (1993) ILTV aşısı suşlarının genetik olarak stabil olduğunu ileri sürmüştür. Ancak, farklı yaşlarda ve dolayısıyla farklı immün durumlarına sahip tavuklardan oluşan kümeslerde eksik attenüe edilmiş modifiye canlı ILTV aşısı klinik olarak oldukça şiddetli hastalıkların ortaya çıkmasına da neden olabilir.

Genel anlamda iki farklı canlı attenüe ILT aşısı vardır. Attenüe canlı ILT aşısı virulent virusun hücre kültürlerinde (tissue culture origin: TCO) ya da ETY'de (chicken embryo origin: CEO) çok sayıda ardışık pasajlamalarla geliştirilmiştir (Gelenczei & Marty, 1965; Samberg, Cuperstein, Bendheim, & Aronovici, 1971). Elde edilen bu aşılardan dünya genelinde ticari kanatlı kümeslerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Coppo, Noormohammadi, Browning, & Devlin, 2013). ETY'de multiple pasajlarla attenüe edilmiş aşılardan yüksek etkinliğe sahiptir. Ancak genellikle bu aşılardan kullanımı düşük performans ve yüksek kümes dışı bırakma oranları ile ilişkilendirilmiştir (Samberg et al., 1971). Broylerler genellikle CEO aşılardan ile sadece bir salgın yaşandığında içme suyuna eklenerek aşılanmaktadır. CEO aşısı suşları ile ILTV saha suşlarının ayrımı da oldukça zordur. TCO aşısı daha yüksek attenüasyon seviyelerine sahip olması ve düşük immunojenik olmaları nedeniyle genellikle daha az koruma sağlamaktadır (Hidalgo, 2003). Bu canlı attenüe ILT aşısı infraorbital sinüs ve intranasal bölgelere uygulama, göze damlatma ve içme suyuna alım gibi farklı şekillerde uygulandığında immünite sağlamaktadır (Benton, Cover, & Greene, 1958; Samberg et al., 1971; Shibley, Luginbuhl, & Helmboldt, 1962; Sinkovic & Hunt, 1968). Ancak ILT aşısının göze damlatma yöntemiyle uygulanması su veya sprey uygulamalarına göre daha yüksek koruma sağlamaktadır (Fulton, Schrader, & Will, 2000). Birçok aşısı göze damlatma

yöntemiyle uygulandığında ilk aşılardan sonra daha düşük mikroskobik lezyon skoru ortalamaları ve yüksek ELISA titreleri göstermektedir (Hidalgo, 2003).

Son yıllarda, aşılardan kuşlarda koruyucu immün yanıt gelişimini sağlayan, ILTV glikoproteinlerini eksprese eden hindi herpesvirüsü (herpesvirus of turkey: HVT) veya fowlpoxvirus (FPV) kullanılarak üretilen rekombinant aşılardan geliştirilmiştir (Johnson et al., 2010; Vagnozzi, Zavala, Riblet, Mundt, & García, 2012). Lee et al. (2012) tarafından yapılan çalışmalarla aşı ve saha suşlarına ait tüm genom sekans analizlerinden elde edilen yeni kanıtlar, sahadaki attenüe aşılardan arasındaki spontan ve doğal rekombinasyonların yaygın hastalıklara neden olabilen yeni virulent suşların ortaya çıkmasıyla sonuçlanabildiğini göstermektedir. Lee et al. (2012) tarafından yapılan bu çalışma canlı attenüe aşılardan arasındaki rekombinasyonların sahadada meydana gelen virulens kazanımıyla ilişkilendirilebileceğini gösteren literatürdeki ilk çalışma olmuştur. Elde edilen sonuçlar aynı zamanda ILT aşılardan güvenli bir şekilde kullanımıyla ilgili sorgulamalara yol açmış ve kullanımda ya da geliştirilme aşamasında olan canlı herpesvirüs aşılardan mevcut durumunun revize edilmesine neden olmuştur (Coppo et al., 2013).

Ülkemizde farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarla 1990'lı yıllara kadar ILTV'nin görülme sıklığının oldukça düşük olduğu ve kanatlı sektöründe kayda değer bir sorun yaratmadığı bildirilmiştir (Özdemir, 2007). İlk kez, Gülaçtı ve ark. (2007) (Gulacti, Eroksuz, Bulut, & Ceribasi, 2007) yumurtacı tavuklardan alınan trakeal örneklerin 9'undan PCR ile ILTV bulmuşlardır. Özdemir (2007), broyler ve yumurtacı tavuk kümeslerinden alınan trakeal örneklerden PCR ve ELISA ile ILTV varlığını bildirmiştir. Yavuz, Özdemir, Aras, & Terzi (2018), yumurtacı tavuklardan alınan örneklerden immunohistokimyasal ve PCR yöntemleri ile ILTV'yi tespit etmişlerdir. Kaya & Akan (2018) tarafından Türkiye'de ilk kez broyler damızlıklarda ILTV bildirilmiştir.

ILTV ve yol açtığı ILT dünya genelinde olduğu gibi Türkiye'de de kanatlı sektöründe önemli kayıplara neden olmaktadır. Özellikle Türkiye'de bu virusa ait serolojik temelli çalışmalar yapılmış olmakla birlikte genetik karakterizasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan araştırma sayısı oldukça azdır. ILTV ile ilgili genom

düzeyinde yapılan çalışmalar hem konvansiyonel yöntemlerle oldukça zor olan saha suşu/aşı suşu ayırımının yapılabilmesine hem de rekombinant aşuların neden olduğu enfeksiyonların tanımlanabilmesine ve dolayısıyla uygulanan aşuların güvenilirliğinin değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır. Bu nedenle Türkiye’de bu virusa ait genomik çalışmalar büyük önem arz etmektedir ve bu çalışmalarla hem mevcut suşların karakterizasyonu hem de mutasyonlarla oluşabilecek yeni varyantların tanımlanabilmesi mümkün olacaktır.

2.3. Avian Metapneumovirus (aMPV)

Tavuk ve hindilerde oldukça bulaşıcı olan Avian Metapneumovirus (aMPV), akut seyreden üst solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olmaktadır (OIE, 2018e). Hastalık hindilerde Hindi Rhinotrakeitisi (Turkey Rhinotracheitis: TRT), tavuklarda Şiş Kafa Sendromu (Swollen Head Syndrome: SHS) olarak da adlandırılmıştır. Bu hastalığa ait ilk bildirim 1978 yılında Güney Afrika’daki hindilerde (Buys, 1980) ve daha sonra da tavuklarda (Buys, Du Preez, & Els, 1989b) yapılmıştır. Birkaç yıl sonra Fransa’da benzer klinik bulguları olan bir hastalık bildirilmiştir (Giraud, Bennejean, Guittet, & Toquin, 1986). 1985 yılında ise Birleşik Krallık’da ilk virus izolasyonu gerçekleşmiş McDougall & Cook (1986) ve Cavanagh & Barrett (1988) tarafından pneumovirus olarak karakterize edilmiştir. Bu virusun neden olduğu hastalık daha sonrasında İspanya (Anon, 1985), Almanya (Hafez & Woernle, 1989) ve İtalya’nın (Fabris & D’aprile, 1990) da içinde olduğu birçok Avrupa ülkesine hızlı bir şekilde yayılmıştır. Günümüzde enfeksiyonun tüm dünyada yaygın olduğu bilinmektedir (Cecchinato, Ferreira, Munir, & Catelli, 2016; Jones & Rautenschlein, 2013). Avustralya dışındaki büyük kanatlı işletmelerinin olduğu tüm ülkelerde aMPV enfeksiyonunun varlığı bildirilmiştir (Jones & Rautenschlein, 2013).

aMPV, *Mononegavirales* sınıfındaki *Pneumoviridae* ailesinde *Metapneumovirus* generisi içinde sınıflandırılmıştır (ICTV Taxonomy, 2015a). aMPV enfeksiyonuna duyarlı en önemli iki tür tavuklar ve hindilerdir (Cook, 2000a). Sülün (Gough, Collins, Cox, & Chettle, 1988), beç tavukları (Picault et al., 1987), deve kuşu (Cadman, Kelly,

Zhou, Davelaar, & Mason, 1994), Muscovy ve Pekin ördeklerinde (Toquin, B yon-Auboyer, Etteradossi, Jestin, & Morin, 1999) de aMPV enfeksiyonları bildirilmiştir.

aMPV, solunum sistemi ve genital sistemin epitel hücrelerinde replike olur (Catelli et al., 1998; Jirjis, Noll, Halvorson, Nagaraja, & Shaw, 2001; Jones, Williams, Baxter-Jones, Savage, & Wilding, 1988). Hindi ve tavuklarda bu virusun en fazla ürediği bölgeler, nasal dokular ve trakea olmakla birlikte az da olsa akciğer ve hava keselerinde de görülebildiği bildirilmiştir (Cook, 2000a). Virus replikasyonu siliar hücrelerin kaybına yol açarak konak yı sekonder etkenlere karşı savunmasız hale getirir. Sekonder bakteriyel ve viral enfeksiyonlar hastalığın şiddetini artırarak ölüm oranını yükseltebilir (Chary, Rautenschlein, Njenga, & Sharma, 2002a; Chary, Rautenschlein, & Sharma, 2002b; Jones & Rautenschlein, 2013). Hastalık her yaştaki hindilerde görülebilir olmasına karşın broylerlerde özellikle 28-42. günler önem taşımaktadır. Klinik bulgular apati, infraorbital ve periorbital sinüslerin şişmesi, disoryantasyon, torticollis ve opistotonus ile karakterizedir. Hastalık aynı zamanda yumurta veriminde ve kalitesinde düşüklüğe sebep olmaktadır. Etkenin kümeste yayılımı ilk 9 günde direkt temas yoluyla gerçekleşmektedir. Vertikal yolla bulaşma bu hastalıkta görülmemektedir. Klinik belirtiler ve enfeksiyonun yayılması 2-4 saatte meydana gelebilir. Mortalite %1-2'yi geçmezken morbidite %10'a ulaşabilir (OIE, 2018e).

Elektron mikroskop analizleri aMPV'leri de içeren *Pneumovirinae* alt familyasının tüm üyelerinin yapısal olarak birbirlerine oldukça benzediğini ve hatta diğer bir familya olan *Paramyxoviridae*'ye ait viruslarla da ortak özellikler taşıdığını göstermiştir. Virionlar tipik olarak küresel yapıda olup çapları 150 nm ile 200 nm arasında değişebilmektedir. Küresel yapının yanı sıra uzun filamentöz şekilli varyantları da mevcuttur. Farklı seviyelerde pleomorfizm içeren filamentöz partiküllerin uzunluğu 400 nm'ye ulaşabilir. Negatif anlamlı olan virion lipid yapıdaki bir zarf ile sarılmıştır (Büchi & Howe, 1973; Broor & Bharaj, 2007; Joncas, Berthiaume, & Pavilanis, 1969).

aMPV, segmentsiz, tek iplik ekli ve yaklaşık 14 kb büyüklüğünde RNA genomu taşır (Collins & Gough, 1988). Bu genomda en az 9 polipeptidi kodlayan 8 adet gen bulunmaktadır (şekil 3). Bu viral genler 3'→5' yönünde sırasıyla; nükleoprotein (N),

fosfoprotein (*P*), matriks protein (*M*), füzyon proteini (*F*), ikinci matriks proteini (*M2*), küçük hidrofobik protein (*SH*), yüzey glikoproteini (*G*) ve büyük viral RNA-bağımlı RNA polimeraz (*L*)'dır (Ling, Easton, & Pringle, 1992). Yapısal olmayan proteinlerinin (nonstructural proteins: NS1, NS2) bulunmaması ve farklı gen diziliminden dolayı memeli pneumoviruslarından ayırt edilmektedir (Ling et al., 1992; Yu, Davis, Brown, & Cavanagh, 1992). Viral zarfın yüzeyinde G, F ve SH glikoproteinleri bulunurken; helikal simetrik nükleokapsidi çevreleyen M proteini, bu nükleokapsid ile zarf arasında yer almaktadır. N, P ve L proteinleri ise nükleokapsitte bulunmaktadır (Easton, Domachowske, & Rosenberg, 2004). F proteini virusun penetrasyonunda görev alır (Seal, Sellers, & Meinersmann, 2000). SH proteininin hücre membranına bağlanma, enfektivite ve matürasyon için zorunlu olmadığı bilinmektedir (de Graaf et al., 2013; Karron et al., 1997; Naylor et al., 2004). G proteini ise hücre membranına bağlanmada önemli rol oynamaktadır. Genomun yüksek seviyelerde varyasyon gösteren bölgesinde bulunan G proteini aMPV'nin alt tipleri için önemli bir belirleyicidir (Juhász & Easton, 1994; Lwamba et al., 2005). F, G, M ve N genleri hedeflenerek gerçekleştirilen moleküler yöntemler, aMPV'nin saptanması ve/veya genomik alt tiplerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır (Bäyon-Auboyer, Jestin, Toquin, Cherbonnel, & Eterradossi, 1999; Cook & Cavanagh, 2002; OIE, 2018e). aMPV'ler monoklonal antikorların kullanımına ve nükleotid dizi analizine göre A, B, C ve D olmak üzere 4 alt tipe ayrılmıştır (Cook & Cavanagh, 2002; Jones & Rautenschlein, 2013).



Şekil 3. aMPV genomu (Cook & Cavanagh, 2002)

Virusun başarılı bir şekilde izole edilebilmesi için çoklu teşhis yaklaşımları gerekmektedir. Bu yaklaşımlar özellikle virusun farklı alt tipleri veya genotiplerinin çalışılacağı durumlarda önem kazanan değişik *in vitro* virus izolasyon metotlarını içermektedir (OIE, 2018e).

aMPV, hem hindilerde hem de tavuklarda, enfeksiyonun başlangıcını takiben pik titrelerinin yaklaşık 3-5 gün olarak belirlendiği çok kısa bir zaman aralığında bulunmaktadır (Catelli et al., 1998). Klinik belirtiler normalde enfeksiyondan 12-24 saat sonra meydana gelir (Stuart, 1989). Virus izolasyonunun hastalığın ilk klinik belirtileri gözlemlendiğinde yapılması gerekliliği, sahada aMPV'nin izolasyonunun gerçekleşmesinde önemli problemler yaratmaktadır (Cook & Cavanagh, 2002). Virus izolasyonu için klinik örneklerin sinüs ve nazal turbinantlardan enfeksiyonun en erken safhasında alınması oldukça önemlidir. Virus, bu dokularda çok kısa sürede bulunduğu için enfeksiyonun geç döneminde alınan örnekler virusun izolasyon şansını düşürmektedir. Sekonder bakteriyel etkenlerin de katıldığı şiddetli klinik bulgular gösteren hayvanlardan alınan örneklerden virus izolasyonu, büyük olasılıkla başarısız olmaktadır. Bu durumda seçilebilecek en iyi yöntem enfeksiyonun başlangıç evresinde olan komşu bir kümeden örnek alınarak inceleme yapılmasıdır (Cook & Cavanagh, 2002; OIE, 2018e). Virus izolasyonu için nazal svablar ve eksudatlar, sinüs ve turbinantlardan kazıntılar alınmakta, trakea ve akciğerlerden örneklemeler yapılmaktadır (Buys, Du Preez, & Els, 1989a). Örneklerin hızlı bir şekilde gönderilmesi gerektiğinde, buz içinde soğuk zincir korunarak laboratuvara teslim edilmeli; 3 günden fazla gecikmenin yaşanacağı durumlarda ise dondurularak gönderilmelidir. Doku örneği veya nazal eksudatların %10'luk süspansiyonu, bakteriyel kontaminasyonu minimize etmek amacıyla antibiyotik (100 IU/ml penisilin veya 100 mg/ml streptomisin) ilave edilen tamponlanmış fosfat tuzu (phosphate buffered saline: PBS) veya brain heart infusion broth kullanılarak hazırlanmalıdır (Cook & Cavanagh, 2002).

aMPV'nin primer izolasyonu için tavuk ve hindi kümeslerinden alınan saha materyalinden ETY'nin sarı kesesine veya tavuk ya da hindi trakeal organ kültürüne (TOK) inokulasyon yapılabilir (Buys et al., 1989a; McDougall & Cook, 1986; Panigrahy, Senne, Pedersen, Gidlewski, & Edson, 2000). 6 günlük ETY'nin sarı kesesine inokulasyon yapıldıktan sonra allantoik sıvı ve sarı kesesi membranı 8 gün sonra toplanır ve homojenize edilerek bir sonraki pasaj gerçekleştirilir. İki veya üç pasajdan sonra, embriyolarda hemorajiler görülebilir ve ölümler meydana gelebilir. Embriyoda lezyonlar görüldüğünde, yumurta sıvısı VERO veya chicken embriyo

fibroblast (CEF) gibi hücre kültürlerine inoküle edilebilir (Buys et al., 1989a; Panigrahy et al., 2000).

Virus izole edildiğinde hücre kültürlerinde üreme için hazır hale gelir. Bu amaçla CEF, civciv embriyo ciğeri (chicken embryo liver: CEL), Vero ve QT-35 hücreleri kullanılabilir (Buys et al., 1989a; Goyal et al., 2000; Panigrahy et al., 2000; Williams, Savage, & Jones, 1991). Hücre kültüründe pasajlar virusun hızlı bir şekilde attenüe olmasına yol açarken; TOK'da 100 pasaj sonunda dahi virulens kaybı olmadığı bildirilmiştir (Williams et al., 1991). Virus izolasyonu haricinde serum nötralizasyon, ELISA, elektron mikroskopisi, immunoperoksidaz (IP), immunofloresan (IF) veya immunogold teknikleriyle de aMPV teşhis edilebilir (Cook & Cavanagh, 2002).

aMPV'nin teşhisinde RT-PCR duyarlı ve hızlı bir metot olarak dikkati çekmektedir. aMPV'nin saptanması için *F*, *M*, *N* ve *G* genlerini hedefleyen RT-PCR prosedürleri kullanılır. Bu RT-PCR prosedürleri genellikle alt tip spesifiktir ve hem teşhiste hem de endemik tiplerin belirlenmesinde başarıyla kullanılmaktadır. Ancak, aMPV'ler arasındaki moleküler heterojenitenin, RT-PCR prosedürlerinin bütün alt tiplerin saptanmasındaki başarıya sınırlandırmalar getirebileceği de göz önüne alınmalıdır. En uygun protokollerden birisi Bayon-Auboyer (Bäyon-Auboyer et al., 1999) tarafından önerilen *N* geni dizilimini baz alınarak yapılan RT-PCR işlemini takiben pozitif olgulardan yapılan *G* geni odaklı alt tip spesifik RT-PCR karakterizasyonudur. *N* genine ait Nd/Nx oligonükleotid çifti aMPV amplifikasyonunda başarılı bir şekilde kullanılabilir (Bäyon-Auboyer et al., 1999; Cook & Cavanagh, 2002).

Virus hücre kültürlerinde veya TOK'da üretildikten sonra RT-PCR ile kolayca tespit edilebilir. aMPV'nin belirlenebilmesi amacıyla gerçekleştirilecek olan RT-PCR protokolünün başarılı bir şekilde sonuçlandırılabilmesi için örnek toplama büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda örneklerin elde edildikleri anatomik bölge ve niteliği sonrasındaki reaksiyonların anlamlı şekilde gerçekleştirilebilmesi için kayda değer bir etki göstermektedir (Cook & Cavanagh, 2002). Bu konuda birçok araştırmacı tarafından farklı yaklaşımların benimsendiği görülmektedir. Jing et al. (1993) deneysel olarak oluşturulan enfeksiyon sonrası trakeal ve özefagal svaplar ile nazal ve trakeal

dokulardan alınan örneklerden RNA ekstraksiyonu gerçekleştirmiştir. Aynı zamanda her iki materyalden de enfeksiyonun 5. gününe kadar yapılan virus izolasyonunda başarılı olmuşlardır. Băyon-Auboyer et al. (1999) da benzer şekilde svablardan elde edilen RNA'lerden başarılı bir şekilde aMPV deteksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Jing et al. (1993)'ın yaptıkları çalışmada aynı zamanda direkt olarak kuru svablardan elde edilen RNA ile yaş svablardan toplanan hücrelerden elde edilen RNA karşılaştırılmış ve her iki metodun da başarılı oluşu gözlenmiştir. Benzer şekilde, Băyon-Auboyer et al. (1999) da svabların işlenmesi ile ilgili bu iki metodun uygun şekilde çalıştığını ve benzer sonuçlar elde edildiğini bildirmişlerdir. Ancak, epidemiyolojik çalışmalarda kuru svabların tercih edilmesi daha uygun görülmektedir (Cavanagh, Mawditt, Britton, & Naylor, 1999). Bunun nedeni ise örneklerin laboratuvara normal koşullar altında gönderilebilmesi ve viral RNA'yı olumsuz yönde etkileyebilecek mikroorganizma üremelerinin engellenmesidir. Deneysel olarak aMPV ile enfekte edilen tavukların bukkal boşluk (ağız svabları), orofarinks ve burundan alınan svabların karşılaştırılmasında ise benzer düzeyde deteksiyon derecesinin olduğu görülmüştür. Ancak, attenüe aMPV ile enfekte edilmiş tavuklarda durumun daha farklı olduğu, nazal svab kullanımında, akıntının olmaması nedeniyle virusun sadece az sayıda tavukta RT-PCR yöntemi ile detekte edilebildiği bildirilmiştir (Cook, Huggins, Orbell, Mawditt, & Cavanagh, 2001). Son yıllarda yapılan araştırmalar, inokulasyondan sonraki 3 gün içinde trakea ve turbinantlarda bulunan virus miktarının maksimuma ulaştığını ve viral RNA'nın trakeada 9 gün, nazal turbinantlarda ise en fazla 14 gün kalabildiğini göstermiştir (Velayudhan et al., 2005).

Ticari kümeslerde biyogüvenlik programlarının uygun ve etkili bir şekilde uygulanması, aMPV enfeksiyonunun önlenmesinde veya şiddetinin minimize edilmesinde önemli bir yere sahiptir. İşletmede yetersiz havalandırma, uygun olmayan sıcaklık, yüksek barındırma yoğunluğu, farklı yaştaki hayvanların aynı kümeste barındırılması, kötü altlık kalitesi, hijyen koşullarının eksik olması ve sekonder patojenlerin varlığı aMPV enfeksiyonlarının şiddetini artıran faktörler olarak dikkati çekmektedir (Lister, 1998; Stuart, 1989). Gaga kesimi veya aşılamanın uygun olmayan dönemlerde yapılması aMPV enfeksiyonuna bağlı klinik bulguların şiddetini ve

mortalite oranlarını etkileyebilir (Andral et al., 1985). aMPV'nin kümeslere girişini ve yayılmasını önlemek için yabancı kuşların kümeslere girişinin engellenmesine, ekipman ve araç dezenfeksiyonuna ve personel hijyenine özen gösterilmelidir (Jones & Rautenschlein, 2013).

aMPV enfeksiyonları için tedavi seçeneği olmasa da, hastalığın şiddetini azaltmak için sekonder bakteriyel enfeksiyonların kontrol altına alınmasında antibiyotikler kullanılır (Hafez, Emele, & Woernle, 1990). aMPV enfeksiyonlarının kontrolü için canlı ve inaktif aşılar kullanılmaktadır (Tiwari, Patnayak, & Goyal, 2006). Deneysel koşullarda canlı aşuların oldukça iyi koruma sağladığı bildirilmiştir (Cook et al., 1989; Williams et al., 1991). aMPV canlı aşuları intranazal, göz damlası, içme suyu ya da sprey uygulama metotları şeklinde kullanılabilir (Ganapathy, Bufton, Pearson, Lemiere, & Jones, 2010). Canlı attenüe aşuların, hem sistemik bağışıklığı hem de solunum sisteminde lokal bağışıklığı uyardığı gösterilmiştir (Liman & Rautenschlein, 2007).

Çalışmalar A ve B alt tip aşuları arasında çapraz koruma oluşabildiğini ve aMPV'nin hem A hem de B alt tip suşlarından üretilen aşuların C alt tipine karşı da koruma sağladığını göstermiştir (Cook, 2000b). Yumurtacı tavuklarda, canlı aşıdan sonra yağ adjuvanlı inaktif aşı kullanımı tam bir koruma sağlamaktadır. Aşı uygulamaları yetiştirme hedeflerine göre farklılıklar gösterebilmektedir. Sahada aMPV prevalansına göre özellikle erkek hindilerde canlı aşının en az 2-3 kez tekrarlanması gerekebilir. Damızlık sürülere 16-20. haftalarda ek inaktif aşılama yapılabilir (Jones & Rautenschlein, 2013).

Son yıllarda FVP veya NDV'lerin F glikoproteini gibi spesifik immunojenleri ya da farklı DNA plazmidlerini kapsayan rekombinant aşuları geliştirilmiştir (Hu et al., 2011; Qingzhong et al., 1994; Tarpey et al., 2001). Poxvirus rekombinant aşısı ile gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçlar deneyde kullanılan hindilerde deneysel aşılamanın aMPV antikörlerinin artışına neden olduğunu ve virusa karşı korunmanın gerçekleştiğini göstermiştir (Qingzhong et al., 1994). Subunit ve delesyon mutant aşular ve virozom-temelli aşı adaylarının etkileri değerlendirilmektedir (Kapczynski, 2004). Mutant virusların kullanılmasıyla geliştirilen genetik çalışmaların

ürünü olan aşılar daha başarılı ve etkili aşı stratejilerinin geliştirilmesinde önemli rol oynayacaktır (Clubbe & Naylor, 2011). Deneysel *in ovo* aşılması hem hindilerde hem de tavuklarda güvenilir ve etkili bulunmuştur. *In ovo* aşılama daha konvansiyonel aşılama metotlarıyla karşılaştırıldığında bazı avantajlara sahiptir çünkü erken spesifik immunité sağlar. Bu nedenle daha etkili bir aşılama stratejisinin oluşturulmasında kullanılabilecek yöntemlerden biri olduğu bildirilmektedir (Jones & Rautenschlein, 2013; Worthington, Sargent, Davelaar, & Jones, 2003).

Türkiye’de ilk kez Aydın, Akan, & Erdeğer (1993) Ankara’da yaptıkları çalışmada SHS şüpheli broyler damızlık kümeslerden serolojik inceleme ile aMPV antikorlarını tespit etmişlerdir. Aynı zamanda örneklerden yapılan bakteriyolojik inceleme sonucunda *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Staphylococcus epidermidis* izole etmişlerdir. Çokal & Şen (2003) SHS semptomlarını gösteren broyler, broyler damızlık ve hindi kümeslerinde ELISA ile inceleme yapmış ve aMPV antikorlarını saptamışlardır. Yine yapılan bakteriyolojik inceleme ile *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. ve *Streptococcus* spp. izole etmişlerdir. İça (2005) tarafından solunum sistemi problemlili tavuk ve hindi sürülerinde, immunofloresan antikor tekniğı (IFAT) ve RT-PCR ile karşılaştırmalı olarak aMPV’nin teşhisi yapılmıştır. Sonuçta RT-PCR’ın IFAT’a göre daha duyarlı olduğu, fakat bulguların birbirine yakın olmasından dolayı IFAT’ın da rutin teşhis amacıyla kullanılabileceğı bildirilmiştir. Ongor, Karahan, Kalin, Bulut, & Cetinkaya (2010) klinik olarak sağlıklı ve solunum sistemi problemlili hindilerde RT-PCR ile aMPV prevalansını araştırmış ve Türkiye’de ilk defa saha suşlarının moleküler alt tiplerini belirlemişlerdir.

2.4. Avian Reovirus (ARV)

Fahey & Crawley (1954), 1954 yılında kronik solunum yolu hastalığı görülen tavuklardan ilk Avian Reovirus (ARV) izolasyonunu gerçekleştirmiştir. Bu çalışmalarını Petek, Felluga, Borghi, & Baroni (1967) tarafından da doğrulanmış ve ilk ARV olarak literatüre geçmiştir. Fahey & Crawley (1954)’in izole ettiği bu virusun duyarlı tavuklara inokule edildiğinde karaciğer nekrozu, tendon ve synovial memranlarda inflamasyon gelişimine sebep olduğu gözlenmiştir. Bu virusun aynı zamanda civcivlerde hafif bir

solunum yolu hastalığına neden olduğu belirlenmiştir (Subramanyam & Pomeroy, 1960).

Avian reoviruslar, *Reoviridae* familyasına ait *Spinareovirinae* alt familyasından *Orthoreovirus* genusunun bir üyesidir (ICTV Taxonomy, 2018a). Reoviruslar ismini “Respiratory Enteric Orphan” ifadesinin baş harflerinden almaktadır. Çünkü insanlarda ilk izolasyonu bu bölgelerden yapılmış olmakla birlikte bu dönemde herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilememiştir. “Avian Reovirus” terimi genel bir ifade olarak bu virusun memelilerde bulunan türlerinden ayırt etmek için kullanılmaktadır (Jones, 2013). Kanatlı ve memeli reovirusları (*Mammalian orthoreovirus*) *Orthoreovirus* genusuna ait iki temel gruptur. Ancak bunun yanı sıra, *Baboon orthoreovirus*, *Mahlapitsi orthoreovirus*, *Nelson Bay orthoreovirus*, *Piscine orthoreovirus* ve *Reptilian orthoreovirus* bu genusa ait diğer türlerdir (ICTV Taxonomy, 2018a). Bu iki grup birçok ortak morfolojik ve fizikokimyasal karakterler taşımasına rağmen konakçı çeşitliliği, patojenite ve genom kodlama kapasitesi gibi özellikler bakımından önemli farklılıklar taşımaktadır. Aynı zamanda birçok biyolojik ve serolojik karakter açısından da değişiklik göstermektedir (Benavente & Martínez-Costas, 2007). ARV’ler memelilerdeki karşılıklarından farklı olarak konakçı hücrelere füzyon ile penetre olabilmekte ancak HA aktivitesi göstermemektedir (Nibert & Schiff, 2001). Güncel araştırmalar hindi, ördek ve kazlardaki reovirusların tavuk suşlarına göre belirgin moleküler farklılıklara sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle ARV terimi genellikle tavuk kaynaklı reoviruslar için kullanılmakta olup diğer evcil türler için, turkey reovirus (TRV), duck reovirus (DRV) ve geese reovirus (GRV) terimleri kullanılmaktadır (Jones, 2013).

ARV enfeksiyonları ticari kanatlı işletmelerinde oldukça yaygın olarak görülmektedir. Bu viruslar tavuklarda çok farklı doku ve organlardan izole edilmiş olup; viral artrit/tenosinovitis, gelişim geriliği ve malabsorbsiyon sendromları, solunum ve enterik hastalıklar ve immunosupresyon ile ilişkilendirilmiştir (Olson & Kerr, 1966; Rosenberger & Olson, 1997; Sterner, Rosenberger, Margolin, & Ruff, 1989; Van der Heide, 1996; Van der Heide, 2000). Reovirusların aynı zamanda hindilerdeki viral artritise neden olduğu belirlenmiştir (Trites, Mills, & Rosenberger, 2011). Bu virus

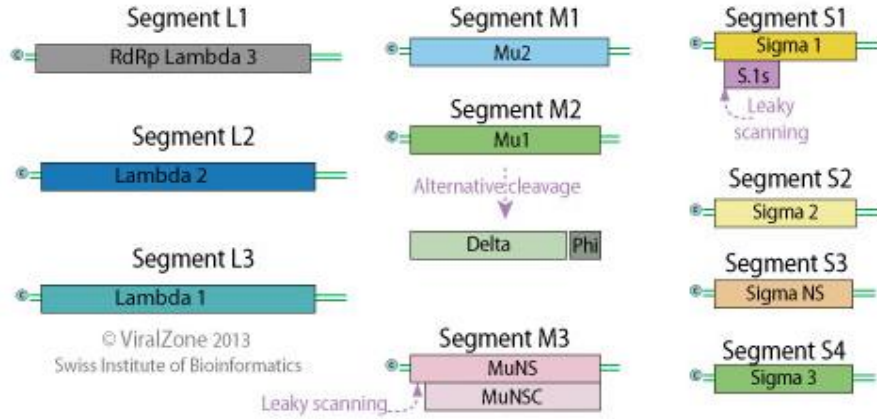
sıklıkla klinik olarak normal görünen tavuk ve hindilerden de izole edilebilmektedir. Reovirus enfeksiyonu takiben gelişen hastalığın seyri konakçı yaşı, immun durumu, virus patotipi, bulaşma yolu gibi faktörlerle yakından ilişkilidir (Jones, 2013). İleri yaşlardaki tavuklar hem enfeksiyon hem de viral kaynaklı lezyon gelişimlerine daha dirençlidir (Jones, 2000). Yapılan çalışmalarda bir günlük civcivlerde ileriki yaşlarda enfekte olmuş tavuklara göre daha yüksek intestinal virus titrelerinin gözlemlendiği ve daha yaygın eklem lezyonlarının geliştiği görülmüştür (Jones & Georgiou, 1984). Diğer enfeksiyöz ajanlarla etkileşimleri bildirilmiş olup bu etkileşimler reovirus kaynaklı hastalığın hem seyrinde hem de şiddetinde farklılıklar oluşmasına neden olmaktadır (Jones, 2013). Örneğin *Mycoplasma synoviae*, *Staphylococcus aureus*, Enfeksiyöz Bursal Hastalığı Virus ve Tavuk Anemi Virus, Reovirus patogenezisini hızlandırabilen enfeksiyöz ajanlardandır (Bradbury & Garuti, 1978; McNeilly, Smyth, Adair, & McNulty, 1995; Moradian, Thorsen, & Julian, 1990). Etçi tip genç tavuklarda ARV enfeksiyonlarının neden olduğu ekonomik kayıplar genellikle yüksek mortalite, viral artrit/tenosynovitis ve düşük canlı ağırlık artışı ve yemden yararlanma, pazarlanabilirlikte azalma gibi özelliklerle ifade edilebilecek genel bir performans düşüklüğü ile ilişkilendirilmektedir (Dobson & Glisson, 1992; Jones, Al-Afaeq, Savage, & Islam, 1994; Rosenberger & Olson, 1997). Damızlık kümeslerde ise yumurta üretiminin başlangıcı veya devamında viral artrit gelişimi topallık, yüksek mortalite, düşük yumurta üretimi, uygun olmayan kuluçkalanabilirlik/fertilite ve vertikal bulaşma ile karakterizedir. Bütün bu olumsuzluklar kanatlı üreticilerine önemli maddi kayıplar yaşatmaktadır (Jones, 2013). Reovirus enfeksiyonları yaygın olarak görülmele birlikte hastalığı meydana getiren tek etken olarak bulunduğu durumlar nadirdir. Tavuklarda hastalığın en yaygın semptomu topallıktır. Morbidite değişken olup, genelde %10'nun altında seyreder, mortalite düşük orandadır. Reovirus kaynaklı artritlerde klinik belirtiler patognomonik değildir ve *M. synoviae* ve *S. aureus* gibi diğer etkenlerle benzerlik göstermektedir (Jones, 2000).

ARV'lar, iki katlı kapside sahip olan, ikosahedral yapıda, 70-80 nm çapında, zarfsız viruslardır. ARV zarfsız bir morfolojik yapı gösterdiği için kloroform, eter, sodyum deoksikolat ve formaline karşı dirençlidir. ARV pH 3.0 ve 9.0 aralığında

stabildir ve 56°C’de bir saatten daha kısa bir sürede inaktive olur. ARV’nin yaygın olarak kullanılan materyallerde canlı kalma sürelerini araştıran bir çalışma virusun tüylerde, talaşta, camda, kauçuk ve galvanize metalde 10 güne kadar, suda ise 10 hafta canlı kaldığını göstermiştir (Jones, 2000). Virusun proteolitik enzimlere karşı dirençli olduğu bildirilmekle birlikte Al Afaleq & Jones (1991) tarafından yapılan bir çalışmada hindi ekleminden elde edilmiş bir suşun tripsine karşı duyarlı olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda ARV’nin belirli dezenfektanlara karşı gösterdiği direnç suşlar arasında farklılıklar göstermektedir. Örneğin, bir suş 4°C’de %2 formaldehitte canlı kalabilirken; diğer bir suş ise oda sıcaklığında %2 fenol ile 24 saatlik inkübasyonunda kısmen inaktive olmuştur. %100 etil alkol ise virus üzerinde tamamen etkili olmuştur (Petek et al., 1967).

ARV genomu, 10 segment içeren çift iplikçikli RNA’dan (double stranded RNA: dsRNA) oluşmaktadır. Genomda bulunan 10 adet dsRNA segmenti, elektroforetik mobiliteleri baz alınarak L (large), M (medium), S (small) şeklinde üç sınıf şeklinde tanımlanmıştır (şekil 4). L ve M sınıfları üçer adet (sırasıyla L1, L2, L3 ve M1, M2, M3) ve S sınıfı dört adet (S1, S2, S3, S4) segmenti içermektedir (Spandidos & Graham, 1976). Genomik lokasyonları değerlendirildiğinde S1 segmenti S2 ile karşılaştırıldığında M3’e daha yakın olması nedeniyle M sınıfında bir gen (M4) olarak kabul edilmesi gerekmektedir. Ancak memeli reoviruslarına benzerliği göz önüne alındığında S1 olarak tanımlanmasının daha doğru olacağı bildirilmektedir. Örneğin her iki virus da üç adet M ve dört adet S geni içermekte ve her iki virusa ait σ -sınıfı hücre bağlantı proteini S1 geni tarafından kodlanmaktadır. L2 segmenti hariç S1133 ARV suşuna ait tüm genom segmentlerinin nükleotid sekansları belirlenmiştir. S1 dışındaki bütün diğer genom segmentleri tek bir temel translasyon ürününü kodlamaktadır (Benavente & Martınez-Costas, 2007). Her segmente ait pozitif iplikçik mRNA’da kodlanana eşdeğerdir ve 5’ ucunun sonunda tip-1 cap içermektedir. Aynı pozisyonda negatif iplikçik ise pirofosfat grubunu taşımaktadır (Martinez-Costas, Varela, & Benavente, 1995). 5’ucundaki ilk 7 nükleotid (GCUUUUU) ve 3’ucundaki son beş nükleotid (UCAUC) tüm kanatlı reoviruslarına ait pozitif iplikçik sekanslarında korunmuştur. Bu durum korunmuş olan bu sekansların, viral transkriptlerin transkripsiyon, replikasyon ve/veya enkapsidasyonu

için hedef bölge olduğuna işaret etmektedir. Diğer *Reoviridae* familyasına ait viruslarda olduğu gibi hücrelerin iki ayrı ARV izolatu ile koenfeksiyonu her iki atasal virusa ait genom segmentlerini içeren projeni virüslerin meydana gelmesine sebep olmaktadır. “Reassortment” olarak adlandırılan bu fenomen bireysel genom segmentlerinin fenotipik özelliklerinin karakterize edilmesinde oldukça yararlıdır (Benavente & Martínez-Costas, 2007).



Şekil 4. ARV genomu (Viralzone, 2021)

ARV genomu en az 12 temel translasyon ürünü eksprese etmektedir. Bunlardan sekizi projeni reovirionlara katılan yapısal proteinlerdir. Diğer dört protein ise yapısal olmayan proteinlerdir çünkü enfekte olan hücrelerde eksprese olur ancak olgun reovirionlarda bulunmaz (Martínez-Costas, Grande, Varela, García-Martínez, & Benavente, 1997; Varela & Benavente, 1994). L sınıfı genler tarafından kodlanan proteinler lambda (λ), M sınıfı tarafından kodlananlar mu (μ) ve S sınıfı tarafından kodlananlar ise sigma (σ) olarak tanımlanmaktadır. Her bir sınıftaki yapısal proteinler, elektroforetik mobilitelerine göre, memelilerdeki sayısal isimlendirmeden farklı olması amacıyla alfabetik olarak sıralanmış harflerle gösterilmektedir (λ_A , λ_B vs.). Kanatlı reovirionunda sekizi (λ_A , λ_B , λ_C , μ_A , μ_B , σ_A , σ_B ve σ_C) kodlayan mRNA'larının temel translasyon ürünleri olan 10 farklı yapısal protein bulunmaktadır. Diğer ikisi ise (μ_{BN} ve μ_{BC}) prekürsörleri olan μ_B 'nin post translasyonel ayrılmasından köken almaktadır (Varela, Martínez-Costas, Mallo, & Benavente, 1996). Yapısal proteinlerin yanısıra ARV birçok yapısal olmayan protein de sentezlemektedir. Bu bağlamda M3 ve

S4 genleri μ NS ve σ NS olarak tanımlanan iki major yapısal olmayan proteini eksprese etmektedir. Bu proteinler enfekte olmuş hücrelerin sitoplazmalarında rahatlıkla saptanabilmektedir (Schnitzer, Ramos, & Gouvea, 1982; Varela & Benavente, 1994). Bununla birlikte amino-trunkasyon geçirmiş olan μ NS izoformu olan μ NSC'nin ARV ile enfekte hücrelerde üretildiği bildirilmiştir (Touris-Otero, Martinez-Costas, Vakharia, & Benavente, 2004). Yapılan diğer çalışmalarla p10 ve p17 olarak adlandırılan iki diğer yapısal olmayan proteinin ARV'ye ait trisistronik S1 geninin ilk iki sistronu tarafından kodlandığı gösterilmiştir (Bodelón, Labrada, Martinez-Costas, & Benavente, 2001; Shmulevitz et al., 2002).

Reovirus enfeksiyonlarının bulunduğu kümeslerde enfeksiyonun seyrine bağlı olarak klinik semptomları gösteren veya göstermeyen hayvan sayılarında farklılıklar gözlenebilir. Bununla birlikte, klinik belirtileri gösteren hayvan sayısı oldukça az olduğu durumlara da rastlanabilmektedir. Bu nedenle örnekleme klinik ve subklinik vakalar ve aynı zamanda da sağlıklı tavukları da kapsayan geniş bir perspektifle gerçekleştirilmelidir. Virusun saptanabilmesi için, nekropsi aşamasında çapraz kontaminasyonlara dikkat edilmesi koşuluyla hasta tavuklar direkt laboratuvara gönderilebilir veya aseptik koşullarda alınan doku örneklerinin laboratuvara sevki sağlanabilir. Örnekler dışkı, trakea, karaciğer, bursa, böbrek ve dalak olabilir. Örnekler laboratuvara transport medium içerisinde soğuk zincirde gönderilmelidir (Jones, 2000; Jones, 2013).

Virus izolasyonu için en başarılı yöntem ETY veya tavuk embriyo hücre kültürlerine örneğin inokulasyonudur. ETY'nin sarı kesesine yapılan inokulasyon sonucunda embriyoda hemoraji oluşmakta ve 3-5 gün içinde ölüm meydana gelmektedir. CAM'a inokulasyon sonucunda genellikle 7-8. günde embriyo ölümü, embriyolar cücelik ve karaciğer ve dalakta nekrotik lezyonlar görülür (Rosenberger, 2003). Reoviruslar tavuk embriyo hücre kültüründe ise birkaç günde sinsityum oluşumuna yol açar. Hücreler hemotoksilen ve eosin ile boyandığında eozinofilik intranükleer inklüzyonlar görülebilir. Virusun dokularda düşük titrelerde bulunduğu durumlarda 2 veya 3 kez pasaj yapmak gerekebilir. Reovirus negatif boyama veya immunoflouresan boyamayı takiben elektron mikroskobu yardımıyla teşhis edilebilir (Jones, 2000). Al-

Muffarej, Savage, & Jones (1996) yüksek titrede virus ile deneysel amaçla enfekte edilen kümeşte kloakal svablardan virusu tespit edememişleridir. Reovirusların izolasyon ve identifikasyonu zaman alan işlemlerdir. Bu nedenle daha hızlı teknikler geliştirilmeye çalışılmıştır. Deneysel enfeksiyonlardan sonra virusun belirlenebilmesi için tendonların kriyostat bölümlerinden gerçekleştirilen direkt immunofloresans boyama kullanılabilir (Jones & Onunkwo, 1978). Aynı zamanda Liu & Giambrone (1997b) parafine gömülü dokulardan immunoperoksidaz boyama metodu ile monoklonal antikorların Reovirus teşhisinde kullanılabileceğini önermektedir. Bununla birlikte her iki metot da topallık gibi klinik semptomların ortaya çıkışından önce enfeksiyonun sadece erken safhalarında teşhisini sağlamaktadır (Jones, 2000).

Virusun belirlenebilmesi için kullanılan geleneksel izolasyon yöntemlerinin yanı sıra günümüzde daha etkin, hızlı ve güvenilir sonuçlar alınmasını sağlayan PCR tabanlı moleküler yöntemler geliştirilmiştir. ARV'lerin teşhisi için kullanılan moleküler yaklaşımların etkinliği yapılan birçok çalışmayla ortaya konmuştur. Suşların tiplendirilmesinde de kullanılabilecek olan bu tekniklere dot-blot hibridizasyon (Liu & Giambrone, 1997a; Yin & Lee, 1998), PCR (Xie, Fadl, Girshick, & Khan, 1997), PCR-RFLP (Lee, Shien, & Shieh, 1998; Liu, Chen, Liao, Lin, & Chang, 1999), rPCR ve dizileme yöntemleri (Ke et al., 2006) örnek verilebilir. Bu metotlar hızlı ve hassas olmaları nedeniyle saha materyallerinin değerlendirilmesi için yapılan rutin uygulamalarda kullanılabilir. Ancak, sonuçların virus izolasyonu ile karşılaştırılması gerekmektedir. Bu yöntem ARV teşhisinde gold standarttır. Bununla birlikte virus izolasyonu, aynı virus kullanılarak yapılacak olan sonraki çalışmalar için de gereklidir (Lu et al., 2015). ARV teşhisi için kullanılacak olan antikorları belirleyebilmek amacıyla agar gel immunodifüzyon (AGID) (Kawamura & Tsubahara, 1966; Olson & Weiss, 1972), VN, indirekt immunofloresans (IIF) testi (Ide, 1982) ve ELISA (Thayer, Villegas, & Fletcher, 1987; Slaght, Yang, van der Heide, & Fredrickson, 1978) gibi birçok farklı yöntem geliştirilmiştir. Aynı zamanda Western-blot metodu da kullanılabilir (Endo-Munoz, 1990). Reovirus antikorları için serolojik profil sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak enfeksiyonun yaygın olması tekniğin diagnostik değerini sınırlamaktadır. Özellikle yumurtacı kümeslerde ARV için uygun olan diğer bir

metot sarı kesesinin değerlendirilmesidir. Silim & Venne (1989) serum ile sarı kesedeki titreleri arasında yüksek bir korrelasyon olduğunu bildirmişlerdir. ELISA sonuçlarının kuşkulu olduğu durumlarda serum, Western-blot ya da IIF yöntemleri kullanılarak tekrar test edilebilir.

Tavuklarda patojenik ARV'lere karşı maksimum duyarlılık bir günlük yaşta görülmektedir ve daha sonrasında iki haftalık yaşta başlayan yaşa bağlı bir dirençlilik gelişmektedir. Meydana gelen bu akut duyarlılık nedeniyle aşılama programları civcivlerin yumurtadan çıkmalarıyla birlikte koruma sağlayabilecek şekilde dizayn edilmektedir. Bu korunmanın sağlanmasında uygulanacak en uygun yöntem parent kümeslerin aşılama yoluyla yüksek seviyelerdeki maternal antikörlerin civcivlere aktarımı ve transovarian geçişin minimize edilmesidir. Aynı zamanda bu yöntem ile yumurtadan çıkıştan sonra bağırsaklarda replike olan virusun da eklemlere ulaşması ve artrit meydana getirmesi engellenmiş olur (Jones, 2013). Maternal antikörlerin indüksiyonu en iyi şekilde inaktive aşılama on iki haftalık ya da daha büyük tavuklarda uygulanmasıyla sağlanır. Bununla birlikte bazen canlı aşılama da kullanılabilir. Damızlık kümesler canlı aşılama ile aşılandığında civcivlerde inaktive aşılama yüksek seviyelerde maternal antikörler oluşturmaktadır (Van Loon, Braber, & Roessler, 1996; Wood, Muskett, & Thornton, 1986). Amerika Birleşik Devletleri'nde izole edilmiş olan S1133 suşu birçok ticari aşılama temel teşkil etmektedir. ARV'ye ait birçok endemik varyant bulunmasına rağmen S1133 suşu dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır. İnaktif aşılama ise tekli ya da 1733 ve 2408 gibi suşlardan oluşan kombinasyonlarla uygulanabilmektedir. Genç tavuklardaki aktif immunizasyon canlı attenüe reoviruslarla genellikle subkutan yolla aşılama ile sağlanabilmektedir (Jones, 2013). Aynı zamanda immunizasyon aşılama sprey uygulamalarıyla da oluşturulabilmektedir (Giambone, Dormitorio, & Lockaby, 1992). ARV'de *in ovo* aşılama da çalışılan yöntemlerden birisidir. Farklı ve yeni aşılama yaklaşımları geliştirilmeye devam etmektedir (Guo, Giambone, Liu, Dormitorio, & Wu, 2004; Guo, Giambone, Wu, & Dormitorio, 2003).

Ülkemizde Çarlı, Şen, Ülgen, & Kahraman (1992) tarafından Bursa ilindeki damızlık broylerlerde presipite edici antikör bulunmuştur. Akalın & Ergün (1995) malabsorbsiyon sendromu görülen broyler kümeslerinden alınan serum örneklerinden

AGID testi ile adenovirus ve reovirus antikorlarını araştırmışlardır. Antikor titrelerinin dūřuk çıkması, kullanılan S1133 antijeninden farklı antijenik tipte saha suşlarının olduğunu dūřündürmüřtür. öven & arli (1997) Gumboro hastalığından şüpheli kanatlılarda ARV, adenovirus ve NDV'yi ETY ve CEF hücre kültüründe izole etmişlerdir. Öztürk & öven (1997) ticari broyler kümeslerinde Infectious Bursal Disease Virus (IBDV), ARV ve *Cryptosporidium* sp. tespit etmişlerdir. Mutlu & Yiėit (1997) tarafından yapılan çalışmada aşı suřu olan S1133 ile saha şularının antijenik olarak farklı olduğu bulunmuştur. Nural & şengöl (2012) ELISA testi ile broyler damızlık işletmelerinden toplanan 336 serumun 322'sini ve broyler kümeslerden alınan 295 serumun 224'ünü ARV antikorları yönünden pozitif bulmuştur. Aydın & Nural (2017) ELISA ile broiler ve broiler damızlık işletmelerinden aşılı ve aşısız tavuklardan alınan toplam 920 serum örneğini test etmişlerdir. Aşılanmış broylerlerin %78'i, aşılanmamış broylerlerin %84,18'i, aşılanmış damızlıkların %86,5'i ve aşılanmamış damızlıkların %89,71'inde ARV antikorlarını saptamışlardır.

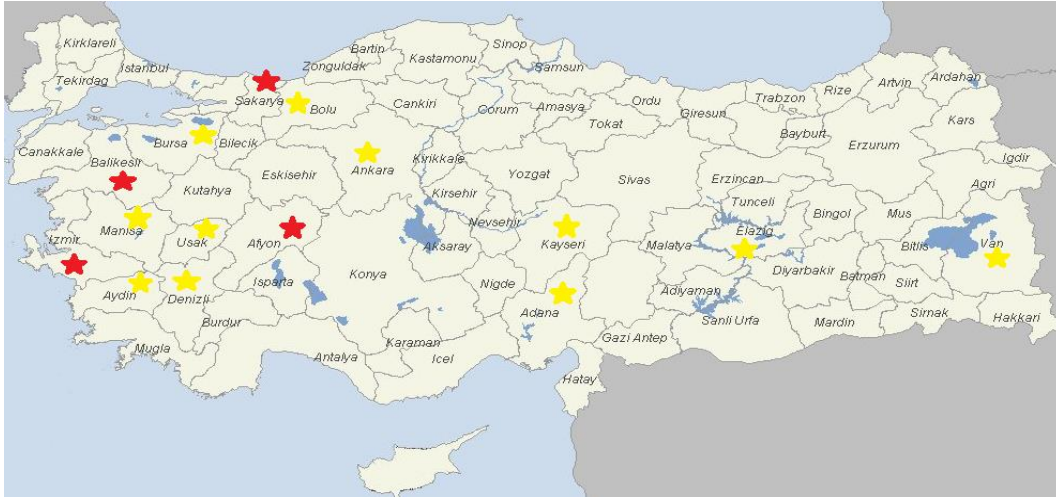
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul İzin Belgesi

“Önemli Kanatlı Solunum Yolu Virus Enfeksiyonlarının Real-Time Polymerase Chain Reaction (rPCR) ile Araştırılması” isimli bu tezin çalışmalarına başlanmadan önce, embriyolu tavuk yumurtaları için gerekli izin Uludağ Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından 02.02.2016 tarihli ve 2016-02/06 nolu karar ile onaylandı.

3.2. Örnekler

Bu çalışmada ülkemizdeki 15 farklı ilde bulunan ticari broyler ve yumurtacı sürülerde, klinik solunum yolu problemlili tavuklardan trakeal svab örnekleri toplandı (Şekil 5). Enfeksiyon şüpheli tavuklarda gözlenen klinik bulgular hırıltılı solunum, nazal akıntı, öksürük, hapşırık, nefes almada güçlük, durgunluk ve yem tüketiminde azalma olarak tespit edildi. 45 adet yumurtacı ve 48 adet broyler kümeden solunum yolu semptomlarının gözlenmesiyle birlikte trakeal svab örnekleri alındı. Her bir küme için 4-5 adet tavuktan alınan bu trakeal svablar soğuk zincir bozulmadan transport besiyeri (tryptose phosphate broth, pH 7,0 – 7,2) içinde laboratuvara ulaştırıldı. Laboratuvarda aynı kümeden alınan svablar tek bir örnek olarak bir araya getirildi ve vorteksenerek inokulum hazırlandı. Embriyolu yumurtalara tek bir örnek olarak inoküle edildi. Böylece toplamda 93 adet örnek incelenmiş oldu. İşletme ve örnek toplama ile ilgili bilgiler Tablo 1 ve 2’de sunulmuştur. Örnekler deneysel aşamanın gerçekleştirileceği zamana kadar -20°C’de muhafaza edildi.



Şekil 5. Örneklerin toplandığı illerin harita üzerinde gösterilmesi. İşaretlenen illerden kümes bazında 1-10 arası örnek alınanlar sarı, 10'dan fazla örnek alınanlar kırmızı belirteçle işaretlenmiştir.

Tablo 1. Yumurtacı kümeslerden alınan örneklere ait bilgiler

İşletme Kodu	İşletme Türü	İl	Yıl*
Y1	Yumurtacı	Ankara	2015
Y2	Yumurtacı	Ankara	2015
Y3	Yumurtacı	İzmir	2016
Y4	Yumurtacı	İzmir	2016
Y5	Yumurtacı	İzmir	2016
Y6	Yumurtacı	İzmir	2016
Y7	Yumurtacı	İzmir	2017
Y8	Yumurtacı	İzmir	2017
Y9	Yumurtacı	İzmir	2017
Y10	Yumurtacı	İzmir	2017
Y11	Yumurtacı	Afyon	2016
Y12	Yumurtacı	Afyon	2016
Y13	Yumurtacı	Afyon	2016
Y14	Yumurtacı	Afyon	2016
Y15	Yumurtacı	Afyon	2016
Y16	Yumurtacı	Afyon	2016
Y17	Yumurtacı	Afyon	2016
Y18	Yumurtacı	Afyon	2017
Y19	Yumurtacı	Afyon	2017
Y20	Yumurtacı	Afyon	2017
Y21	Yumurtacı	Afyon	2017
Y22	Yumurtacı	Afyon	2017
Y23	Yumurtacı	Afyon	2017

Y24	Yumurtacı	Manisa	2016
Y25	Yumurtacı	Manisa	2016
Y26	Yumurtacı	Manisa	2016
Y27	Yumurtacı	Manisa	2017
Y28	Yumurtacı	Uşak	2016
Y29	Yumurtacı	Denizli	2017
Y30	Yumurtacı	Aydın	2016
Y31	Yumurtacı	Sakarya	2016
Y32	Yumurtacı	Sakarya	2017
Y33	Yumurtacı	Sakarya	2017
Y34	Yumurtacı	Sakarya	2017
Y35	Yumurtacı	Bursa	2017
Y36	Yumurtacı	Kayseri	2017
Y37	Yumurtacı	Adana	2016
Y38	Yumurtacı	Adana	2017
Y39	Yumurtacı	Adana	2017
Y40	Yumurtacı	Adana	2017
Y41	Yumurtacı	Adana	2017
Y42	Yumurtacı	Elazığ	2016
Y43	Yumurtacı	Elazığ	2016
Y44	Yumurtacı	Van	2017
Y45	Yumurtacı	Van	2017

*Örneklerin işletmeden alındığı yıl

Tablo 2. Broyler kümeslerinden alınan örneklere ait bilgiler

İşletme Kodu	İşletme Türü	İl	Yıl*
B1	Broyler	İzmir	2016
B2	Broyler	İzmir	2016
B3	Broyler	İzmir	2016
B4	Broyler	İzmir	2016
B5	Broyler	Uşak	2016
B6	Broyler	Uşak	2016
B7	Broyler	Balıkesir	2016
B8	Broyler	Balıkesir	2016
B9	Broyler	Balıkesir	2016
B10	Broyler	Balıkesir	2016
B11	Broyler	Balıkesir	2016
B12	Broyler	Balıkesir	2016
B13	Broyler	Balıkesir	2016
B14	Broyler	Balıkesir	2016
B15	Broyler	Balıkesir	2016
B16	Broyler	Balıkesir	2016

B17	Broyler	Balıkesir	2016
B18	Broyler	Balıkesir	2017
B19	Broyler	Balıkesir	2017
B20	Broyler	Balıkesir	2017
B21	Broyler	Balıkesir	2017
B22	Broyler	Balıkesir	2017
B23	Broyler	Balıkesir	2017
B24	Broyler	Balıkesir	2017
B25	Broyler	Balıkesir	2017
B26	Broyler	Sakarya	2017
B27	Broyler	Sakarya	2017
B28	Broyler	Sakarya	2017
B29	Broyler	Sakarya	2017
B30	Broyler	Sakarya	2017
B31	Broyler	Sakarya	2017
B32	Broyler	Sakarya	2017
B33	Broyler	Sakarya	2017
B34	Broyler	Sakarya	2017
B35	Broyler	Sakarya	2017
B36	Broyler	Sakarya	2017
B37	Broyler	Sakarya	2017
B38	Broyler	Sakarya	2017
B39	Broyler	Sakarya	2017
B40	Broyler	Sakarya	2017
B41	Broyler	Sakarya	2017
B42	Broyler	Sakarya	2017
B43	Broyler	Sakarya	2017
B44	Broyler	Sakarya	2017
B45	Broyler	Sakarya	2017
B46	Broyler	Sakarya	2017
B47	Broyler	Sakarya	2017
B48	Broyler	Bolu	2016

*Örneklerin işletmeden alındığı yıl

3.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Vorteks (Digital vortex mixer, VWR, ABD)

Etüv (Nüve, FN 300, Türkiye)

Santrifüj (VWR Galaxy D Microcentrifuges C9422-VWR Galaxy 16D, ABD).

Mikropipetler (0,1-2 µl ve 20-200 µl RAININ Pipet-lite XLS, 1-10 µl ve 10-100 µl Hamilton)

Hassas terazi (Sartorius AX224, Göttingen, Almanya)

Ultra saf su sistemleri (Millipore Mili-Q Q-Gard1, İngiltere)

Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Nüve MK-390, Türkiye)

Otoklav (Nüve, OT4060, Ankara, Türkiye)

Biyogüvenlik kabineti Tip II (MSC-12, Thermo Scientific, ABD)

rPCR (Fluorion Detection System: FDS, İontek, İstanbul, Türkiye)

Thermal Cyclers (BioRad C100 Touch Thermal Cyclers, BioRad Laboratories, Kaliforniya, ABD)

Jel elektroforez cihazı (BioRad Laboratories, Kaliforniya, ABD)

Jel elektroforez tankı (BioRad Laboratories, Kaliforniya, ABD)

Jel görüntüleme sistemi (Gel Doc 2000, BioRad Laboratories, Kaliforniya, ABD)

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Kaliforniya, ABD)

Derin dondurucu (-20) (Arçelik)

Buzdolabı (Arçelik)

3.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, Almanya) (Catalog no. 57704)

Buffer AL (Lysis buffer)

Buffer AW1 (Wash buffer)

Buffer AW2 (Wash buffer)

Buffer AVE (Elution buffer)

Carrier RNA

QIAGEN Protease

QIAamp MinElute kolonu

Toplama tüpleri

QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, Almanya) (Catalog no. 204245)

2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix:

- HotStarTaq DNA Polimeraz
- QuantiTect SYBR RT-PCR Tamponu (Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂)
- dNTP (Ultrasaf dATP, dGTP, dCTP, dTTP/dUTP)
- SYBR Green I (Floresan boya)
- ROX (Pasif referans boya)
- 5 mM MgCl₂

RNase-free su

QuantiTect RT mix (Omniscript ve Sensiscript reverse transkriptaz)

QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, Almanya) (Catalog no. 204245)

2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix:

- HotStarTaq DNA Polimeraz
- QuantiTect SYBR RT-PCR Tamponu (Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂)
- dNTP (Ultrasaf dATP, dGTP, dCTP, dTTP/dUTP)
- SYBR Green I (Floresan boya)
- ROX (Pasif referans boya)
- 5 mM MgCl₂

RNase-free su

Bu kit ILTV'nin teşhisinde kullanıldı ve bu virus bir DNA virusu olduğu için reverse transkripsiyon işlemine gerek duyulmadığı için, QuantiTect RT mix (Omniscript ve Sensiscript reverse transkriptaz) reaksiyondan çıkarıldı.

QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen, Almanya) (Catalog no. 204445)

2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix:

- HotStarTaq DNA Polimeraz
- QuantiTect Probe RT-PCR Tamponu (Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 8 mM MgCl₂)
- dNTP (Ultrasaf dATP, dGTP, dCTP, dUTP)
- ROX (Pasif referans boya)
- 8 mM MgCl₂

QuantiTect RT mix (Omniscrypt ve Sensiscrypt reverse transkriptaz)
RNase-free su

QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen, Almanya) (Catalog no. 204345)

2x QuantiTect Probe PCR Master Mix:

- HotStarTaq DNA Polimeraz
- QuantiTect Probe PCR Tamponu (Tris-Cl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8 mM MgCl_2)
- dNTP (Ultrasaf dATP, dGTP, dCTP, dTTP/dUTP)
- ROX (Pasif referans boya)
- 8 mM MgCl_2

RNase-free su

BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Ready Reaction Premix 2.5X

BigDye Sequencing Buffer 5X

RNase-free su

QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer (Qiagen, Almanya)

QIAGEN dNTP mix (Qiagen, Almanya)

QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix (Omniscrypt ve Sensiscrypt reverse transkriptaz ve HotStarTaq DNA Polymeraz) (Qiagen, Almanya)

QIAGEN Taq PCR Master Mix (Qiagen, Almanya)

Ethanol (Merck Millipore, Almanya) (Catalog no. 10983)

PBS (Oxoid, İngiltere)

Thermo Scientific 6X Orange Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, ABD)

DNA Ladder (Rainbow, Almanya, 100bç-3000bç)

0,2-1,5 ml'lik Ependorf tüpleri (Zinexts Life Science Corp, Taiwan)

200 µl ve 1000 µl'lik pipet ucu (AXYGEN ve VWR)

3.5. Çalışmada Kullanılan Primer Dizileri

IBV tespitinde kullanılan spesifik primerler (Callison et al., 2006)

IBV5'GU391: 5'-GCT TTT GAG CCT AGC GTT-3'

IBV5'GL533: 5'-GCC ATG TTG TCA CTG TCT ATT G-3'

IBV5'G prob: 5'-FAM-CAC CAC CAG AAC CTG TCA CCT C-BHQ1-3'

IBV *SI* geninin amplifikasyonunda kullanılan spesifik primerler (Worthington et al., 2008)

SX1+: 5'-CAC CTA GAG GTT TGT/C TA/TG CAT-3'

SX2-: 5'-TCC ACC TCT ATA AAC ACC C/TTT-3'

SX3+: 5'-TAA TAC TGG C/TAA TTT TTC AGA-3'

SX4-: 5'-AAT ACA GAT TGC TTA CAA CCA CC-3'

ILTV *p32* geninin amplifikasyonunda kullanılan primerler (Vögtlin, Bruckner, & Ottiger, 1999)

ILTp32 U2: 5'-CTA CGT GCT GGG CTC TAA TCC-3'

ILTp32 L2: 5'-AAA CTC TCG GGT GGC TAC TGC-3'

ILTV *ICP4* geninin amplifikasyonunda kullanılan primerler (de Macedo Couto et al., 2015)

ICP4 (fragment 1)

F: 5'-GGG TCT TGT TCT GCA GGA TTC T-3'

R: 5'-CAT CGG GAC ATT CTC CAG GTA GCA-3'

ICP4 (fragment 2)

F: 5'-CTT CAG ACT CCA GCT CAT CTG-3'

R: 5'-AAT GAG CAC GCA ACC AGA AGT AA-3'

ILTV *TK* geninin amplifikasyonunda kullanılan primerler (de Macedo Couto et al., 2015)

F: 5'-CTT AGC GGA ACC TAT GCA AG-3'

R: 5'-GAG GCC ATG TGC TGG TAA GT-3'

AMPV *N* geninin amplifikasyonunda kullanılan primerler (Bäyon-Auboyer et al., 1999)

Nd: 5'- AGC AGG ATG GAG AGC CTC TTT G -3'

Nx: 5'- CAT GGC CCA ACA TTA TGT T -3'

Reovirus *S2* geninin amplifikasyonunda kullanılan primerler (Ke et al., 2006)

σA1: 5'- ATT ACG CAG AGG CAT TT-3'

σA2: 5'- CCC ACT GCC GAA TAC A-3'

3.6. Çalışmada Kullanılan Solüsyon ve Tamponların Hazırlanması

%1'lik tavuk eritrosit süspansiyonu (v/v): Üç adet sağlıklı tavuktan alınan kan antikoagulanlı tüp içine koyularak santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve PBS ile üç kez yıkandı. Süspansiyonu hazırlamak için 99 ml PBS üzerine 1 ml saf eritrositten ilave edilerek %1'lik eritrosit süspansiyonu hazırlandı (OIE, 2018c).

Buffer AW1

25 ml ethanol eklenerek hazırlandı.

Buffer AW2

30 ml ethanol eklenerek hazırlandı.

Carrier RNA

310 ml AVE buffer eklenerek hazırlandı.

QIAGEN Protease

1.4 ml Buffer AVE eklenerek hazırlandı.

IBV için İONTEK tarafından geliştirilen ve ticari olarak kullanıma sunulan deteksiyon kiti kullanıldı. Bu nedenle primer konsantrasyonu için herhangi bir ön hazırlık yapılmasına gerek duyulmamıştır.

ILTV *p32* geni için Forward Primer

Liyofilize içeriğe 780 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

ILTV *p32* geni için Reverse Primer

Liyofilize içeriğe 770 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

ILTV *ICP4* (fragment 1) geni için Forward Primer

Liyofilize içeriğe 870 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

ILTV *ICP4* (fragment 1) geni için Reverse Primer

Liyofilize içeriğe 560 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

ILTV *ICP4* (fragment 2) geni için Forward Primer

Liyofilize içeriğe 560 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

ILTV *ICP4* (fragment 2) geni için Reverse Primer

Liyofilize içeriğe 630 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

ILTV *TK* geni için Forward Primer

Liyofilize içeriğe 590 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

ILTV *TK* geni için Reverse Primer

Liyofilize içeriğe 980 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

AMPV *N* geni için Forward Primer

Liyofilize içeriğe 406 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

AMPV *N* geni için Reverse Primer

Liyofilize içeriğe 352 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

Reovirus *S2* geni için Forward Primer

Liyofilize içeriğe 810 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

Reovirus S2 geni için Reverse Primer

Liyofilize içeriğe 680 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

%1,5'lik Agaroz Jelin Hazırlanması: PCR işlemi sonrasında, amplifikasyon ürünlerinin kontrol edilmesi amacıyla %1,5'lik agaroz jel hazırlandı. 100 ml 0,5X TBE içine 1,5 gr agaroz eklenerek ısıtıcılı manyetik karıştırıcı yardımıyla 250-300°C sıcaklıkta karıştırıldı. Hava kabarcığı oluşturmamaya dikkat edilerek jel karışımı sabit hızda, ara verilmeksizin, jel dökme setine dökülerek tarak yerleştirildi. Jel donduktan sonra tarak çıkarılarak, hazırlanan %1,5'lik agaroz jel, içinde 0,5 X TBE bulunan elektroforez tankına alındı. Örnek başına 1,5 µl SYBR Green I kullanıldı.

3.7. rPCR'da Kullanılan Pozitif ve Negatif Kontroller

rPCR ve dizileme testlerinin yapılması için çalışmalarda pozitif kontrol olarak ILTV A96, aMPV, Reovirus S1133 standart suşları ve IBV standart suşları olan Beaudette, Massachusetts 41 (M41), H120, D3128, D274 ve D247 kullanıldı. Bu suşlar, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarından temin edildi. Çalışmada negatif kontrol olarak deiyonize su kullanıldı.

3.8. AIV İzolasyonu

Trakeal svablar bakteriyel kontaminasyonun önlenmesi amacıyla 10,000 IU/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin ve 250 IU amphotericin B/ml içeren PBS (pH 7,0-7,4) içinde homojenize edildi. Oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve 0,2 µm porlu filtrelerden geçirilerek inokülasyona hazır hale getirildi. İzolasyonlar için 9-11 günlük SPF ETY'lerden faydalanıldı. Hazırlanan örnek süpernatantından 0,2 ml her bir yumurtaya olmak kaydıyla 3 adet ETY'nin allantoik boşluğuna inoküle edildi. Takiben, yumurtalar 37°C'de 2-7 gün bırakıldı ve 24 saatlik aralıklarla embriyoların canlılık kontrolleri yapıldı. İlk gün ölümleri nonspesifik olarak değerlendirilerek, 7 gün boyunca her gün ışık altında canlılık muayenesi yapıldı. Bu süreçte ikinci günden sonra ölen yumurtaların allantoik sıvıları steril pipet yardımıyla

toplandı. Ölü veya ölmekte olan embriyolar ve inkübasyon sonuna kadar canlı kalan tüm yumurtalar buzdolabında bir gece bekletilerek canlı kalanların ölmesi ve kan damarlarının çekilmesi sağlandı. Allantoik sıvılar daha sonra HA aktivitesi yönünden incelenmek amacıyla 4°C'de bekletildi (OIE, 2018c).

3.9. NDV İzolasyonu

Trakeal svablar, bakteriyel kontaminasyonun önlenmesi amacıyla 10,000 IU/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin ve 250 IU amphotericin B/ml içeren PBS (pH 7,0-7,4) içine eklenerek homojenize edildi. Oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve 0,2 µm porlu filtrelerden geçirilerek inokülasyona hazır hale getirildi. İzolasyonlar için 9-11 günlük SPF ETY'lerden faydalanıldı. Hazırlanan örnek süpernatantından 0,2 ml her bir yumurtaya olmak kaydıyla 3 adet ETY'nin allantoik boşluğuna inoküle edildi. Takiben, yumurtalar 37°C'de 4-7 gün bırakıldı ve 24 saatlik aralıklarla embriyoların canlılık kontrolleri yapıldı. İlk gün ölümleri nonspesifik olarak değerlendirilerek, 7 gün boyunca her gün ışık altında canlılık muayenesi yapıldı. Bu süreçte ikinci günden sonra ölen yumurtaların allantoik sıvıları steril pipet yardımıyla toplandı. Ölü veya ölmekte olan embriyolar ve inkübasyon sonuna kadar canlı kalan tüm yumurtalar buzdolabında bir gece bekletilerek canlı kalanların ölmesi ve kan damarlarının çekilmesi sağlandı. Allantoik sıvılar daha sonra HA aktivitesi yönünden incelenmek amacıyla 4°C'de bekletildi (OIE, 2018d).

3.10. IBV İzolasyonu

İzolasyonlar için 9-11 günlük SPF ETY'ler kullanıldı. Yumurta inokülasyonu için trakeal svab 10,000 IU/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin ve 250 IU amphotericin B/ml içeren PBS (pH 7,0-7,4)'e eklenerek homojenize edildi. Daha sonra süspansiyonlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifügasyonla makropartiküllerden arındırıldı, berraklaştırıldı ve 0,2 µm porlu filtrelerden geçirilerek inokülasyona hazır hale getirildi. Hazırlanan örnek süpernatantından 0,2 ml her bir yumurtaya olmak kaydıyla 3 adet ETY'nin allantoik boşluğuna inoküle edildi. Yumurtalar 37°C'de 4-7 gün bırakıldı ve 24 saatlik aralıklarla embriyoların canlılık kontrolleri yapıldı. İlk gün ölümleri nonspesifik

olarak değerlendirilerek, 7 gün boyunca her gün ışık altında canlılık muayenesi yapıldı. İlk inoklasyonda mortalite ve lezyon oluşmaması durumunda, yumurtaların allantoik sıvıları bir araya toplandı, 1/5 oranında PBS ile sulandırıldı ve birkaç set pasajlama yapıldı. Allantoik sıvılar daha sonra kullanım amacıyla kısa dönem için -20°C’de depolandı (OIE, 2018a).

3.11. ILTV İzolasyonu

İzolasyonlar için 10-12 günlük SPF ETY’ler kullanıldı. Yumurta inokülasyonu için trakeal svab 1/5 oranında 10,000 IU/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin ve 250 IU amphotericin B/ml içeren PBS (pH 7,0-7,4) ile sulandırıldı. Daha sonra süspansiyonlar 3000 rpm’de 10 dakika santrifügasyonla makropartiküllerden arındırıldı. Hazırlanan rnek süpernatantından 0,1 ml her bir yumurtaya olmak kaydıyla 3 adet ETY’de CAM’a inoküle edildi ve 7 gün boyunca her gün ışık altında canlılık muayenesi yapıldı. CAM’lar ve allantoik sıvılar daha sonra kullanım amacıyla kısa dönem için -20°C’de depolandı (OIE, 2018b).

3.12. aMPV İzolasyonu

Trakeal svablar, bakteriyel kontaminasyonun önlenmesi amacıyla 10,000 IU/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin ve 250 IU amphotericin B/ml içeren PBS (pH 7,0-7,4) içine eklenerek homojenize edildi. Oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. İzolasyonlar için 6-8 günlük SPF ETY’lerden faydalanıldı. Hazırlanan rnek süpernatantından 0,2 ml her bir yumurtaya olmak kaydıyla 3 adet ETY’nin sarı kesesine inoküle edildi. Takiben, yumurtalar 37°C’de 7-10 gün inkübasyona bırakıldı ve 24 saatlik aralıklarla embriyoların canlılık kontrolleri yapıldı. İlk pasajdan sonra gelişimi duran veya ölen embriyoların allantoik sıvısı ve sarı kesesi steril pipet yardımıyla toplandı. Bu bulgulara rastlanılmayan embriyolarda pasajlamaya devam edildi. l veya ölmekte olan embriyolar ve inkübasyon sonuna kadar canlı kalan tüm yumurtalar buzdolabında bir gece bekletilerek canlı kalanların ölmesi ve kan damarlarının çekilmesi sağlandı. Allantoik sıvısı ve sarı kesesi daha sonra kullanım amacıyla kısa dönem için -20 °C’de depolandı (OIE, 2018e).

3.13. ARV İzolasyonu

İzolasyonlar için 9-11 günlük SPF ETY'ler kullanıldı. Yumurta inokülasyonu için trakeal svab 10,000 IU/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin ve 250 IU amphotericin B/ml içeren PBS (pH 7,0-7,4) ile sulandırıldı. Daha sonra süspansiyonlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifügasyonla makropartiküllerden arındırıldı. Hazırlanan örnek süpernatantından 0,1 ml her bir yumurtaya olmak kaydıyla 3 adet ETY'de CAM'a inoküle edildi ve 7 gün boyunca her gün ışık altında canlılık muayenesi yapıldı. CAM'lar daha sonra kullanım amacıyla kısa dönem için -20°C'de depolandı (Rosenberger, 2003).

3.14. AIV ve NDV için HA ve HI testleri

Elde edilen tüm allantoik sıvılar HA aktivitesi yönünden Çabuk HA testi ile incelendi. Bu amaçla temiz bir mermer üzerine 0,1 ml allantoik sıvıya eşit miktarda eritrosit süspansiyonu eklenerek birkaç dakika beklendi. Negatif reaksiyon veren allantoik sıvılardan kontrol amacıyla ETY'ye 2. pasaj yapılırken HA aktivitesi görülen allantoik sıvılarda olası bir bakteriyel kontaminasyonu önlemek amacıyla 0,45 µm por çaplı membran filtrelerden geçirildi. Üzerine antibiyotik solüsyonu ile sulandırıldı ve bir set ETY'ye daha pasajlandı. Allantoik sıvılarda AIV veya NDV tarafından oluşturulan HA aktivitesi incelendi.

HA testinde allantoik sıvılar ile birlikte pozitif kontrol (AIV için H5 ve H7 virusları ve NDV için avian paramyxovirus-1 (APMV-1)) ve negatif kontrol (kan kontrol) de çalışıldı. Mikropleytle çalışılan tüm kuyucuklara 25 µl PBS dağıtıldı. 25 µl allantoik sıvı ilk kuyucuğa koyulduktan sonra son kuyucuğa kadar iki katlı seri dilüsyonu yapıldı. Ardından tüm kuyucuklara önce 25 µl PBS sonra 25 µl %1'lik eritrosit süspansiyonu eklendi. Reaksiyonun gerçekleşmesi için mikropleyt oda sıcaklığında 40 dakika tutuldu. Bu süre sonunda dantela şeklinin görüldüğü son kuyucuk 1 HA ünitesi (HAU) olarak belirlendi.

AIV için yapılan HI testinde pozitif kontrol (H5 ve H7 virusları ve H5 ve H7 için standart serum), negatif kontrol ve 4 HAU'ya göre sulandırılmış allantoik sıvılar

kullanıldı. Mikropleyitin kuyucuklarına 25 µl PBS dağıtıldı. Etken için çalışılacak 1. ve 2. sıranın ilk gözüne sırasıyla 25 µl standart serum H5 ve H7 eklendi ve iki katlı seri dilüsyonları yapıldı. Üzerine 25 µl 4 HAU'ya ayarlanan virus süspansiyonundan konuldu ve oda sıcaklığında 15 dakika beklendi. Daha sonra tüm kuyucuklara %1'lik eritrosit süspansiyonu eklendi ve mikropleyt oda sıcaklığında 40 dakika tutuldu. Virusun standart serum H5 ve H7'den biri ile reaksiyona girmesi inhibisyonun olduğunu göstermektedir.

NDV için yapılan HI testinde pozitif kontrol (APMV-1 ve AMPV-1 için standart serum), negatif kontrol ve 4 HAU'ya göre sulandırılmış allantoik sıvılar kullanıldı. Mikropleyitin kuyucuklarına 25 µl PBS dağıtıldı. Etken için çalışılacak 1. sıranın ilk gözüne 25 µl standart serum eklendi ve iki katlı seri dilüsyonu yapıldı. Üzerine 25 µl 4 HAU'ya ayarlanan virus süspansiyonundan konuldu ve oda sıcaklığında 15 dakika beklendi. Daha sonra tüm kuyucuklara %1'lik eritrosit süspansiyonu eklendi ve mikropleyt oda sıcaklığında 40 dakika tutuldu. Virusun standart serum ile reaksiyona girmesi inhibisyonun olduğunu göstermektedir.

3.15. SPF ETY Örneklerinden Nükleik Asit İzolasyonu

ETY'de izolasyon çalışmaları sonucu elde edilen allantoik sıvı, CAM ve sarı kese örneklerinden 0,5 ml alınarak toplamda 2 ml'lik örnekler oluşturuldu ve nükleik asit izolasyonunda kullanıldı. Bu amaçla QIAamp MinElute Virus Spin Kit kullanıldı ve bu işlem için üretici firma tarafından sunulan talimatlar izlendi. Özetle:

1. 25 µl Protease, 1,5 ml'lik 100 adet ependorf tüpe koyuldu ve örnek süspansiyonlarından 200 µl eklendi.
2. Örnek başına 220 µl Buffer AL ile 6,2 µl carrier RNA'dan oluşan karışımdan 200 µl alınarak örneklerin üzerine eklendi ve 15 saniye boyunca vortekslendi. Takiben, etüvde 56°C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
3. Tüpün çeperlerine yapışması olası damlacıkların toplanması amacıyla, çok kısa süre 6000 x g (8000 rpm)'de santrifüjde spin atıldı.
4. Örneğin üzerine 250 µl etanol koyuldu ve 15 saniye vortekslendi.
5. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi ve santrifüjde spin atıldı.

6. Buzdolabında tutulan 100 adet QIAamp MinElute kolonuna, çeperine dokunmadan, tüpün içindeki sıvı koyuldu.
7. 6000 x g (8000 rpm) hızda 1 dakika santrifüj edildikten sonra QIAamp MinElute kolonu temiz bir 2 ml'lik toplama tüpünün içine yerleştirildi ve alttaki 1,5 ml'lik tüp içinde biriken sıvıyla birlikte atıldı.
8. QIAamp MinElute kolonuna 500 µl Buffer AW1 eklendi ve 6000 x g (8000 rpm) hızda 1 dakika santrifüj edildi.
9. QIAamp MinElute kolonu, 2 ml'lik temiz bir toplama tüpünün içine yerleştirildi ve alttaki 1,5 ml'lik tüp içinde biriken sıvıyla birlikte atıldı.
10. QIAamp MinElute kolonuna 500 µl Buffer AW2 eklendi ve 6000 x g (8000 rpm) hızda 1 dakika santrifüj edildi.
11. QIAamp MinElute kolonu 2 ml'lik temiz bir toplama tüpünün içine yerleştirildi ve toplama tüpü içinde biriken sıvıyla birlikte atıldı.
12. QIAamp MinElute kolonuna 500 µl etanol eklendi ve 6000 x g (8000 rpm) hızda 1 dakika santrifüj edildi ve içinde sıvı biriken toplama tüpü atıldı.
13. QIAamp MinElute kolonu 2 ml'lik temiz bir toplama tüpünün içine yerleştirildi ve maksimum hızda (20 000 x g, 14 000 rpm) 3 dakika santrifüj edilerek kolon tamamen kurutuldu.
14. QIAamp MinElute kolonu 2 ml'lik temiz bir toplama tüpünün içine yerleştirildi ve membranın tamamen kuruması için kapağı açık şekilde 56°C'de 3 dakika bekletildi.
15. Kolon 1,5 ml'lik temiz bir tüpün içine yerleştirildi ve içinde sıvı biriken toplama tüpü atıldı.
16. Kolonun tam ortasına 43 µl Buffer AVE koyuldu, oda sıcaklığında 1 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı.
17. Maksimum hızda (20 000 x g, 14 000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi ve alttaki 1,5 ml'lik tüpte toplanan sıvı, nükleik asit örneği olarak kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

3.16. rPCR

3.16.1. IBV'nin Real-Time Reverse Transcriptase PCR (rRT-PCR) ile İdentifikasyonu

İzolasyonu yapılan nükleik asitlerde IBV'yi saptamak amacıyla QuantiTect Probe RT-PCR Kit kullanıldı. Hedef bölgelerin amplifikasyonu spesifik TaqMan prob kullanılarak gerçekleştirilmiştir (DM1-3: hedef bölge için primer prob mixi, DM2-3: internal kontrol için primer prob mixi).

IBV için hazırlanan 20 µl'lik rPCR Mixi:

2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mixi	12,5 µl
QuantiTect RT Mixi	0,25 µl
DM1-3	1,5 µl
DM2-3	1 µl
dH ₂ O	2,75 µl
Kalıp DNA	2 µl

Eppendorf tüpler içinde hazırlanan mix, PCR koşulları aşağıdaki şekilde hazırlanmış olan rPCR'a yerleştirildi.

Reverse Transkripsiyon işlemi	50°C'de	30 dakika	} 50 döngü
İlk Denatürasyon	95°C'de	15 dakika	
Denatürasyon	94°C'de	20 saniye	
Bağlanma	60°C'de	1 dakika	

rPCR sonrası amplifikasyon eğrileri kontrol edildi.

IBV için genotiplendirme protokolü

S1 geni için nested PCR protokolü kullanıldı.

S1 geni için hazırlanan 25 µl'lik nested PCR (I) Mixi:

QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1,0 µl
QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5,0 µl
QIAGEN dNTP mix	1,0 µl
SX1+ primer (0,2 pmol/µl)	0,5 µl
SX2- primer (0,2 pmol/µl)	0,5 µl

dH ₂ O	14,5 µl
Kalıp RNA	2,5 µl

Eppendorf tüpler içinde hazırlanan mix, PCR koşulları aşağıdaki şekilde hazırlanmış olan thermal cycler cihazına yerleştirilerek PCR işlemi gerçekleştirildi.

Reverse Transkripsiyon işlemi	50°C'de	30 dakika	
İlk Denatürasyon	95°C'de	15 dakika	
Denatürasyon	94°C'de	1 dakika	} 30 döngü
Bağlanma	50°C'de	1,5 dakika	
Uzama	72°C'de	2 dakika	
Son Uzama	72°C'de	10 dakika	

S1 geni için hazırlanan 20 µl'lik nested PCR (II) Mixi:

Taq PCR Master Mix	10,0 µl
SX3+ primer (0,2 pmol/µl)	0,4 µl
SX4- primer (0,2 pmol/µl)	0,4 µl
dH ₂ O	7,2 µl
PCR (I) ürünü	2,0 µl

Eppendorf tüpler içinde hazırlanan mix, PCR koşulları aşağıdaki şekilde hazırlanmış olan thermal cycler cihazına yerleştirilerek PCR işlemi gerçekleştirildi.

İlk Denatürasyon	94°C'de	3 dakika	
Denatürasyon	94°C'de	1 dakika	} 30 döngü
Bağlanma	48°C'de	1,5 dakika	
Uzama	72°C'de	2 dakika	
Son Uzama	72°C'de	10 dakika	

Dizileme Reaksiyonu

Ready Reaction Premix 2.5X	4,0 µl
BigDye Sequencing Buffer 5X	2,0 µl
Primer (SX3+/SX4-) (10 pmol/µl)	0,4 µl
dH ₂ O	11,6 µl
Templeyt	2,0 µl
Sekans PCR Koşulları	

İlk Denatürasyon	96°C'de	5 dakika	} 25 döngü
Denatürasyon	96°C'de	10 saniye	
Bağlanma	50°C'de	5 saniye	
Uzama	60°C'de	4 dakika	

3.16.1.1. PCR ürünlerinin görüntülenmesi

PCR ürünleri saflaştırılma işleminden önce jel elektroforez yöntemiyle kontrol edildi. 25 µl'lik PCR ürününün 3 µl'si %1,5'lik agaroz jeline yüklenerek PCR ürünlerinin varlığı ve bç yönünden büyüklüğü belirlendi. Bu amaçla, parafilm üzerine 1,5 µl 6X Orange Loading Dye ve üzerine 3 µl PCR ürünü koyuldu. Kontrol amacıyla 3 µl DNA Ladder kullanıldı. Örneklerin ve DNA Ladder'ın üzerine 1,5 µl SYBR Green I ilave edildi. Örnekler mikropipetle karıştırıldıktan sonra alınıp jele yüklendi ve 120 voltta 30 dakika boyunca elektroforez işlemine tabi tutuldu. Ardından jel, jel görüntüleme sistemi yardımıyla görüntüledi. Beklenen amplifikasyon ürünü büyüklüğü 393 bç'dir.

3.16.1.2. PCR ürünlerinin saflaştırılması

Referans amplifikasyon ürünleri ile karşılaştırılan ve doğruluğu teyit edilen PCR ürünlerinin üzerine 110 µl deiyonize su, 40 µl amonyum asetat ve 200 µl izopropanol ilave edilerek karışım oluşturuldu ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Takiben 12500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant pipet yardımıyla çekilerek atıldı. Dibe çöken kısmın üzerine 500 µl %70'lik etanol eklenerek 12500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Dibe çöken kısım 10 dakika santrifüj edilip kurumaya bırakıldı. Son olarak kuruyan çökeltiyeye 20 µl distile su eklenerek çözdürüldü.

3.16.1.3. Dizileme İşlemleri

Pürifiye edilen PCR ürünlerine Sanger Sekans Yöntemi ile dizileme işlemi uygulandı. Bu işlem Iontek Biyoteknoloji A.Ş.'de, ABI PRISM 310 Genetic Analyzer kullanılarak gerçekleştirildi.

3.16.1.4. Filogenetik analiz

Sanger Sekans işlemi ile elde edilen dizilerin düzenleme ve hizalama işlemlerinin gerçekleştirilmesinde FinchTV (versiyon 1.4.0) programı kullanıldı. Nükleotid benzerliklerinden yararlanılarak oluşturulan filogenetik analizde MEGA7 (versiyon 7.0.26) adlı ticari program kullanıldı. Kimura 2-parametre modeli ile birlikte kullanılan Neighbor-joining metodu tercih edilerek 1000 çöz bağla değeri ile filogenetik ağaç oluşturuldu. DNA dizileri National Center for Biotechnology Information (NCBI)'da bulunan GenBank veritabanından alınan referans suşlar ile karşılaştırıldı. GenBank veri tabanında erişimleri olan IBV suşlarıyla kıyaslamak için BLAST kullanıldı.

SI geni için referans suşlar ve erişim numaraları: D1344/2/4/10_EG (KU238171), ACoV/teal/Benisuef-Egypt/VRLCU-11/2016 (MF034382), IB VAR2-06 (JX027070), IS/1494/06 (HM131453), 50_IBV_Romania_2017 (MF101747), gammaCoV/Ck/Poland/G052/2016 (KY047602), TR8 (KP259312), IS-1494 (MG233398), IS/885 (AY279533), AvCoV/chicken/TR/B19/trachea/2014 (KT021473), IBV/Chicken/Iran/IS-1494/UT-MG108/2016 (MF322840), D1456/1/5/10_EG (KU238174), 4/91 vaccine (KF377577), 4/91 pathogenic (AF093794), M41 (AY561711).

3.16.2. ILTV'nin rPCR ile İdentifikasyonu

İzolasyonu yapılan nükleik asitlerde ILTV'yi saptamak amacıyla QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit kullanıldı.

ILTV *p32* gen bölgesi için hazırlanan 25 µl'lik rPCR Mixi:

2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mixi	12,5 µl
F primer (50 µM)	0,5 µl
R primer (50 µM)	0,5 µl
dH ₂ O	6,5 µl
Kalıp DNA	5 µl

Eppendorf tüpler içinde hazırlanan mix, PCR koşulları aşağıdaki şekilde hazırlanmış olan rPCR'a yerleştirildi.

İlk Denatürasyon	95°C'de	15 dakika	
Denatürasyon	95°C'de	30 saniye	} 50 döngü
Bağlanma	55°C'de	40 saniye	
Uzama	72°C'de	40 saniye	
Erime eğrisi	65-95°C'de	0,5 °C/döngü	

rPCR sonrası erime sıcaklıkları (melting temperature: Tm) ve amplifikasyon eğrileri kontrol edildi.

ICP4 ve *TK* gen bölgelerinin çoğaltılması

ICP4 (fragment 1 ve fragment 2) ve *TK* genlerinin amplifikasyonu için QuantiTect Probe PCR kit kullanıldı.

ICP4 gen bölgesi için hazırlanan 25 µl'lik PCR Mixi:

2x QuantiTect Probe PCR Master Mixi	12,5 µl
F primer (50 µM)	0,5 µl
R primer (50 µM)	0,5 µl
dH ₂ O	6,5 µl
Kalıp DNA	5 µl

TK gen bölgesi için hazırlanan 25 µl'lik PCR Mixi:

2x QuantiTect Probe PCR Master Mixi	12,5 µl
F primer (50 µM)	0,5 µl
R primer (50 µM)	0,5 µl
dH ₂ O	6,5 µl
Kalıp DNA	5 µl

Eppendorf tüpler içinde hazırlanan mix, PCR koşulları aşağıdaki şekilde hazırlanmış olan thermal cycler cihazına yerleştirilerek konvansiyonel PCR işlemi gerçekleştirildi.

İlk Denatürasyon	95°C'de	15 dakika	
Denatürasyon	95°C'de	45 saniye	} 50 döngü
Bağlanma	50°C'de	1 dakika	
Uzama	72°C'de	1 dakika	
Son Uzama	72°C'de	10 dakika	

3.16.2.1. PCR ürünlerinin görüntülenmesi

PCR ürünleri saflaştırılma işleminden önce jel elektroforez yöntemiyle kontrol edildi. 25 µl'lik PCR ürününün 3 µl'si %1,5'lik agaroz jeline yüklenerek PCR ürünlerinin varlığı ve bç yönünden büyüklüğü belirlendi. Bu amaçla, parafilm üzerine 1,5 µl 6X Orange Loading Dye ve üzerine 3 µl PCR ürünü koyuldu. Kontrol amacıyla 3 µl DNA Ladder kullanıldı. Örneklerin ve DNA ladderın üzerine 1,5 µl SYBR Green I ilave edildi. Örnekler mikropipetle karıştırıldıktan sonra alınıp jele yüklendi ve 120 voltta 30 dakika boyunca elektroforez işlemine tabi tutuldu. Ardından jel, jel görüntüleme sistemi yardımıyla görüntülendi. Beklenen amplifikasyon ürünlerinin büyüklükleri *ICP4* fragment 1, *ICP4* fragment 2 ve *TK* için sırasıyla 923, 747 ve 783 bç'dir.

3.16.2.2. PCR ürünlerinin saflaştırılması

Referans amplifikasyon ürünleri ile karşılaştırılan ve doğruluğu teyit edilen PCR ürünlerinin üzerine 110 µl deiyonize su, 40 µl amonyum asetat ve 200 µl izopropanol ilave edildi. Karışım 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 12500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant pipet yardımıyla çekilerek atıldı. Dibe çöken kısmın üzerine 500 µl %70'lik etanol eklendi ve aynı şekilde 12500 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Dibe çöken kısım 10 dakika santrifüj edilerek kurutuldu. Kuruyan çökelti ise 10-20 µl distile su ile çözdürüldü.

3.16.2.3. Dizileme İşlemleri

Pürifiye edilen PCR ürünlerine Sanger Sekans Yöntemi ile dizileme işlemi uygulandı. Bu işlem Iontek Biyoteknoloji A.Ş.'de yapıldı. Dizileme işlemi için ABI PRISM 310 Genetic Analyzer aletinden yararlanıldı.

3.16.2.4. Filogenetik analiz

Sanger Sekans işlemi ile elde edilen dizilerin düzenleme ve hizalama işlemleri Jalview (versiyon 2.7) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Nükleotid benzerliklerine

dayanarak gerçekleştirilen filogenetik analizde soyağacı veya genetik yakınlık ağacı oluşturulması amacıyla ise MEGA7 (versiyon 7.0.26) adlı ticari program kullanıldı. Filogenetik ağaç oluşturma işleminde Kimura 2-parametre modeli ile birlikte kullanılan Neighbor-joining metot tercih edildi ve 1000 çöz bağla değeri kullanıldı. DNA dizileri NCBI'da bulunan GenBank veritabanından alınan referans suşlar ile karşılaştırıldı. GenBank veri tabanında erişimleri olan ILTV suşlarıyla kıyaslamak için BLAST kullanıldı.

ICP4 geni için referans suşlar ve erişim numaraları: 2011/UFGM1 clone 1 (KF786292), CEO vaccine (EU104900), CEO vaccine Laryngo-Vac (FJ477350), CEO vaccine Nobilis-ILT (FJ477351), TCO vaccine (EU104908), TCO vaccine LTI-IVAX (FJ477349), 12/D/02/BCK ICP4 (EU104911), 25/H/88/BCK ICP4 (EU104899), 24/H/91/BCK ICP4 (EU104910), 2/A/04/BR ICP4 (EU104912), ILTV/Brazil/2003/USP-27 (FJ477365), ILTV/Brazil/2003/USP-07 (GQ499345), 63140/C/08/BR (JN542536), 63140/C/08/BR (JN804827), V1-99 (JX646898), LJS09 (JX458822), ILTV/Peru/2008/USP-81 (FJ794469), 81658 (JN542535), USDA (JN542534), 13/E/03/BBR (EU104907), 14/E/03/BBR (EU104906), ILTV/Brazil/2003/USP-09 (FJ477357), ILTV/Brazil/2003/USP-06 (FJ477356), ILTV/Brazil/2002/USP-02 (FJ477353), ILTV/Brazil/2002/USP-01 (FJ477352), WangGang (DQ995291), ILTV/Brazil/2008/USP-74(FJ794467), 2012/UFGM-1 clone 1 (KF786293), 2012/UFGM-2 clone 1 (KF786294), 2013/UFGM-1 clone 1 (KF786295), 2013/UFGM-2 clone 1 (KF786296).

TK geni için referans suşlar ve erişim numaraları: 2011/UFGM1 TK (KF786287), LTI-IVAX (FJ444832), CEO vaccine strain Merial (HM230801), SP-Trachivax (EU423897), TCO (EU360950), 2013/UFGM-1 (KF786290), 2013/UFGM-2 (KF786291), 2012/UFGM-2 (KF786289), 2012/UFGM-1 (KF786288), ILTV/Brazil/2003/USP-07 (GQ499341), CG (DQ522949), UL23 (AF435453), capsid p40, 3 ORFs, TK (D00565), complete genome (NC006623), TCO (EU360950), TCO Switzerland (EU360950), ILTV/Brazil/2007/USP-57 (FJ444847), V1-99 (JX646898), ILTV U.S. field isolate 632 (S83714), CH04 (EU360946), 288269/2007 UL24 (HM230794), LJS09 (JX458822),

ILTV/Brazil/2002/USP-02 (FJ444834), ILTV/Brazil/2004/USP-44 (FJ444843), CL9 (JN804827), ILTV/Brazil/2003/USP-22 (DQ786400).

3.16.3. aMPV'nin rRT-PCR ile identifikasyonu

İzolasyonu yapılan nükleik asitlerde aMPV'yi saptamak amacıyla QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit kullanıldı.

N geni için hazırlanan 25 µl'lik RT-PCR mixi:

2xQuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mixi	12,5 µl
QuantiTect RT Mixi	0,25 µl
F primer (50 µM)	0,5 µl
R primer (50 µM)	0,5 µl
dH ₂ O	6,25 µl
Kalıp RNA	5 µl

Eppendorf tüpler içinde hazırlanan mix, ısı döngüsü aşağıdaki şekilde hazırlanmış olan rPCR'a yerleştirildi.

Reverse Transkripsiyon işlemi	50°C'de	30 dakika	
İlk Denatürasyon	95°C'de	15 dakika	
Denatürasyon	95°C'de	15 saniye	} 50 döngü
Bağlanma	56°C'de	45 saniye	
Erime eğrisi	65-95°C'de	0,5 °C/döngü	

rPCR sonrası T_m ve amplifikasyon eğrileri kontrol edildi.

3.16.4. ARV'nin rRT-PCR ile identifikasyonu

İzolasyonu yapılan nükleik asitlerde ARV'yi saptamak amacıyla QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kiti kullanıldı.

S2 geni için hazırlanan 25 µl'lik RT-PCR mixi:

2xQuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mixi	12,5 µl
QuantiTect RT Mixi	0,25 µl
F primer (50 µM)	0,5 µl
R primer (50 µM)	0,5 µl

dH ₂ O	6,25 µl
Kalıp RNA	5 µl

Ependorf tüpler içinde hazırlanan mix, ısı döngüsü aşağıdaki şekilde hazırlanmış olan rPCR'a yerleştirildi.

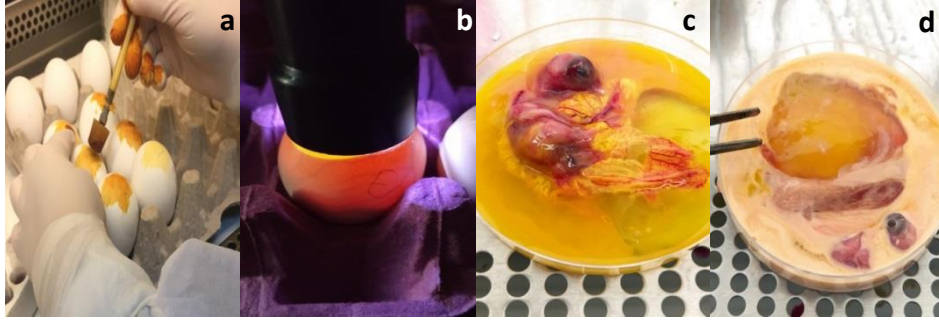
Reverse Transkripsiyon işlemi	50°C'de	30 dakika	
İlk Denatürasyon	95°C'de	15 dakika	
Denatürasyon	95°C'de	15 saniye	} 50 döngü
Bağlanma	56°C'de	45 saniye	
Erime eğrisi	65-95°C'de	0,5 °C/döngü	

rPCR sonrası T_m ve amplifikasyon eğrileri kontrol edildi.

4. BULGULAR

4.1. ETY'ye inokulasyon sonuçları

Örneklerden virus izolasyonu amacıyla yapılan inokülasyonlardan sonra embriyolarda gelişen lezyonların oluşumuna bakılmaksızın SPF ETY'den incelenecek virusun tipine göre allantoik sıvı, CAM ve sarı kesesi örnekleri toplandı (Şekil 6).



Şekil 6. SPF embriyolu tavuk yumurtalarına inokulasyon (a), ışıkla muayene (b) ve inokulasyondan sonraki embriyodaki değişimlerin görüntüleri (c ve d).

4.2. Hemaglutinasyon sonuçları

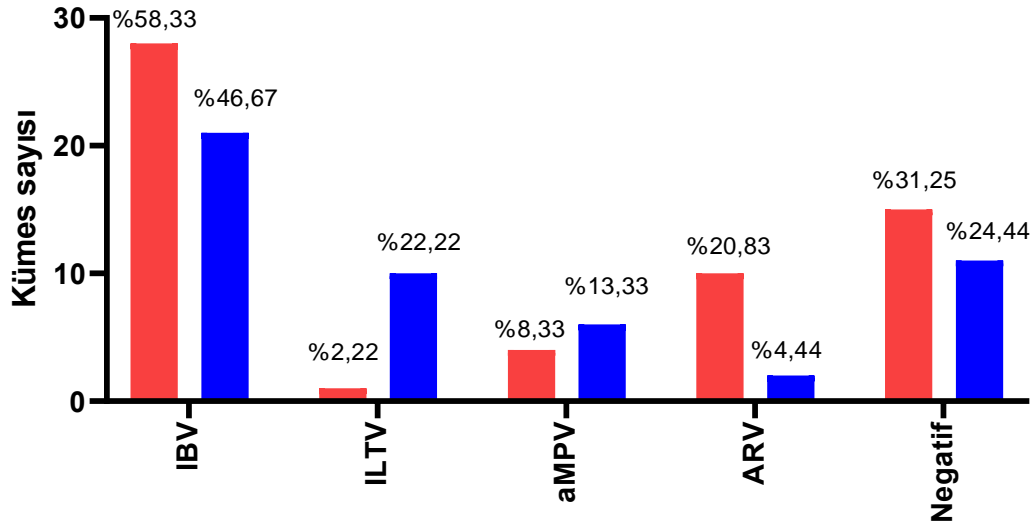
93 örneğe ait inoküle edilmiş ETY'lerin allantoik sıvıları hemaglutinasyon yönünden test edildi ve 12 örneğin hemaglutinasyon aktivitesi gösterdiği saptandı (Şekil 7). Bu 12 örneğe (Y3, Y10, Y15, Y20, Y34, B6, B12, B17, B18, B31, B40, B47) ait ETY'nin allantoik sıvıları ile NDV ve AIV antijenleri kullanılarak HI testi uygulaması sonucu hepsinin negatif olduğu sonucu gözlemlendi. Dolayısıyla, incelenen trakeal svab örneklerinin tümünün NDV ve AIV'yi barındırmadığına karar verildi.



Şekil 7. Hemaglutinasyon aktivitesinin görüntüsü

4.3. rPCR

Çalışma kapsamında IBV, ILTV, aMPV ve ARV etkenlerinin yumurtacı ve broyler kümeslerde varlığı rPCR metodu yardımıyla belirlenmiştir. Buna göre toplam 93 örnekte etkenlerin görülme sıklıkları ve yüzdeleri Şekil 8’de özetlenmiştir.



Şekil 8. Broyler (n:48) ve yumurtacı (n:45) kümeden alınan trakeal svabta etkenlerin görülme sıklıklarına göre dağılımları. Kırmızı renk broyleri, mavi renk yumurtacıları temsil etmektedir. Yüzde hesaplamalarında çoklu enfeksiyonların sıklıkları göz ardı edilmiştir.

4.4. Çoklu viral enfeksiyon varlığı

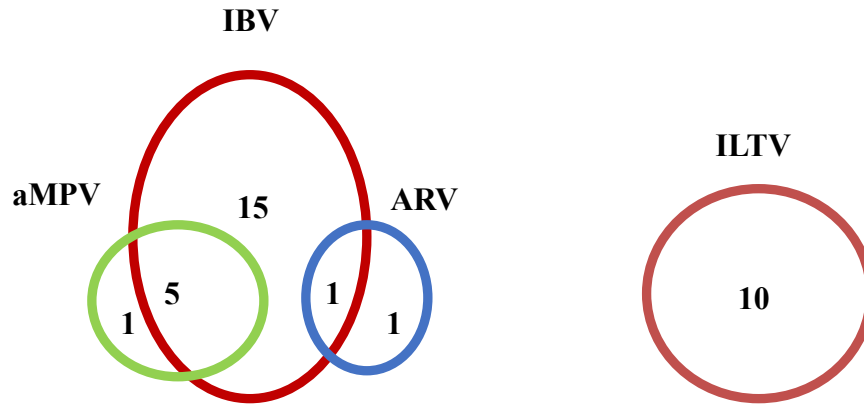
Sunulan bu çalışmada viral etkenlerin örneklerdeki bireysel varlığının yanı sıra çoklu şekilde bulunma durumları da incelenmiştir. Bu bağlamda, yumurtacı ve broyler

kümeslerden elde edilen toplam 93 örnekten 6'sında (%6,45) IBV ve aMPV; 6'sında (%6,45) ise IBV ve ARV etkenlerinin birlikte bulunduğu tespit edilmiştir. Buna göre IBV+aMPV çoklu enfeksiyonunun 5 (%11,11) yumurtacı ve 1 (%2,08) broyler küme; IBV+ARV çoklu enfeksiyonunun ise 1 (%2,22) yumurtacı ve 5 (%10,42) broyler küme görüldüğü saptanmıştır. Tüm örneklerin sadece 2'sinde (%2,15) ise IBV, aMPV ve ARV etkenlerinin birlikte bulunduğu ve bu iki örneğin de broyler kümelere ait olduğu belirlenmiştir. Yukarıda belirtilen çoklu enfeksiyonların görüldüğü örneklerin isimleri Tablo 3'te verilmiştir.

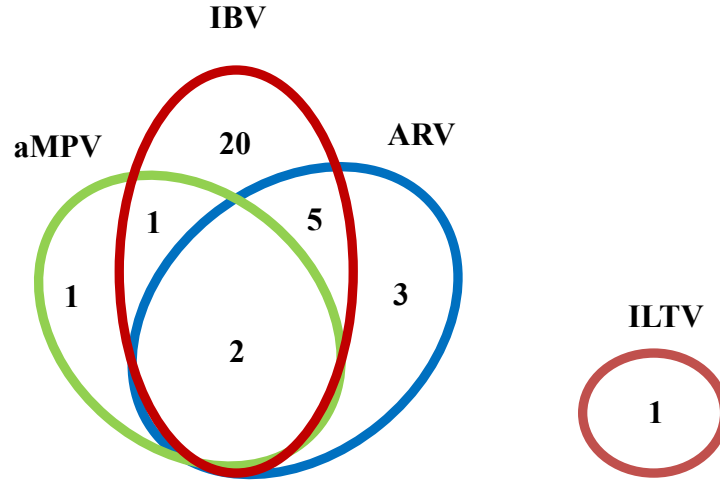
Tablo 3. Çoklu enfeksiyon görünen yumurtacı ve broyler örnekler

Etken	Yumurtacı	Broyler
IBV+aMPV	Y11, Y14, Y32, Y33, Y37	B30
IBV+ARV	Y18	B2, B7, B19, B24, B29
IBV+aMPV+ARV	-	B26, B39

Çalışma kapsamında tespit edilen viral etkenlerin bireysel ve çoklu bulunma durumlarına ait grafikler yumurtacı ve broyler kümesler için sırasıyla Şekil 9 ve 10'da verilmiştir.



Şekil 9. Yumurtacı örneklerde çoklu enfeksiyon sayıları



Şekil 10. Broiler örneklerde çoklu enfeksiyon sayıları

4.5. IBV için rRT-PCR bulguları

Genetik analizler sonucunda, 45 yumurtacı ve 48 broiler kümesinden alınan 93 örnekten toplam 49’unda (%52,69) IBV yönünden pozitiflik saptanmıştır. Pozitif örneklerin 21’inin (%42,86) yumurtacı, 28’inin (%57,14) ise broiler kümelere ait olduğu tespit edilmiştir. Değerlendirmede Ct (cycle threshold) değeri 38’in üzerinde olan değerler negatif olarak kabul edilmiştir. Buna göre, pozitif kontrolde pozitif değer belirlenmiş olup; negatif kontrolde ise herhangi bir değer gözlenmemiştir. Örnekler ve pozitif/negatif kontrollere ait rRT-PCR ile elde edilen Ct değerleri ve sonuçların değerlendirilmesi Tablo 4’te sunulmuştur.

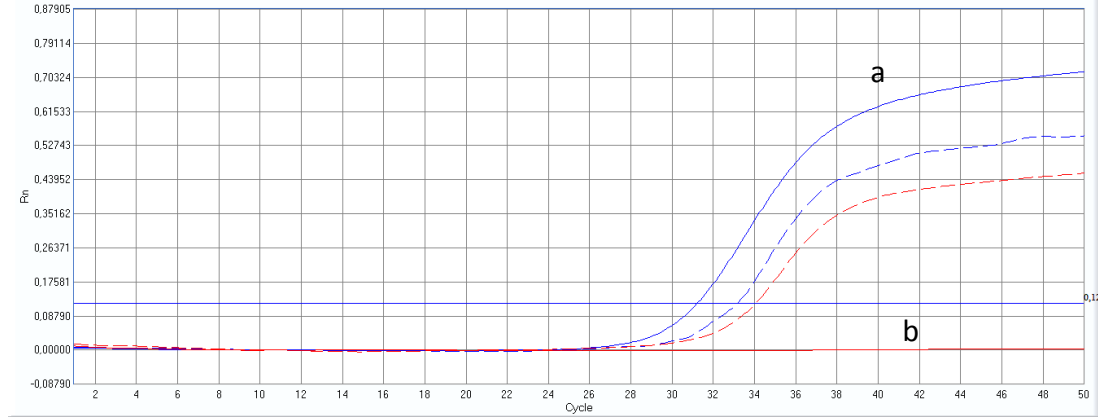
Tablo 4. rRT-PCR ile elde edilen Ct değerleri ve sonuçların değerlendirilmesi

Örnek numarası	Ct değeri	Değerlendirme	Örnek numarası	Ct değeri	Değerlendirme
Y1	-	Negatif	B4	-	Negatif
Y2	-	Negatif	B5	-	Negatif
Y3	35,94	Pozitif	B6	34,57	Pozitif
Y4	-	Negatif	B7	32,61	Pozitif
Y5	-	Negatif	B8	-	Negatif
Y6	-	Negatif	B9	-	Negatif
Y7	28,84	Pozitif	B10	32,48	Pozitif
Y8	-	Negatif	B11	-	Negatif

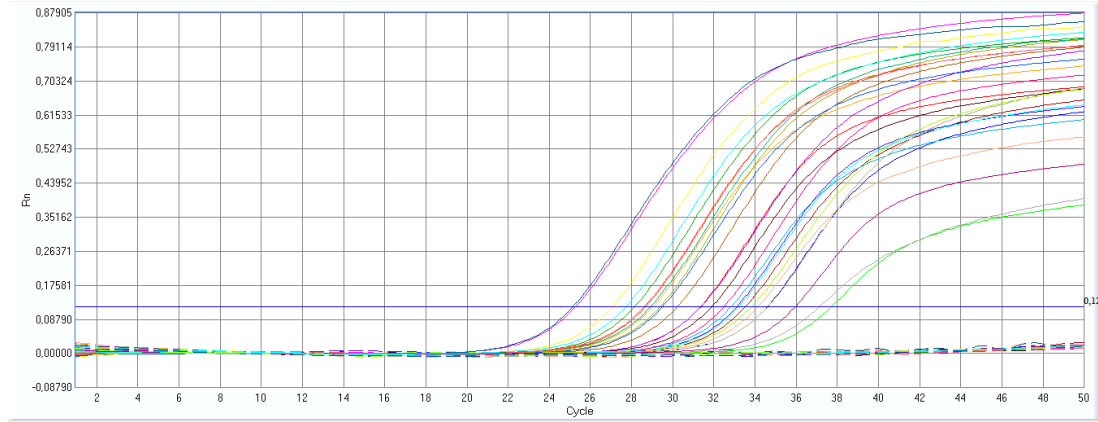
Y9	-	Negatif	B12	31,69	Pozitif
Y10	35,23	Pozitif	B13	-	Negatif
Y11	25,13	Pozitif	B14	-	Negatif
Y12	27,06	Pozitif	B15	-	Negatif
Y13	-	Negatif	B16	-	Negatif
Y14	27,68	Pozitif	B17	36,47	Pozitif
Y15	32,44	Pozitif	B18	33,05	Pozitif
Y16	-	Negatif	B19	35,64	Pozitif
Y17	-	Negatif	B20	-	Negatif
Y18	28,57	Pozitif	B21	-	Negatif
Y19	-	Negatif	B22	-	Negatif
Y20	28,63	Pozitif	B23	-	Negatif
Y21	-	Negatif	B24	36,20	Pozitif
Y22	37,12	Pozitif	B25	-	Negatif
Y23	-	Negatif	B26	25,57	Pozitif
Y24	-	Negatif	B27	27,12	Pozitif
Y25	29,45	Pozitif	B28	29,95	Pozitif
Y26	-	Negatif	B29	30,09	Pozitif
Y27	29,02	Pozitif	B30	29,03	Pozitif
Y28	-	Negatif	B31	27,8	Pozitif
Y29	-	Negatif	B32	-	Negatif
Y30	-	Negatif	B33	27,81	Pozitif
Y31	-	Negatif	B34	-	Negatif
Y32	31,87	Pozitif	B35	-	Negatif
Y33	28,12	Pozitif	B36	25,54	Pozitif
Y34	30,19	Pozitif	B37	33,48	Pozitif
Y35	-	Negatif	B38	30,75	Pozitif
Y36	33,79	Pozitif	B39	32,80	Pozitif
Y37	33,52	Pozitif	B40	31,32	Pozitif
Y38	24,08	Pozitif	B41	34,12	Pozitif
Y39	32,47	Pozitif	B42	28,89	Pozitif
Y40	-	Negatif	B43	29,34	Pozitif
Y41	-	Negatif	B44	30,40	Pozitif
Y42	-	Negatif	B45	34,54	Pozitif
Y43	33,17	Pozitif	B46	31,31	Pozitif
Y44	-	Negatif	B47	37,69	Pozitif
Y45	33,09	Pozitif	B48	-	Negatif
B1	-	Negatif	Pozitif kontrol	31,00	
B2	33,00	Pozitif	Negatif kontrol	-	
B3	-	Negatif			

Y: Yumurtacı, B: Broyler

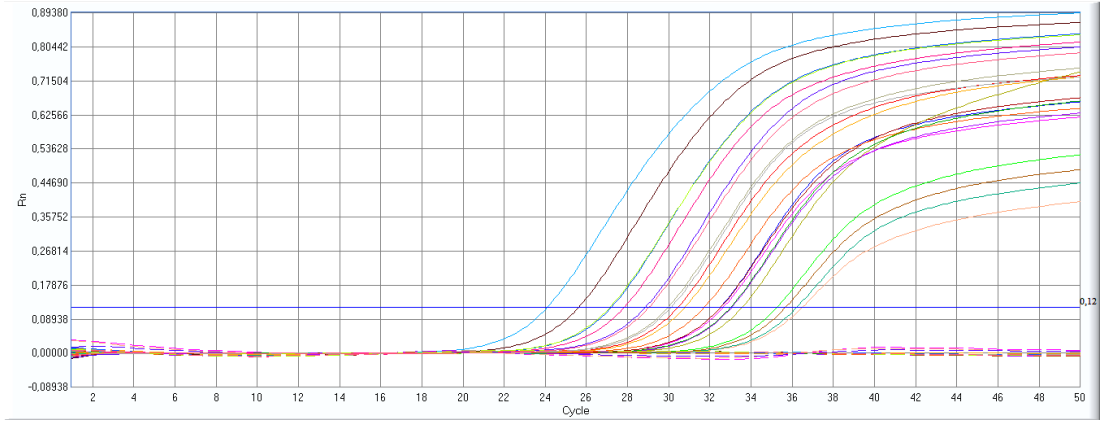
Yumurtacı ve broyler örneklerine ait TaqMan prob tabanlı rRT-PCR analizleri sonucu pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon eğrileri Şekil 12 ve 13'te gösterilmektedir. Bunun yanı sıra pozitif ve negatif kontrollere ait grafik Şekil 11'de verilmiştir.



Şekil 11. Pozitif (a) ve negatif (b) kontrollerin amplifikasyon eğrileri.



Şekil 12. Pozitif örneklere ait amplifikasyon eğrileri



Şekil 13. Pozitif örneklere ait amplifikasyon eğrileri

4.5.1. Dizileme İşlemleri ve Filogenetik Analiz Bulguları

rRT-PCR analizi sonucunda pozitif bulunan örneklerden beş tanesi, *SI* genine ait çok değişken bölgenin bir kısmını çoğaltan SX3+ ve SX4- primer çiftleri yardımıyla çift yönlü Sanger Sekans yöntemi ile dizilenebildi. Bu bağlamda, Y37, Y38, Y39, Y45 ve B42 örneklerine ait *SI* gen sekansları Şekil 14-18’de sunulmuştur.

```

1 TAGGTTTATTGTATATCGAGAAAGTAGCACTAACACTACTTTAGAGTTAACTAATTTCACTTTTACT 67
68 AATGTAAGTAATGCTTCTCCTAATTCAGGTGGCGTTGATACTTTCCAATTATATCAAACACATACTG 134
135 CTCAGGATGGTTATTATAATTTAATTTATCATTCTGAGTAGTTTTGTGTATAAACCATCTGATTTTA 203
204 TGTATGGGTCATACCACCCAAATTGTAATTTAGACCAGAGAATATTAATAATGGCTTATGGTTTAAAT 271
272 TCATTATCTGTGTCACCTACTTACGGACCCATTCAAGGTGGTTGTAAGCAATCTGTATANAATAATA 338
339 AAGCAACTTGTGCTATGCTTATTCTTACCGAGGTCCTACTANATGTAAGGGTGTTTATAGAGGTGG 405
406 AA 407

```

Şekil 14. Y37 örneğine ait *SI* gen sekansı

```

1 TAGGTTTATTGTATATCGAGAAAGTAGCACTAACACTACTTTAGAGTTAACTAATTTCACTTTTACT 67
68 AATGTAAGTAATGCTTCTCCTAATTCAGGTGGCGTTGATACTTTCCAATTATATCAAACACATACTG 134
135 CTCAGGATGGTTATTATAATTTAATTTATCATTCTGAGTAGTTTTGTGTATAAACCATCTGATTTTA 203
204 TGTATGGGTCATACCACCCAAATTGTAATTTAGACCAGAGAATATTAATAATGGCTTATGGTTTAAAT 271
272 TCATTATCTGTGTCACCTACTTACGGACCCATTCAAGGTGGTTGTAAGCAATCTGTATANAATAATA 338
339 AAGCAACTTGTGCTATGCTTATTCTTACCGAGGTCCTACTANATGTAAGGGTGTTTATAGAGGTGG 405
406 AAAA 409

```

Şekil 15. Y38 örneğine ait *SI* gen sekansı

```
1 TTTATTGTATATCGAGAAAAGTAGCACTAACACTACTTTAGAGTTAACTAATTNNCACTTTTACTAAT 67
68 GTAAGTAATGCTTCTCCTAATTCAGGTGGCGTTGATACTTTCCAATTATATCAAACACATACTGCTC 134
135 AGGATGGTTATTATAATTTAATTTATCATTCTGAGTAGTTTTGTGTATAAACCATCTGATTTTATGT 203
204 ATGGGTCATACCACCCAAATGTAAATTTAGACCAGAGAATATTAATAATGGCTTATGGTTTAAATCA 271
272 TTATCTGTGTCACCTACTTACGGACCCATTCAAGGTGGTTGTAAGCAATCTGTATACNAATAATAAA 338
339 GCAACTTGTGTCTATGCTTATTCTTACCGAGGTCTACTANATGTAAGGGTGTTTATAGAGGTGGA 404
```

Şekil 16. Y39 örneğine ait *SI* gen sekansı

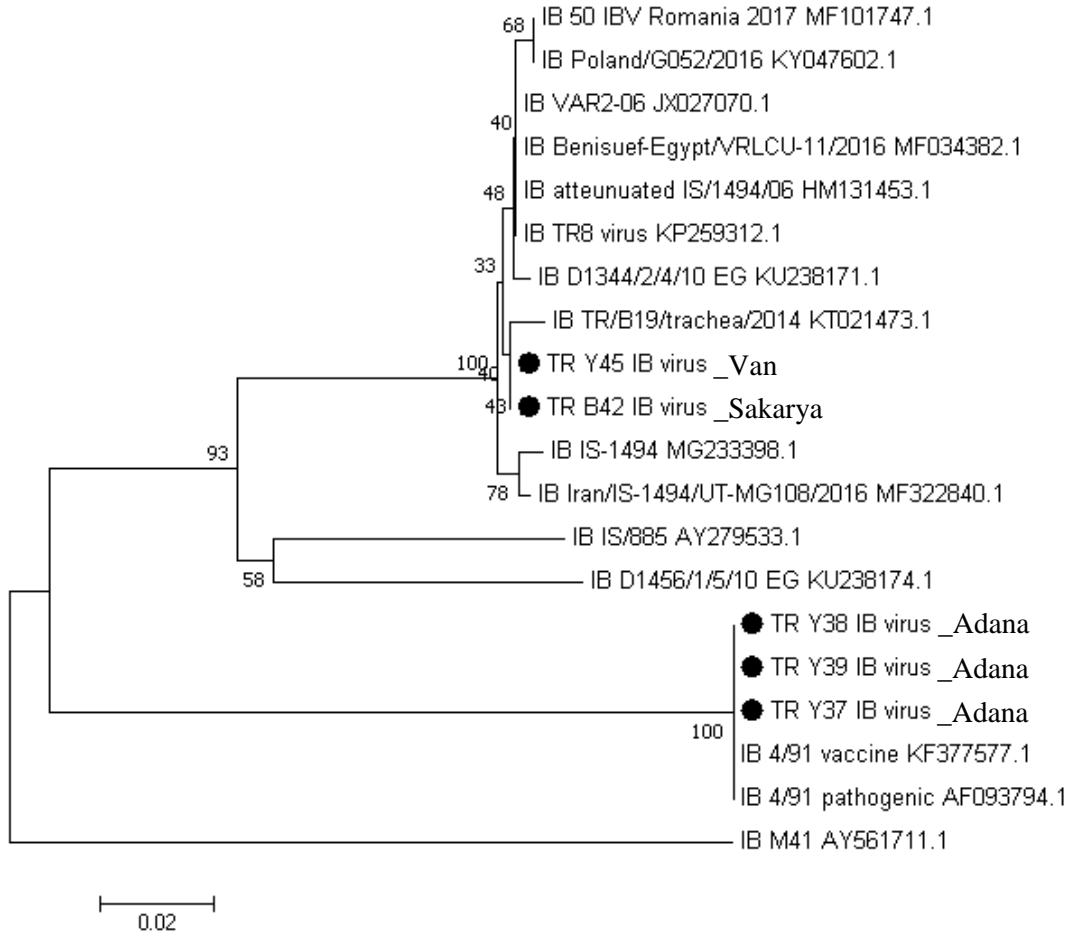
```
1 TTTGTTGTGTATCGTGAAACTAGTGTTAACACCACGTTGGTTTTAACTAATTTACCTTTACAAATG 67
68 TAAGTAATGCCTCGCCTAATACAGGTGGTGTCAATACTATTAACATATATCAAACACAAACAGCTCA 134
135 GAGTGGTTATTATAATTTAATTTTTCTTTCTGAGTAGTTTTGTTTATAAGCAGTCTGATTTTATGTA 203
204 TGGGTCTTATCACCCAAAAGTGTGATTTTAGACCGGAACTATTAATAATGGTTTGTGGTTTAAATCT 270
271 CTATCTGTTTCACTAGCCTATGGGCCGCTACAAGGTGGTTGTAAGCAATCTGTATTNAATAATAGGG 337
338 CAACGTGTTGTTATGCTTATTCATACAATGGTCCCNNTTTGTGTAAGGGTGTTTATAGAGGTGGGA 403
```

Şekil 17. Y45 örneğine ait *SI* gen sekansı

```
1 TTTGNTGTGTATCGTGAAACTAGTGTTAACACCACGTTGGTTTTAACTAATTTACCTTTACAAATG 67
68 TAAGTAATGCCTCGCCTAATACAGGTGGTGTCAATACTATTAACATATATCAAACACAAACAGCTCA 134
135 GAGTGGTTATTATAATTTAATTTTTCTTTCTGAGTAGTTTTGTTTATAAGCAGTCTGATTTTATGTA 203
204 TGGGTCTTATCACCCAAAAGTGTGATTTTAGACCGGAACTATTAATAATGGTTTGTGGTTTAAATCT 270
271 CTATCTGTTTCACTAGCCTATGGGCCGCTACAAGGTGGTTGTAAGCAATCTGTATA 326
```

Şekil 18. B42 örneğine ait *SI* gen sekansı

Yapılan dizi analizi ile elde edilen nükleotid dizileri, NCBI’da bulunan GenBank veri tabanında tanımlı olan referans suşlara ait nükleik asit dizilimleriyle karşılaştırılmış olup Y37, Y38, Y39 numaralı örneklerin 4/91 standart suşu ile, Y45 ve B42 numaralı örneklerin ise IS/1494/06 (Israel Var2) standart suşu ile %99 oranında benzerlik taşıdığı belirlenmiştir. Çalışmada IBV pozitif olarak belirlenen örneklerle referans suşlar arasındaki taksonomik ilişkiyi ortaya koymak amacıyla *SI* geni baz alınarak filogenetik ağaç oluşturulmuş olup Şekil 19’da sunulmuştur.



Şekil 19. Referans suşların ve çalışmadaki IBV pozitif örneklerin *S1* geni baz alınarak oluşturulan filogenetik ağaç

4.6. ILTV için rPCR bulguları

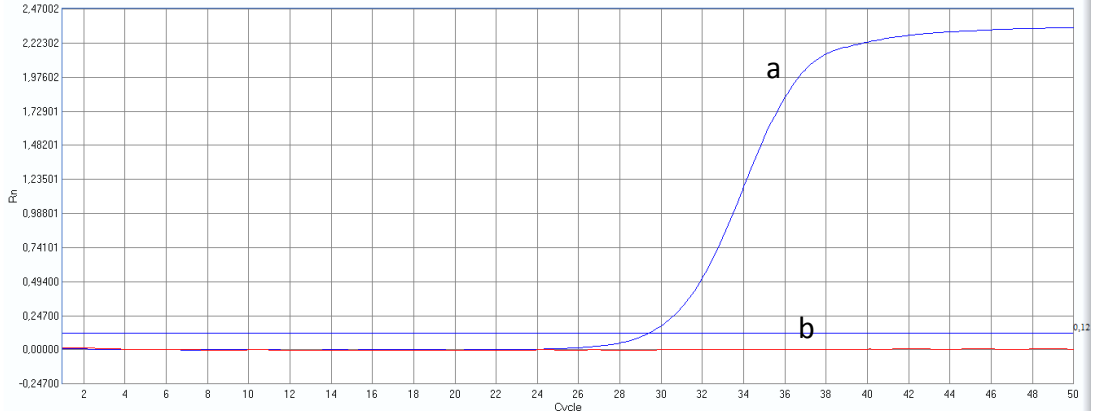
Gerçekleştirilen rPCR analizleri sonucunda, 45 yumurtacı ve 48 broyler kümesinden alınan 93 örnekten toplam 11'inde (%11,83) ILTV yönünden pozitiflik saptanmıştır. Pozitif örneklerin 10'unun (%90,91) yumurtacı, 1'inin (%9,09) ise broyler kümeslere ait olduğu belirlenmiştir. Değerlendirmede Ct değeri 38'in üzerinde olan değerler negatif olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, pozitif örneklerin belirlenmesinde amplifikasyon eğrileri ile Tm karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Buna göre, pozitif kontrolde pozitif değer belirlenmiş olup; negatif kontrollerde ise herhangi bir değer gözlenmemiştir. Örnekler ve pozitif/negatif kontrollere ait rRT-PCR ile elde edilen Ct değerleri ve sonuçların değerlendirilmesi Tablo 5'te sunulmuştur.

Tablo 5. rRT-PCR ile test edilen örnekler ve sonuçların değerlendirilmesi

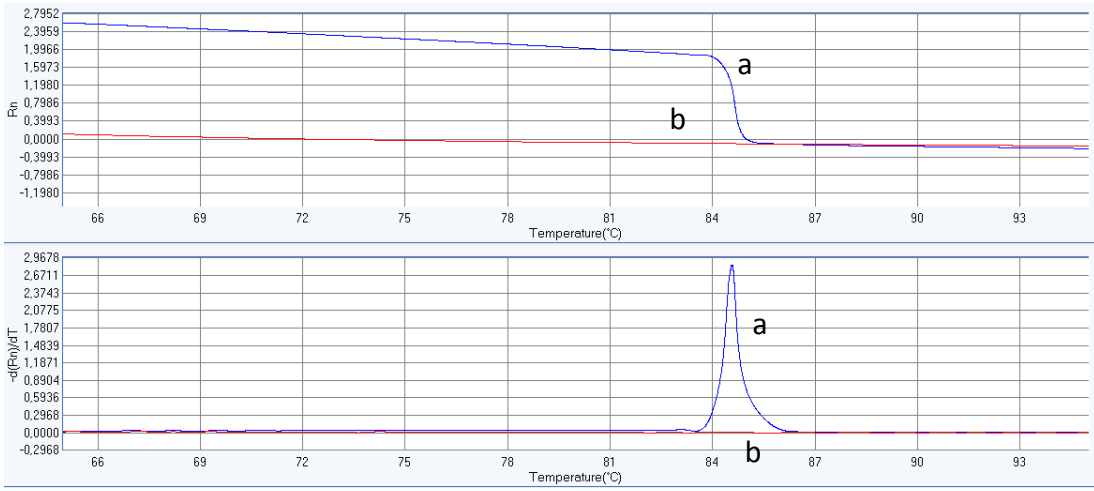
Örnek numarası	Değerlendirme	Örnek numarası	Değerlendirme	Örnek numarası	Değerlendirme
Y1	Negatif	Y32	Negatif	B18	Negatif
Y2	Negatif	Y33	Negatif	B19	Negatif
Y3	Negatif	Y34	Negatif	B20	Negatif
Y4	Pozitif	Y35	Pozitif	B21	Negatif
Y5	Negatif	Y36	Negatif	B22	Negatif
Y6	Negatif	Y37	Negatif	B23	Negatif
Y7	Negatif	Y38	Negatif	B24	Negatif
Y8	Pozitif	Y39	Negatif	B25	Negatif
Y9	Negatif	Y40	Pozitif	B26	Negatif
Y10	Negatif	Y41	Pozitif	B27	Negatif
Y11	Negatif	Y42	Negatif	B28	Negatif
Y12	Negatif	Y43	Negatif	B29	Negatif
Y13	Negatif	Y44	Negatif	B30	Negatif
Y14	Negatif	Y45	Negatif	B31	Negatif
Y15	Negatif	B1	Negatif	B32	Pozitif
Y16	Negatif	B2	Negatif	B33	Negatif
Y17	Pozitif	B3	Negatif	B34	Negatif
Y18	Negatif	B4	Negatif	B35	Negatif
Y19	Pozitif	B5	Negatif	B36	Negatif
Y20	Negatif	B6	Negatif	B37	Negatif
Y21	Pozitif	B7	Negatif	B38	Negatif
Y22	Negatif	B8	Negatif	B39	Negatif
Y23	Pozitif	B9	Negatif	B40	Negatif
Y24	Pozitif	B10	Negatif	B41	Negatif
Y25	Negatif	B11	Negatif	B42	Negatif
Y26	Negatif	B12	Negatif	B43	Negatif
Y27	Negatif	B13	Negatif	B44	Negatif
Y28	Negatif	B14	Negatif	B45	Negatif
Y29	Negatif	B15	Negatif	B46	Negatif
Y30	Negatif	B16	Negatif	B47	Negatif
Y31	Negatif	B17	Negatif	B48	Negatif

Y: Yumurtacı, B:Broiler

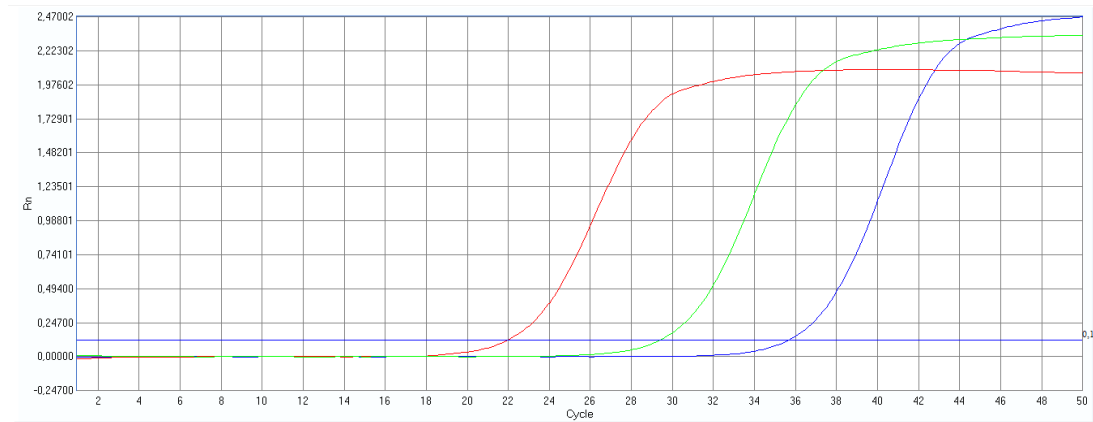
Yumurtacı ve broiler örneklerine ait rPCR analizleri sonucu pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon eğrileri Şekil 22’de gösterilmektedir. Ayrıca SYBR Green I ile belirlenen bu pozitif örneklere ait Tm grafikleri Şekil 23’te verilmiştir. Bunun yanı sıra pozitif ve negatif kontrollere ait amplifikasyon ve Tm grafikleri sırasıyla Şekil 20 ve 21’de verilmiştir.



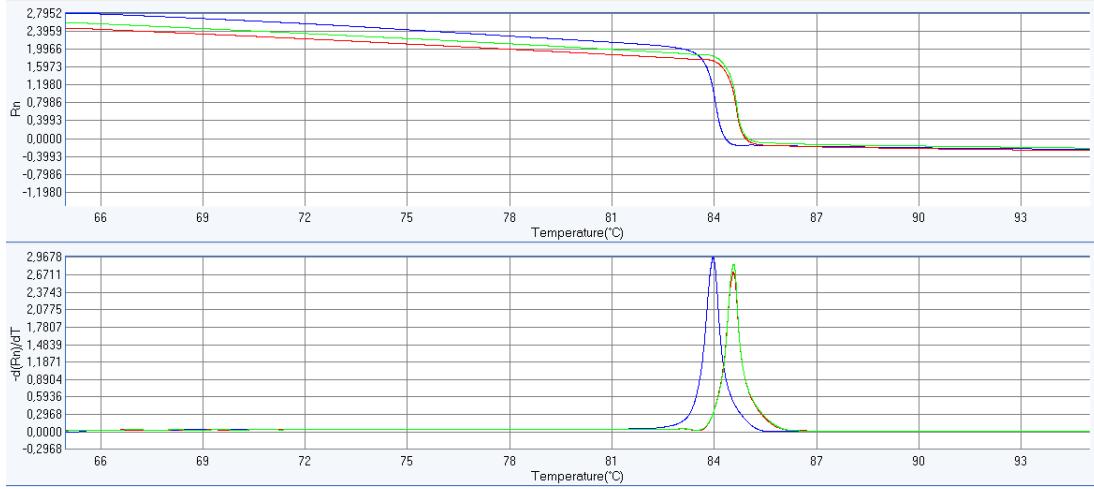
Şekil 20. Pozitif (a) ve negatif (b) kontrollerin amplifikasyon eğrileri



Şekil 21. Pozitif (a) ve negatif (b) kontrollerin Tm grafiği



Şekil 22. Pozitif örneklere ait amplifikasyon eğrileri



Şekil 23. Pozitif örneklere ait T_m grafiği

4.6.1. Dizileme İşlemleri ve Filogenetik Analiz Bulguları

ILTV pozitif örneklerin genotiplendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen dizileme işleminde *ICP4* geni fragment 1 için 923 bç ve fragment 2 için 747 bç uzunluğundaki bölge ve *TK* geni için 783 bç uzunluğundaki bölgeye ait çift yönlü Sanger Sekans yöntemi ile dört örnek dizilendi. Yapılan analizler sonrasında, Y8, Y23, Y35 ve Y40 örneklerine ait *ICP4* geni baz alınarak gerçekleştirilen genotiplendirme işlemi ile elde edilen gen sekansları değerlendirilmiş olup fragment 1'e ait görülen mutasyonlar ve pozisyonları Tablo 6'da sunulmuştur. Buna göre, Y40 örneğinde, pozisyon 735'te sitozin/timin değişikliği gözlenmiştir. Ancak aminoasit dizisi incelendiğinde değişimin diğer suşlarda olduğu gibi serin aminoasitini kodladığı belirlenmiştir. Dolayısıyla bu değişikliğin bir sessiz (silent) mutasyon olduğuna karar verilmiştir. Bununla birlikte aynı örneğe ait dizilim incelendiğinde pozisyon 814'te guanin/adenin değişimi gözlenmiştir. Meydana gelen bu yanlış anlamlı (missense) mutasyon, aminoasit pozisyonu 272'de glutamat/lizin değişikliğine neden olmaktadır. Fragment 2'de ise herhangi bir mutasyon gözlenmemiştir.

Tablo 6. *ICP4* geni fragment 1’de belirlenen mutasyonlar ve referans suşlarla karşılaştırılması

Örnek	Gen Pozisyonları						
	438	456	598	684	735	811	814
FJ477351 CEO vaccine Nobilis-ILT	A	A	A	A	C	G	G
FJ477350 CEO vaccine Laryngo-Vac	A	A	A	G	C	G	G
EU104900 CEO vaccine	A	A	A	A	C	G	G
FJ477349 TCO vaccine LTI-IVAX	G	A	G	A	C	G	G
EU104908 TCO vaccine	G	A	G	A	C	G	G
KF786292 2011/UFGM clone 1	G	G	G	A	C	A	G
Y8_ILTV	A	A	A	A	C	G	G
Y23_ILTV	A	A	A	A	C	G	G
Y35_ILTV	A	A	A	A	C	X	X
Y40_ILTV	A	A	A	A	<u>T</u>	G	<u>A</u>

X: belirtilen bölge için dizileme verisi bulunmamaktadır.

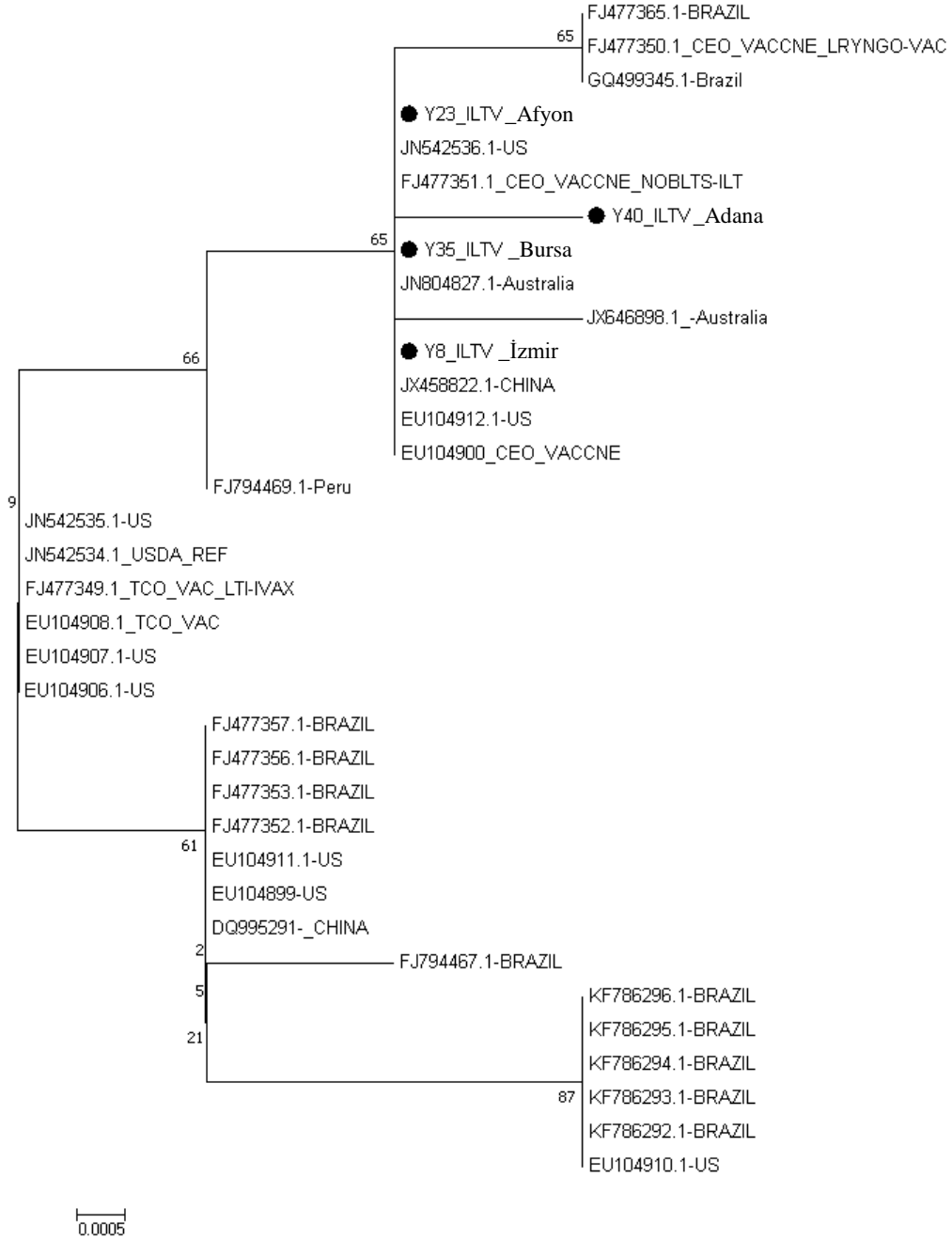
TK geni için Y8, Y23, Y35 ve Y41 örneklerine ait gen sekansları değerlendirilerek gözlenen mutasyonlar ve pozisyonları Tablo 7’de verilmiştir. Buna göre Y8 örneğinde pozisyon 661’de adenin/timin değişikliği gözlenmiştir. Buna bağlı olarak 221. aminoasitte asparajin/tirozin değişikliği meydana gelmiştir ve dolayısıyla ilgili mutasyon yanlış anlamlı (missense) mutasyon olarak tanımlanmıştır.

Tablo 7. *TK* geninde belirlenen mutasyonlar ve referans suşlarla karşılaştırılması

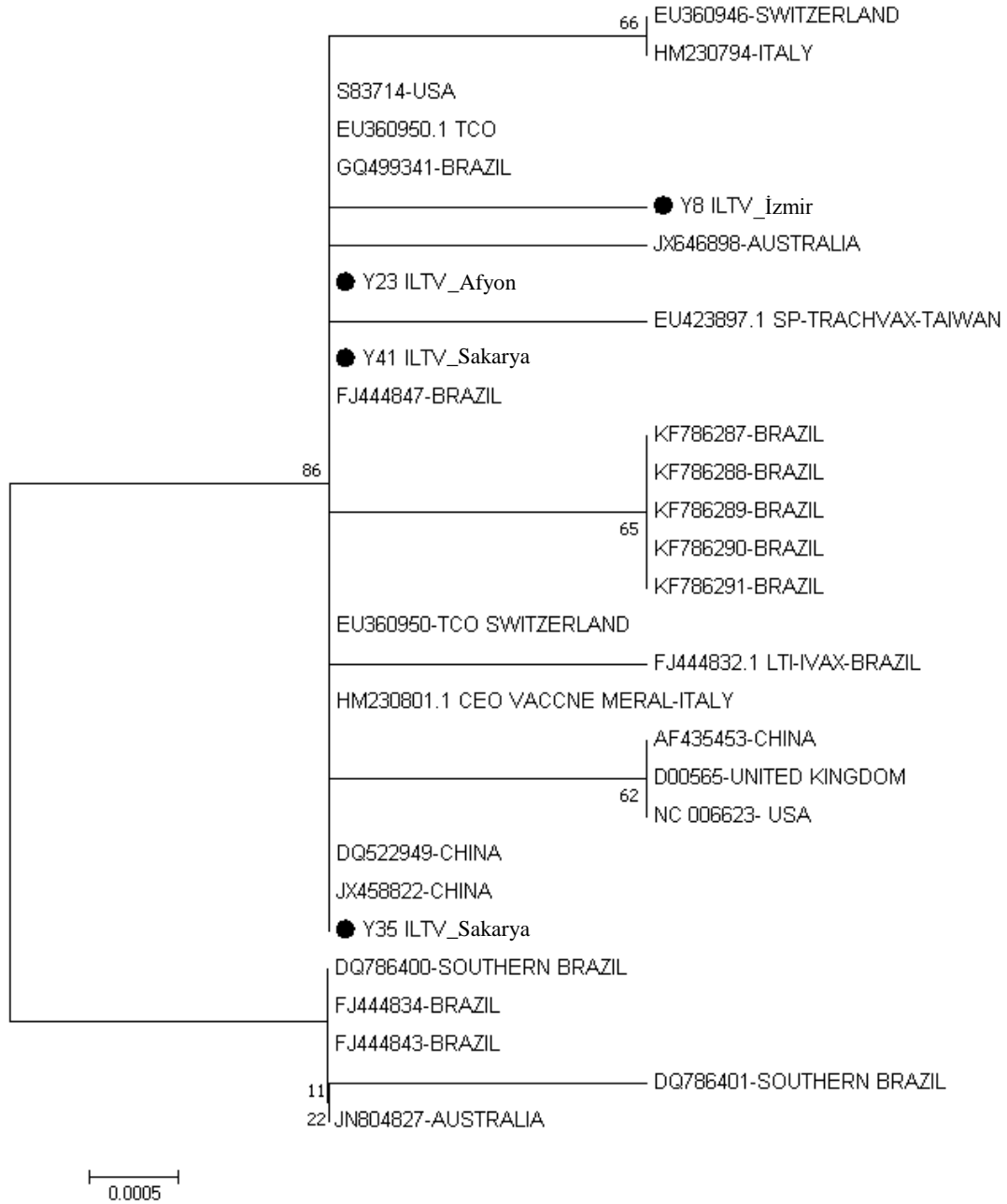
Örnek	Gen Pozisyonları				
	540	568	650	661	797
HM230801 CEO vaccine Merial	T	A	G	A	T
FJ444832 LTI-IVAX	C	A	G	A	G
EU42389 SP-Trachivax	C	A	A	A	T
EU360950 TCO	C	A	G	A	T
KF786287 2011/UFGM	C	C	G	A	T
Y8_ILTV	C	A	G	<u>T</u>	T
Y23_ILTV	C	A	G	A	T
Y35_ILTV	C	A	G	A	T
Y41_ILTV	C	A	G	A	T

ICP4 geni baz alınarak gerçekleştirilen dizi analizleri sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, NCBI’da bulunan GenBank veri tabanı temel alınarak referans suşlara ait nükleik asit dizilimleriyle karşılaştırılmış ve filogenetik ağaç Şekil 24’de

sunulmuştur. Aynı yöntem uygulanarak *TK* geni temel alınarak şekillendirilen filogenetik ağaç Şekil 25'te verilmiştir.



Şekil 24. Referans suşların ve çalışmadaki ILTV pozitif örneklerin *ICP4* geni baz alınarak oluşturulan filogenetik ağaç



Şekil 25. Referans suşların ve çalışmadaki ILTV pozitif örneklerin *TK* geni baz alınarak oluşturulan filogenetik ağaç

4.7. aMPV

Çalışma kapsamında incelenen örneklerde aMPV varlığının belirlenmesi amacıyla yapılan analizler, 45 yumurtacı ve 48 broyler kümesinden alınan 93 örnekten

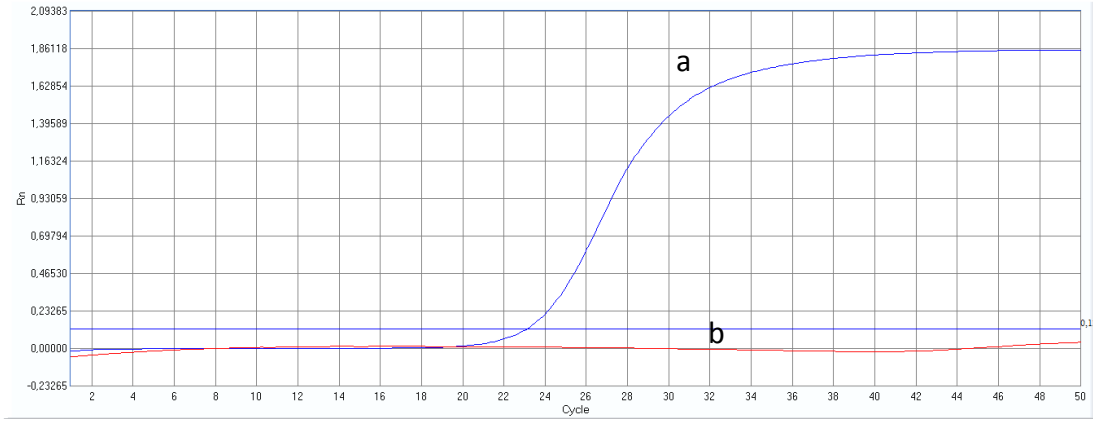
toplam 10'unun (%10,75) aMPV pozitif olduğunu göstermiştir. Pozitif örneklerin 6'sının (%60) yumurtacı, 4'ünün (%40) ise broyler kümeslere ait olduğu görülmüştür. Değerlendirmede Ct (cycle threshold) değeri 38'in üzerinde olan değerler negatif olarak kabul edilmiştir. Buna göre, pozitif kontrolde pozitif değer belirlenmiş olup; negatif kontrolde ise herhangi bir değer gözlenmemiştir. Örnekler ve pozitif/negatif kontrollere ait rRT-PCR ile elde edilen Ct değerleri ve sonuçların değerlendirilmesi Tablo 8'de sunulmuştur.

Tablo 8. rRT-PCR ile test edilen örnekler ve sonuçların değerlendirilmesi

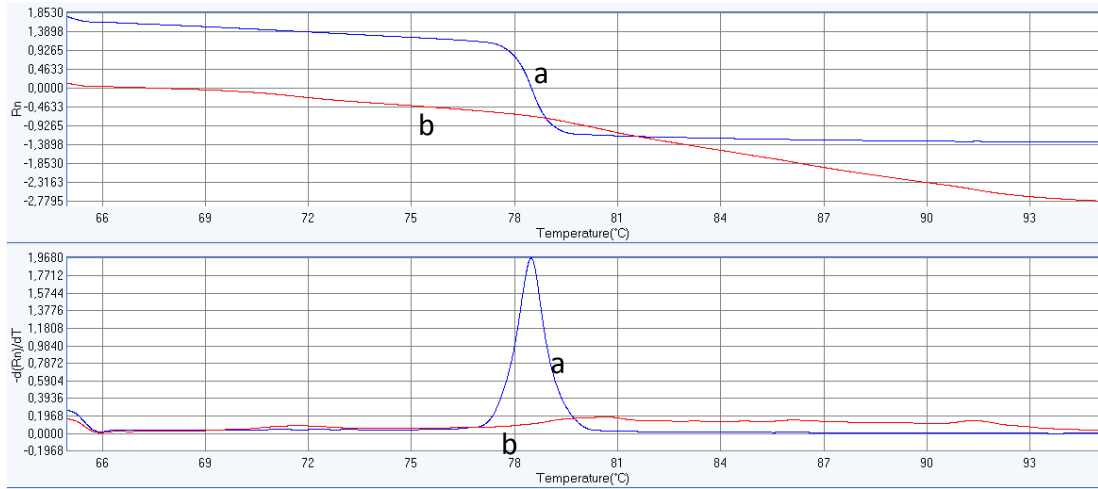
Örnek numarası	Değerlendirme	Örnek numarası	Değerlendirme	Örnek numarası	Değerlendirme
Y1	Negatif	Y32	Pozitif	B18	Negatif
Y2	Negatif	Y33	Pozitif	B19	Negatif
Y3	Negatif	Y34	Negatif	B20	Negatif
Y4	Negatif	Y35	Negatif	B21	Negatif
Y5	Negatif	Y36	Negatif	B22	Negatif
Y6	Negatif	Y37	Pozitif	B23	Negatif
Y7	Negatif	Y38	Negatif	B24	Negatif
Y8	Negatif	Y39	Negatif	B25	Negatif
Y9	Negatif	Y40	Negatif	B26	Pozitif
Y10	Negatif	Y41	Negatif	B27	Negatif
Y11	Pozitif	Y42	Negatif	B28	Negatif
Y12	Negatif	Y43	Negatif	B29	Negatif
Y13	Negatif	Y44	Negatif	B30	Pozitif
Y14	Pozitif	Y45	Negatif	B31	Negatif
Y15	Negatif	B1	Pozitif	B32	Negatif
Y16	Negatif	B2	Negatif	B33	Negatif
Y17	Negatif	B3	Negatif	B34	Negatif
Y18	Negatif	B4	Negatif	B35	Negatif
Y19	Negatif	B5	Negatif	B36	Negatif
Y20	Negatif	B6	Negatif	B37	Negatif
Y21	Negatif	B7	Negatif	B38	Negatif
Y22	Negatif	B8	Negatif	B39	Pozitif
Y23	Negatif	B9	Negatif	B40	Negatif
Y24	Negatif	B10	Negatif	B41	Negatif
Y25	Negatif	B11	Negatif	B42	Negatif
Y26	Negatif	B12	Negatif	B43	Negatif
Y27	Negatif	B13	Negatif	B44	Negatif
Y28	Negatif	B14	Negatif	B45	Negatif
Y29	Negatif	B15	Negatif	B46	Negatif
Y30	Pozitif	B16	Negatif	B47	Negatif
Y31	Negatif	B17	Negatif	B48	Negatif

Y: Yumurtacı, B: Broyler

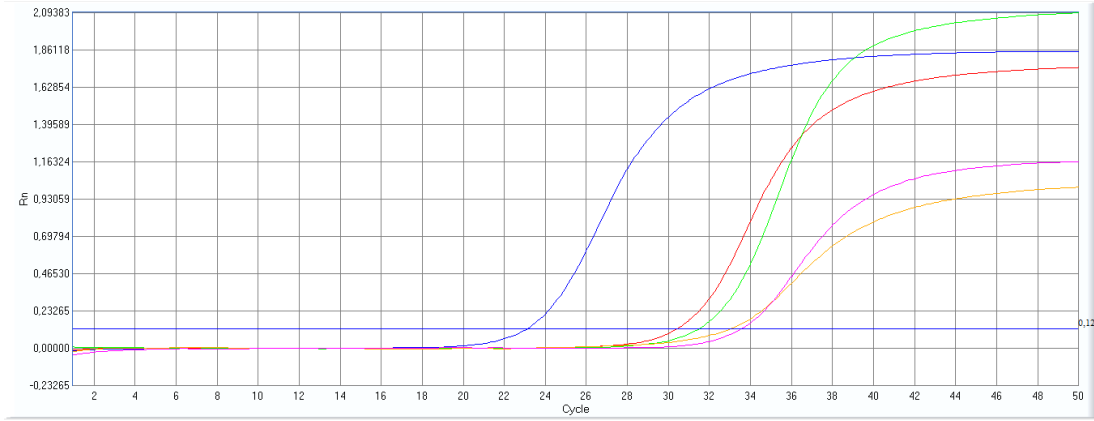
SYBR Green I bazlı rRT-PCR analizleri sonucu pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon eğrileri Şekil 28’de verilmiş olup bu pozitif örneklere ait Tm grafikleri Şekil 29’da sunulmuştur. Pozitif ve negatif kontrollere ait amplifikasyon ve Tm grafikleri ise sırasıyla Şekil 26 ve 27’de verilmiştir.



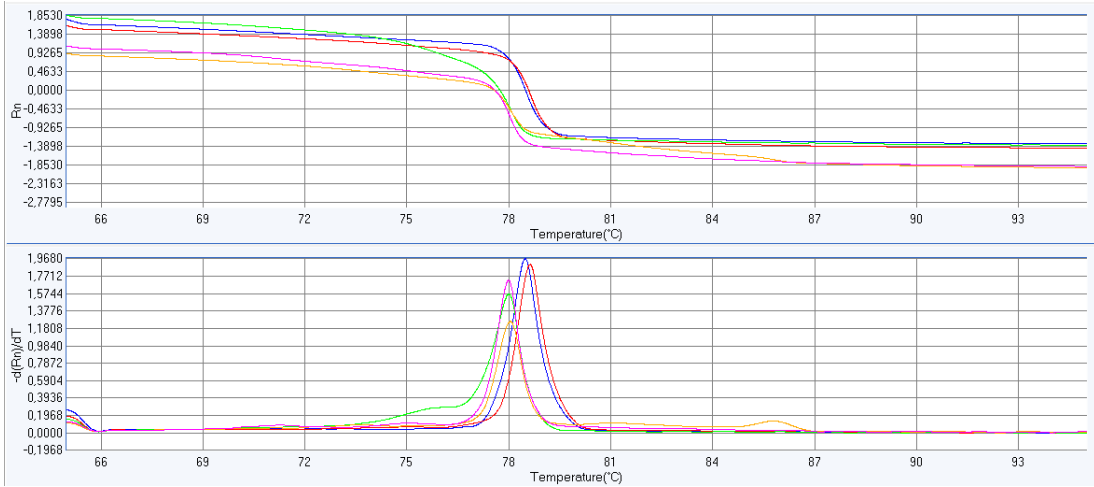
Şekil 26. Pozitif (a) ve negatif (b) kontrollerin amplifikasyon eğrileri



Şekil 27. Pozitif (a) ve negatif (b) kontrollerin Tm grafiği



Şekil 28. Pozitif örneklere ait amplifikasyon eğrileri



Şekil 29. Pozitif örneklere ait Tm grafiği

4.8. ARV

45 yumurtacı ve 48 broyler kümesinden alınan 93 örnekten toplam 12'sinde (%12,90) ARV yönünden pozitiflik saptanmıştır. Belirlenen bu pozitif örneklerin 2'sinin (%16,67) yumurtacı, 10'unun (%83,33) ise broyler kümeslere ait olduğu görülmüştür. Değerlendirmede Ct (cycle threshold) değeri 38'in üzerinde olan değerler negatif olarak kabul edilmiştir. Buna göre, pozitif kontrolde pozitif değer belirlenmiş olup; negatif kontrolde ise herhangi bir değer gözlenmemiştir. Örnekler ve pozitif/negatif kontrollere

ait rRT-PCR ile elde edilen Ct değerleri ve sonuçların değerlendirilmesi Tablo 9’de sunulmuştur.

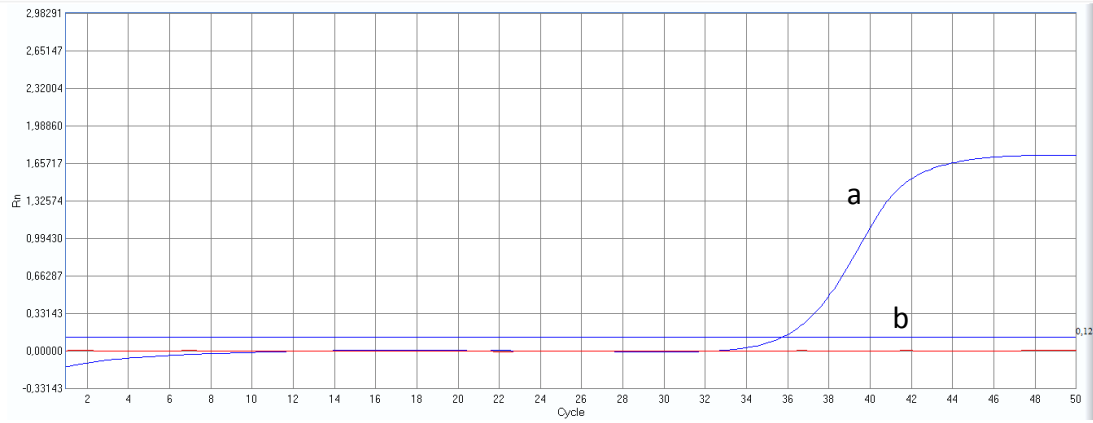
Tablo 9. rRT-PCR ile test edilen örnekler ve sonuçların değerlendirilmesi

Örnek numarası	Değerlendirme	Örnek numarası	Değerlendirme	Örnek numarası	Değerlendirme
Y1	Negatif	Y32	Negatif	B18	Negatif
Y2	Negatif	Y33	Negatif	B19	Pozitif
Y3	Negatif	Y34	Negatif	B20	Negatif
Y4	Negatif	Y35	Negatif	B21	Pozitif
Y5	Negatif	Y36	Negatif	B22	Pozitif
Y6	Negatif	Y37	Negatif	B23	Negatif
Y7	Negatif	Y38	Negatif	B24	Pozitif
Y8	Negatif	Y39	Negatif	B25	Pozitif
Y9	Negatif	Y40	Negatif	B26	Pozitif
Y10	Negatif	Y41	Negatif	B27	Negatif
Y11	Negatif	Y42	Negatif	B28	Negatif
Y12	Negatif	Y43	Negatif	B29	Pozitif
Y13	Negatif	Y44	Pozitif	B30	Negatif
Y14	Negatif	Y45	Negatif	B31	Negatif
Y15	Negatif	B1	Negatif	B32	Negatif
Y16	Negatif	B2	Pozitif	B33	Negatif
Y17	Negatif	B3	Negatif	B34	Negatif
Y18	Pozitif	B4	Negatif	B35	Negatif
Y19	Negatif	B5	Negatif	B36	Negatif
Y20	Negatif	B6	Negatif	B37	Negatif
Y21	Negatif	B7	Pozitif	B38	Negatif
Y22	Negatif	B8	Negatif	B39	Pozitif
Y23	Negatif	B9	Negatif	B40	Negatif
Y24	Negatif	B10	Negatif	B41	Negatif
Y25	Negatif	B11	Negatif	B42	Negatif
Y26	Negatif	B12	Negatif	B43	Negatif
Y27	Negatif	B13	Negatif	B44	Negatif
Y28	Negatif	B14	Negatif	B45	Negatif
Y29	Negatif	B15	Negatif	B46	Negatif
Y30	Negatif	B16	Negatif	B47	Negatif
Y31	Negatif	B17	Negatif	B48	Negatif

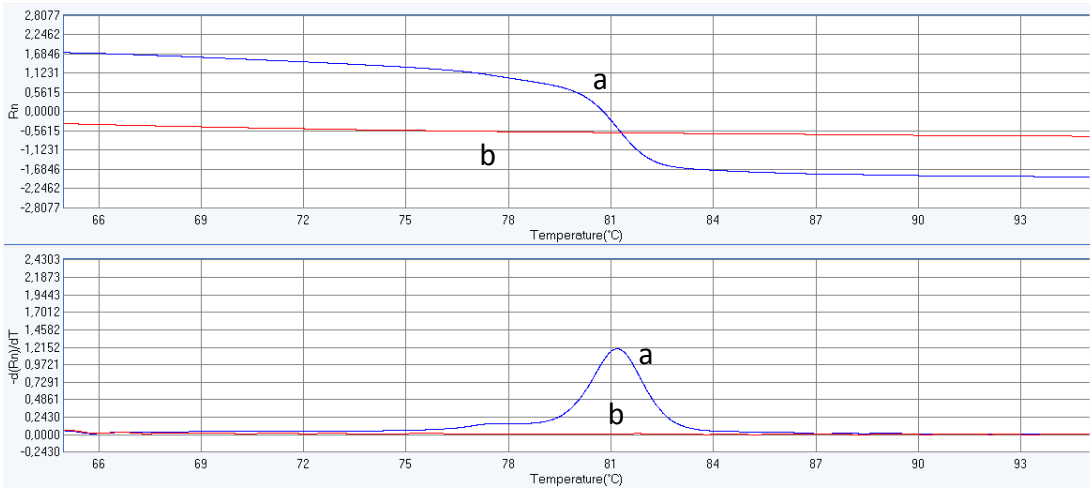
Y: Yumurtacı, B:Broyleler

SYBR Green I bazlı rRT-PCR analizleri yardımıyla pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon eğrileri Şekil 32’de sunulmuştur. Bu pozitif örneklere ait Tm

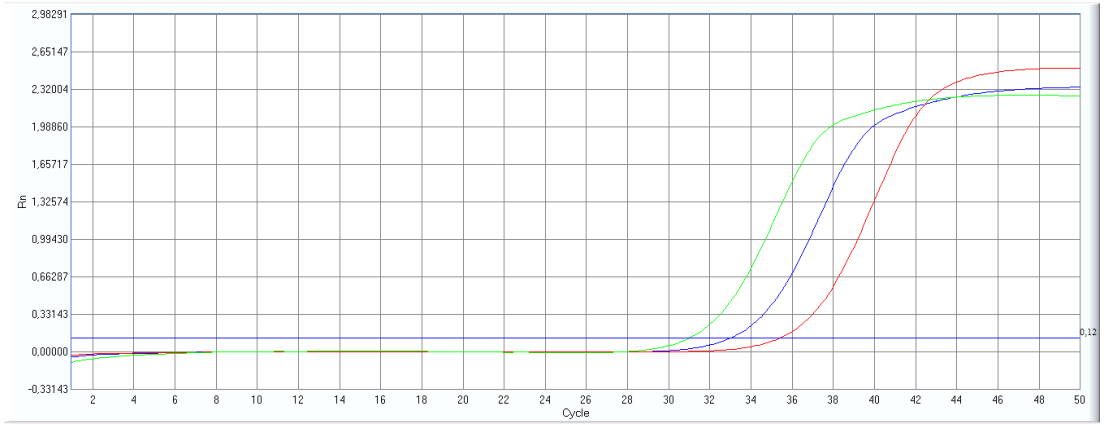
grafikleri Şekil 33’de gösterilmiştir. Pozitif ve negatif kontrollere ait amplifikasyon ve T_m grafikleri ise sırasıyla Şekil 30 ve 31’de verilmiştir.



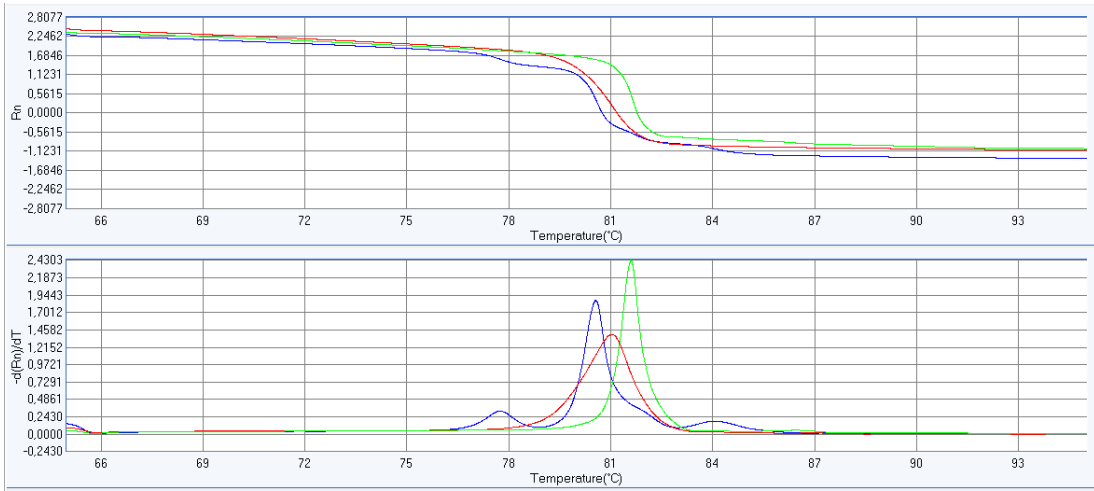
Şekil 30. Pozitif ve negatif kontrollere ait amplifikasyon eğrileri



Şekil 31. Pozitif ve negatif kontrollere ait T_m grafikleri



Şekil 32. Pozitif örneklere ait amplifikasyon eğrileri



Şekil 33. Pozitif örneklere ait Tm grafiği

4.9. Enfeksiyonların görüldüğü bölgeler

Çalışma sonucunda incelenen virusların görüldüğü iller Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Enfeksiyonların görüldüğü iller

Etken	İller
IBV	İzmir, Afyon, Uşak, Manisa, Balıkesir, Sakarya, Kayseri, Adana, Elazığ, Van
ILTV	İzmir, Afyon, Manisa, Bursa, Sakarya, Adana
AMPV	Afyon, Aydın, Sakarya, Adana
ARV	İzmir, Afyon, Balıkesir, Sakarya, Van

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Solunum yolu enfeksiyonları ekonomik açıdan kanatlı sektöründe oldukça önemli problemlere neden olur. Enfeksiyonlarla spesifik mücadelede kullanılan aşılama, enfeksiyonların meydana getirdiği ölüm oranları ve verim kayıpları bu kayıpların en önemli nedenlerini oluşturur. Özellikle bu enfeksiyonlarla ilgili koruma kontrol stratejilerinin belirlenmesi ve bu bağlamda aşılama hangi suşlar kullanılarak yapılacağına ve ne sıklıkla kullanılacaklarına karar verilebilmesi solunum yolu enfeksiyonlarının varlıklarının ve etkilerinin derinlemesine analiz edilmesi ile mümkündür. Bunun için enfeksiyonların zamana bağlı durum tespitlerinin veya teşhislerinin en uygun yöntemlerle yapılması gerekmektedir. Bu bağlamda, bu çalışmada solunum yolu enfeksiyonlarının güncel durumlarının belirlenmesi ve “altın standart” metotlarla enfeksiyonların tanısının konulması hedeflenmiştir.

Altın standart metotlar olarak OIE tanı el kitabında yer alan prosedürler izlenerek solunum yolu enfeksiyonlarında rol oynayan majör virusların izolasyonuna gidilmiştir (OIE, 2018a, 2018b, 2018e). Çalışmamızda NDV ve AIV’lerin negatif olduğu örneklerde IBV, ILTV, aMPV ve ARV izolasyonları yapılmıştır. Tüm örneklerde NDV ve AIV yönünden negatiflik inoküle edilen ETY’lerin allantoik sıvılarında HA ve spesifik olarak HI aktivitelerinin olmayışı ile belirlenmiştir. Bundan sonra örneklerdeki IBV, ILTV, aMPV ve ARV varlığı embriyolu yumurtaların allantoik sıvıları ile birlikte CAM’ları örnek olarak kullanarak rPCR ile belirlenmiştir. Bu amaçla, rPCR yöntemleri pozitif kontrol virus suşları ile denenerek, tüm testlerle ilgili viruslara spesifik amplifikasyonlar elde edilmiş, bu denemelerden sonra rPCR tüm saha örneklerine uygulanmıştır. Aslında virus izolasyonu işlemlerinde virus varlıklarını CAM ve allantoik sıvıda tanımlamak için virus karakterine uygun olarak kullanılan başka testler de bulunmaktadır. Örneğin, IBV tanımlaması için IFA, IPA (immunoperoxidase assay), HI, VN, ELISA, AGP (de Wit, 2000), ILTV tanımlaması için IFA, IPA, ELISA, VN,

AGP (Hidalgo, 2003), aMPV identifikasyonu için IFA, IPA, ELISA, serum nötralizasyon testi (Baxter-Jones, Wilding, & Grant, 1986; Etteradossi, Toquin, Guittet, & Bennejean, 1995; Gharaibeh & Algharaibeh, 2007; Majo, Allan, O'loan, Pages, & Ramis, 1995) ve ARV identifikasyonu için AGP, VN, IF, ELISA (Jones, 2000) gibi testler yapılırsa da rPCR günümüzde tüm bu virusların identifikasyonunda kullanılan en duyarlı ve spesifik yöntem durumundadır. Ayrıca rPCR haricindeki bu serolojik ve immunolojik testlerin işgücü, deneyimli çalışan ve laboratuvar gereksinimi ile birlikte uzun zaman almaları ve bu testlerin aynı güvenilirlikle tekrarlanabilirliklerinin düşük olması gibi durumlar gözönüne alındığında son yıllarda rutin uygulamalarda bu yöntemlerin kullanımlarını ortadan kaldırmıştır (Cecchinato et al., 2013; Crespo, Woolcock, Chin, Shivaprasad, & García, 2007; de Wit, 2000; Jones, 2000). Çalışmamızda da pozitif kontroller ve saha örnekleri kullanılarak yapılan rPCR testlerinin etkili bir şekilde virusların identifikasyonlarında kullanılabilirdiği görülmüştür. Sonuç olarak çalışmamızda rPCR testlerinin virus identifikasyonlarında sağlıklı, hızlı ve güvenilir bir şekilde uygulanabileceği gözlenmiştir.

Çalışmamızda klinik örnek olarak trakeal svab örnekleri ülkemizin tavuk yetiştiriciliğinin en yoğun olduğu bölgelerde yer alan Bolu, Sakarya, Bursa, Balıkesir, Manisa, Uşak, Afyon, İzmir, Aydın, Denizli, Kayseri, Adana, Elazığ, Ankara ve Van gibi illerde bulunan solunum sistemi enfeksiyonu görülen işletmelerden rastgele örneklem metoduyla seçilmiş ve bu sayede tüm ülkemiz tavukçuluğunda sorun olan solunum yolu virus enfeksiyon prevalansları belirlenebilmiştir. Bu trakeal svab örnekleri virus izolasyonu için uygun şekilde ETY'lere inoküle edilip virus izole edildikten sonra, ETY'lerin CAM ve allantoik sıvı karışımlarından izole edilen nükleik asit templeytlarına her bir virusa spesifik rPCR testi uygulanarak, enfeksiyon tanısı konmuş ve tüm örneklerdeki tablo değerlendirilerek enfeksiyonların prevalansları ortaya çıkarılmıştır. Bu bağlamda, ülkemizde prevalansı en yüksek solunum yolu virus enfeksiyonu toplam olarak % 52,69 ile IBV olarak belirlenmiştir. Bu IBV prevalans dominantlığı broyler ve yumurtacı olmak üzere her iki yetiştirme tipinde de görülmüş ve bu yüksek prevalansın IBV'nin hala kontrolünde primer ve kritik bir uygulama olan aşılımların uygun biçimde yapılamadığı, aşı viruslarıyla saha viruslarının koruyuculuklarının örtüşmediği kanatine

varılmıştır. Bilinmektedir ki IBV enfeksiyon kontrolü tüm dünyada IBV'lerin koruyuculukla ilgili protein antijenlerini kodlayan *SI* gen bölgelerinde sıklıkla görülen nokta mutasyonlar ve rekombinasyon sonucunda oldukça problemlili bir haldedir. Bu problemin çözümü ise *SI* gen bölgesinin kritize edilerek uygun protektif aşı suşlarının seçimi ile mümkündür (Gelb Jr, Weisman, Ladman, & Meir, 2005; Kahya et al., 2013; Worthington et al., 2008). Çalışmamızdaki IBV enfeksiyonunun hem broyler hem de yumurtacı sürülerdeki oldukça yüksek prevalansı, bu enfeksiyonun kontrolünde etkin bir aşılama stratejisinin ülkemizde hala geliştirilemediğini gösterir niteliktedir. Çalışmamızda yumurtacı ve broyler sürülerde IBV enfeksiyonunun çoğunlukla tek başına olduğu (%37,63), nadiren de olsa aMPV ve ARV enfeksiyonları ile birlikte gözlemlendiği belirlenmiştir. Bayraktar et al. (2018), Türkiye'deki broyler kümeslerinden alınan klinik örneklerden %7,2'sinde aMPV tespit etmiştir. Bu örneklerin hepsinde ayrıca IBV (İsrail varyant-2 ve 793/B) de pozitif bulunmuştur. Andreopoulou et al. (2019) Yunanistan'da IBV ve aMPV prevalansını belirlemek için yaptıkları çalışmada, broyler ve yumurtacı kümeslerin %83,96'sında IBV, %30,18'inde aMPV pozitif bulmuştur. Bu örneklerin %68'inde IBV ve aMPV birlikte saptanmıştır. Çalışmamızdan elde edilen verilerin tersine, Tucciarone et al. (2017) İtalya'daki broyler kümeslerinde yaptıkları çalışmada aMPV'nin bireysel olarak da yoğun olduğunu belirlemiştir. Çalışmamızda prevalansı en yüksek ikinci enfeksiyonun ARV enfeksiyonu olduğu gözlenmektedir. Belirlenen bu yüksek prevalansına rağmen genel tabloya bakıldığında ARV'nin tek başına solunum yolu enfeksiyonunu oluşturduğu olguların gerek broyler (1 adet) gerekse yumurtacı (3 adet) sürülerde oldukça az olduğu saptanmıştır. Bu durum ARV enfeksiyonlarının çoğunlukla IBV gibi daha dominant virus enfeksiyonlarıyla birlikte (7 adet) seyrettiğini göstermiştir. Genel olarak, ARV enfeksiyonları, kanatlılarda solunum yolu hastalıklarının primer nedeni olarak kabul edilmemektedir, ancak ilk rapor edilen ARV, civcivlerde hafif bir solunum yolu hastalığına neden olmuştur. Başka bir izolatin ise kendi başına solunum yolu hastalığına neden olmamasına rağmen, düşük patojeniteye sahip bir *Mycoplasma gallisepticum* suşu ile kombinasyonu halinde solunum bulguları ve lezyonlarını oluşturduğu gözlenmiştir (Menendez, Calnek, & Cowen, 1975). Yukarıda belirtildiği gibi, IBV enfeksiyonuna sekonder olarak katılım

aMPV'de de oldukça fazladır. Bu sonuçlar, ülkemizde ARV ve aMPV enfeksiyonlarının sahada tek başlarına problemlere yol açmadığını, ancak IBV enfeksiyonu ile birlikte ekonomik kayıpları artıracak bir şekilde bulunduğunu düşündürmektedir. Diğer taraftan ILTV enfeksiyonunun şaşırtıcı bir şekilde diğer 3 virus enfeksiyonundan farklı; ancak IBV enfeksiyonuna benzer biçimde hiçbir virusla birlikte olmaksızın gerek yumurtacılar da gerekse broylerlerde tek başına %11,8 oranında prevalansa sahip olduğu görülmektedir. Bu durum ülkemizde ILTV enfeksiyonunun yadsınamayacak düzeyde olduğu, gelecekte uygun aşılama stratejilerinin uygulanmadığı takdirde vakaların artabileceği kanaatini uyandırmaktadır. Çalışmamızın sonuçları, solunum yolu virus enfeksiyonları birlikteliğinin IBV enfeksiyonlarında görülebildiğini ancak ILTV vakalarında çoklu enfeksiyonların bulunmadığını göstermektedir. Bu bulgularımıza ek olarak *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Avibacterium paragallinarum*, *Pasteurella multocida* gibi bakteriyel solunum yolu enfeksiyonlarının varlığının ve katılım düzeylerinin belirlenmesi konusunda daha detaylı bir çalışmanın yapılmasının da elde edilen verilerin daha anlamlı hale gelmesine katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

Çalışmamızın bir diğer kısmında IBV izolatlarının, *S1* gen bölgesinin çok değişken bölgelerini kapsayacak bir kısmının nükleotid dizilenmesi ile genotiplendirilmesi ve genotiplendirilen izolatların dünyadaki diğer IBV izolatlarıyla genetik yakınlıklarının incelenmesi hedeflenmiş ve çalışmada 5 izolatın *S1* gen bölgesinden yaklaşık 393 bç'lik bir bölgenin nested-PCR ile dizilemesi sağlanabilmiştir. Standart suşların kullanıldığı PCR reaksiyonlarında farklı primer kombinasyonları denenmiş olmasına rağmen sadece SX primerleri ile dizilemenin başarılı olmasının birçok teknik nedeni olabileceği göz önünde bulundurulmuş olup yöntemde çok sayıda parametre değiştirilerek farklı modifikasyonlar denenmiştir. Ancak SX primerleri kullanılarak standart IBV suşları ile başarı sağlanabilmiş ve bu primerlerin kullanımı ile 5 izolat genotiplendirilebilmiştir. Bunun sonucu yumurtacı sürülere ait 3 adet izolatın 4/91 ile %99 oranında genetik benzerlik taşıdığı; biri broyler diğeri

yumurtacı 2 izolatın ise IS/1494/06 (Variant 2) ile %99 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir. 44 adet IBV izolatının dizilenemediği göz önünde bulundurulduğunda, ülkemizde yaygın veya dominant olan genotipin adını vermek burada çok da bilimsel bir yaklaşım olmayacaktır düşüncesindeyiz. Ancak yaptığımız çalışmalar ve deneyimlerimiz bize IBV izolatlarının hepsinin *SI* gen bazlı genotiplendirmelerinin tek bir primer çifti ile yapılmasının olanaklı ve/veya kolay olmadığını göstermektedir. Özetlemek gerekirse, *SI* gen bölgesinde oluşan değişimlerle farklı mutant IBV izolatlarının tek bir primer çifti ile kolayca tiplendirilmesinin pek de mümkün olmayacağı kanısındayız.

Türkiye bulunduğu coğrafya açısından değerlendirildiğinde, kanatlı endüstrisi bakımından önemli bir yere sahiptir ve bu bağlamda, Avrupa ile Asya arasında bir köprü görevi görmektedir (Yılmaz et al., 2016). Ancak her geçen gün hacmini arttıran bu endüstride IBV gibi etkenlerin neden olduğu enfeksiyonlar önemli ekonomik kayıplara yol açmakta ve bu sebeple de etkenlere ait teşhisin daha güvenilir olan genomik yöntemlerle gerçekleştirilmesi giderek önem kazanmaktadır. Farklı ülkelerde *SI* gen bölgesi baz alınarak IBV'ye ait genotiplendirme çalışmaları yapılmıştır (Abro et al., 2012; Awad, Baylis, & Ganapathy, 2014; Bochkov, Batchenko, Shcherbakova, Borisov, & Drygin, 2006; Kahya et al., 2013; Mahmood, Sleman, & Uthman, 2011; Meir et al., 2004; Worthington et al., 2008). Ayrıca, Najafi et al. (2016) İran'ın farklı bölgelerindeki broyler kümeslerinden elde edilen örneklerden ilk defa IBV izolasyonu ve karakterizasyonunu yapmıştır. Toplam 118 IBV izolatından en sık görülen Var2 ve 4/91 olarak belirlenerek bu suşların sıklıklarının sırasıyla %34 ve %21 olduğu, daha az sıklıkta ise QX (%10), IS/720 (%8), Massachusetts (%4) ve IR-1 (%3) genotiplerinin olduğu bulunmuştur. İran'da yapılan diğer çalışmalar, İran izolatlarının Var2, 4/91, Massachusetts, QX, IS/720, IR-I ve IR-II genotipleriyle yakın ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Gholami, Karimi, Ghalyanchi Langeroudi, Hashemzadeh, & Vasfi Marandi, 2018; Hamadan et al., 2017; Homayounimehr, Pakbin, Momayyez, & Fatemi, 2016; Hosseini, Fard, Charkhkar, & Morshed, 2015; Saadat et al., 2017; Yousefi, Bassami, Kalidari, & Seno, 2019). Benzer şekilde Ganapathy, Ball, & Forrester (2015) 2009-2014 yılları arasında Orta Doğu'da sirküle eden IBV suşlarını genotiplendirmiştir.

Genotiplendirme sonucunda en yüksek iki genotipin 793/B (43.66%) ve IS/1494/06 (18.31%) olduğu tespit edilmiştir. Mass, IS/885/00, Q1 ve D274 genotiplerine ait suşlar da düşük oranda olmakla birlikte varlığı bildirilmiştir. Seger et al. (2016) Irak'ta 2013-2014 yılları arasında yaptıkları çalışmada %46,8 oranında IS/1494/06 ve %40,6 oranında 793/B, %9,3 oranında QX ve %3,1 oranında DY12-2 bulmuştur. Al-Shekaili, Baylis, & Ganapathy (2015) ise Umman'daki kanatlı işletmelerinde 4/91'in en baskın suş olduğunu (%66,67); M41 (%5,12), D274 (%5,12), Var2 (%2,56) ve IS/885/00 (%2,56) suşlarının ise incelenen diğer suşlara göre daha düşük bir sıklıkta gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Mısır'da Massachusetts D3128, D274, D-08880, 4/91, Egypt/Beni-Suef/01(Var1) genotipleri tespit edilmiştir.

Avrupa'daki çalışmalarda ise görülme sıklıkları farklı olmakla birlikte benzer suşların sahada bulunduğu bildirilmiştir. Kiss et al. (2015) Macaristan'da %58,8 oranında 4/91, %35,3 oranında QX ve %5,9 oranında D274 IBV suşlarını tespit etmişlerdir. de Wit, Cazaban, Dijkman, Ramon, & Gardin (2018) birçok Avrupa ülkesinde (Fransa, Almanya, Yunanistan, İrlanda, İtalya, Hollanda, Polonya, Portekiz, İspanya, Birleşik Krallık) 793/B genotipinin en yüksek oranda görüldüğünü saptamıştır. Bu genotipi QX, Massachusetts (Mass) ve Xindadi-benzeri suşlar izlemiştir. Q1, Ark, D274, D1466, Italy-02 ve B1648 genotiplerine ait suşların da düşük oranda olmakla birlikte varlığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın dizileme verileri ülkemizde yumurtacı ve broyler sürülerinde aşılamalara rağmen Var2 ve 4/91-ilişkili IBV enfeksiyonlarının devam ettiğine işaret etmektedir. Türkiye'de IB'ye ait sorunların uzun yıllar önce de var olduğu serolojik çalışmalarla ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Bu bağlamda ülkemizde 1980'li yıllardan itibaren IBV enfeksiyonlarının tespit edildiği bildirilmiştir (Çöven, Ergün, Orhan, Karaçalı, & Deveci 1994; Demirözü, Altınöz, & Alp, 1989; Şen, Sönmez, Caner, & Özyiğit, 2002). Çelebi (2009) tarafından yapılan çalışmada Ege bölgesinden toplanan serum örneklerinden ELISA ile M41, HI testi ile 4/91 ve D274 suşlarına karşı oluşan antikorlar saptanmıştır. Akan et al. (2007) tarafından RT-PCR ve Floresan antikor tekniği karşılaştırmalı olarak yapılmış ve RT-PCR ile %19,4, FAT ile %15,5 oranında pozitiflik bulunmuştur. Çalışmada aynı zamanda ETY'de yapılan izolasyonu takiben

toplanan allantoik sıvılardan ve direkt örneklerden RT-PCR yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda, ETY’de izolasyon sonrasında yapılan PCR’in teşhiste daha uygun bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Ancak Akan et al. (2007) tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada virusa ait genetik karakterizasyon yapılmamıştır. Onen (2011)’in yaptığı çalışmada ise rRT-PCR ile IBV saptanması ve *SI* geninin dizilemesi sonucu Türkiye’deki suşların filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *SI* bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan ilk primerler ile herhangi bir sonuç elde edilemezken sonrasında seçilen farklı primerler ile gerçekleştirilen ikinci amplifikasyon sonrasındaki elektroforez işleminde örnekler ait pozitif bantlar elde edilmiştir. Ancak GenBank’taki diğer IBV’lerle benzerlik göstermemiştir. Türkiye’deki IBV varyantlarına ait genetik karakterizasyonun gerçekleştirildiği ilk kapsamlı çalışma Kahya et al. (2013) tarafından yapılmıştır. Bu bağlamda sunulan tez çalışmasında da yer alan Var2 genotipi Kahya et al. (2013) tarafından yapılan çalışmada rapor edilmiştir. Benzer şekilde, Yılmaz et al. (2016) da ülkemizde dominant genotipin Var2 olduğunu ve bunun yanında diğer genotiplerin H120, 4/91 olduğunu bildirmişlerdir. Aral (2016) tarafından yapılan bir çalışmada da solunum sistemi problemi görülen tavuk sürülerinden elde edilen IBV izolatlarının IS/1494/06 ve M41-ilişkili olduğu belirlenmiş ve bu durum da Türkiye’deki IBV sorunlarının çoğunun Israel Var2 kaynaklı olduğunu desteklemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda ülkemizde 4/91, M41 ve Var2 varyantlarının IB’den sorumlu olduğundan söz etmek olanaklı olmasına karşın, gerçek IBV genotipi baskınlığını veren tablonun, ancak çalışmamızdaki tüm izolatların *SI* gen dizilemelerinin başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi sonucunda mümkün olabileceği aşıkardır. IBV’ye ait genotiplendirme sonuçları bize sahada kanatlı sürülerimizi IBV enfeksiyonundan korumada, aşı suşlarının hangilerinin seçileceği veya diğer bir deyişle hangi protektotiplerin kullanılacağı konusunda fikir veren en değerli veridir. Kısaca sahada *SI* gen bölgesi bakımından aşı suşlarından %10 gibi bir farklılığa sahip IBV izolatlarının varlığı, bu aşı suşlarının saha suşlarının korunmasında kullanılamayacağını işaret eder (Jackwood & de Wit, 2013). Bu bağlamda işletmelerde IB sorunlarının halen devam ediyor olması, sahada hala farklı genetik yapıda IBV’lerin bulunabileceği ve/veya aşı

uygulamalarının etkin ve kontrollü bir şekilde yapılamadığı gibi durumları akla getirmektedir.

Çalışmamızda izole edilen ILTV izolatlarının incelenen *ICP4* bölgelerinin birbiri ile identikal oldukları gözlenmiş ve *ICP4* geninin 272-283 bç bölgesinde bir delesyonun olmadığı saptanmıştır. Bilindiği gibi ILTV izolatlarının moleküler karakterizasyonu ve diferensiasyonu ILT hastalık salgınlarına neden olan virusların orijininin ortaya koyulmasında önemli epidemiyolojik veriler niteliğindedir. Bu bağlamda daha önce yapılmış olan araştırmalar ILTV genomunda *ICP4* spesifik gen bölgesinin incelenmesiyle, ILTV aşısı ve saha suşlarının güvenle ayrılabilceğini göstermiştir (Chacón & Ferreira, 2009; Chacon, Mizuma, & Piantino Ferreira, 2010; Creelan, Calvert, Graham, & McCullough, 2006; de Macedo Couto et al., 2015). Bu çalışmadaki izolatlarda CEO (Chicken embryo-origin) ve TCO (tissue culture-origin) aşısı viruslarında görülen 272-283 bç bölgelerindeki delesyonun olmaması, bu suşların aşısı kökenli hastalık virusları olmadığına işaretidir. Bu durum ülkemizde ILTV salgınlarının saha kökenli ILTV'ler tarafından oluşturulduğunu göstermektedir. Ayrıca, yumurtacı kümeslerden alınan bir örnekte nükleotid pozisyonu 735'te sitozin/timin değişikliği ile karakterize bir nokta mutasyonu bulunduğu saptanmıştır. Ancak aminoasit dizisi incelendiğinde bu mutasyonun herhangi bir aminoasit değişikliğine neden olmadığı ve dolayısıyla bir sessiz mutasyon olarak değerlendirilebileceği kanısına varılmıştır. Aynı örneğe ait sekans analizinde pozisyon 814'te ise bir guanin/adenin değişiminin bulunduğu ve meydana gelen bu mutasyonun aminoasit pozisyonu 272'de glutamat/lizin değişikliğine neden olan bir yanlış anlamlı (missense) mutasyon olduğu belirlenmiştir. Yukarıda belirtilen bu mutasyonlar ve olası etkilerine ait literatürde herhangi bir benzer çalışmaya rastlanmamıştır. *TK* geni göz önüne alındığında yumurtacı kümeden alınan bir örnekte nükleotid pozisyonu 661'de adenin/timin değişikliğine neden olan bir nokta mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyon, aminoasit pozisyonu 221'de asparajin/tirozin değişimine neden olmuş ve dolayısıyla bu mutasyon yanlış anlamlı (missense) mutasyon olarak değerlendirilmiştir. İlgili mutasyon hakkında literatürde herhangi bir bilginin yer almadığı görülmektedir. ILTV ile ilgili hem *ICP4* hem de *TK* genlerinde yer alan ve bu çalışma ile tanımlanmış olan nokta mutasyonların genomik ve epidemiyolojik

özelliklerinin daha ayrıntılı bir şekilde ortaya koyulabilmesi için daha kapsamlı moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır. Epidemiyolojik açıdan önemli bir diğer nokta da, bu çalışmadaki izolatların virulenslerinin ne olduğu ile ilgilidir. Bunu aydınlatmak için yaptığımız çalışmada *TK* geninin kodladığı protein yapısı içinde 252. pozisyondaki amino asitin ne olduğuna bakılmıştır. Bu amino asidin izolatlarımızda treonin olduğu gözlenmiş, bundan dolayı ILTV izolatlarının düşük virulensli olduklarına karar verilmiştir. Aynı pozisyondaki amino asitin metiyonin olması bu izolatların yüksek virulense sahip olduğunun bir göstergesidir (Hidalgo, 2003). Tüm *ICP4* ve *TK* gen analiz sonuçlarına bakılarak, genel bir değerlendirme yapıldığında, ülkemizde ILT hastalık vakalarından sorumlu virusların düşük virulensli saha virusu yapısında oldukları anlaşılmaktadır. *ICP4* ve *TK* genlerinin dizilenen bölgelerine göre yapılan filogenetik analizler virulens ve suş orijini hakkında bilgi vermemektedir. Bu analizler sonucunda elde edilen filogenetik ağaçlar incelenen tüm gen bölgelerine bağlı olarak izolatların diğer standart ILTV izolatları ve bazı ülke izolatlarıyla genel genetik yakınlıklarını ortaya koyma açısından bir anlam ifade etmektedir.

ILTV'ye ait *gE*, *gG*, *ICP4*, *TK* gibi farklı gen bölgelerinin PCR-RFLP, PCR ve dizileme yöntemleri ile incelenerek gerçekleştirilen virus identifikasyonu, suş ayrımı veya virusun virulensini belirlemede büyük öneme sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda birçok ülkede ILTV'nin epidemiyolojik durumu belirlenmiştir. Couto ve ark. (de Macedo Couto et al., 2015) Brezilya'daki yumurtacı kümeslerden tespit edilen ILTV'lerin moleküler karakterizasyonunu yapmışlardır. Bunun sonucunda *ICP4* ve *TK* gen bölgelerinin amplifikasyonu ve dizileme işlemi ile salgınlara düşük virulensli saha suşlarının sebep olduğu bulunmuştur. Creelan ve ark. (Creelan et al., 2006) ILTV'nin *ICP4* ve *TK* genlerini hedefleyen rPCR, RFLP ve dizilemeden oluşan hızlı bir diagnostik yöntem geliştirmişlerdir. Bu sayede saha suşlarının hem mutant olmayan (vahşi tip: wild type) hem de aşı orijinli olabileceğini göstermişlerdir. Aynı zamanda *TK* genini de inceleyen araştırmacılar aminoasit pozisyonu 252'de treonin varlığı nedeniyle incelenen suşların düşük virulensli olduğu sonucuna varmışlardır. Neff, Sudler, & Hoop (2008) sekiz farklı Batı Avrupa ülkesinden 35 yıl boyunca akut salgınlardan toplanan 104 saha izolatının benzerliklerini incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre bütün izolatların

TK geni açısından oldukça yüksek genetik benzerlik gösterdiği ve saha izolatlarının çoğunlukla (%94,23) aşı suşlarına yakın olduğu belirlenmiştir.

Gulacti et al. (2007) 2003 yılında Elazığ'da yumurtacı bir kümeşte, Yavuz et al. (2018) 2014 yılında Orta Anadolu bölgesindeki yumurtacı kümeslerde ILTV varlığını bildirmişlerdir. Özdemir (2007) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, farklı illerdeki broyler ve yumurtacı kümeslerden alınan toplam 96 örnekte PCR ve ELISA yöntemleri kullanarak virus prevalansı incelenmiş olup broylerlerden alınan 44 örneğin üçünün; yumurtacılarından alınan 52 örneğin ise 11'inin ILTV pozitif olduğu gözlenmiştir. Kaya & Akan (2018) ise yaptıkları çalışmayla Türkiye'de broyler damızlıklardaki ilk ILTV tespitini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu tespiti PCR ve dizileme yöntemleriyle gerçekleştirmişlerdir. Çalışmamızdaki veriler göz önüne alındığında, ülkemizde önceden yapılan çalışmalarla benzer bir tablonun olduğu ve ILTV'nin hem yumurtacı hem de broyler kümeslerde göz ardı edilemeyecek bir frekansa sahip olduğu gözlenmiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde klinik solunum yolu semptomu gösteren vakalardan izole ettiğimiz ILTV'ler daha önceden enfekte olmuş tavuklarda bulaş kaynaklı viruslar olarak değerlendirilebilir. Bu açıdan hastalıkla ilgili bölgesel izleme programları, karantina tedbirleri, altlıkların taşınmasının engellenmesi ve hayvan hareketlerinin kısıtlanması gibi genel biyogüvenlik önlemleri yanısıra iyi düşünülmüş aşılama stratejileri ile Türkiye'de ILTV salgınlarının ilerlemesinin veya yayılmasının önüne geçilebileceği düşüncesindeyiz.

Çalışma bütünüyle ele alındığında aşağıdaki temel sonuçlar elde edilmiştir:

1. Çalışmamızda, solunum yolu enfeksiyonuna sebep olan prevalansı en yüksek virus IBV olarak saptanmıştır. Aşılamaya rağmen görülme sıklığının yüksek olması sahadaki IBV varyantlarının düzenli olarak takip edilmesinin ve saha suşuna uygun aşılama yapılmasının faydalı olacağını düşündürmektedir.
2. aMPV ve ARV çoğunlukla IBV ile birlikte enfeksiyona sebep olmuştur.
3. ILTV tespit edilen kümeslerde çoklu enfeksiyon görülmemiştir.
4. IBV'ye ait *SI* gen bölgesi dizileme işlemi sonucunda 4/91 ve IS/1494/06 genotiplerinin varlığı tespit edilmiştir.

5. Çalışmada tespit edilen ILTV'lerin düşük virulensli ve saha kökenli olduğu belirlenmiştir.

Türkiye'de solunum yolu enfeksiyonları ekonomik yönden büyük kayıplara neden olmaktadır. Bu hastalıkların daha yoğun bir şekilde güncel moleküler yöntemlerle araştırılması ve sahada enfeksiyona yol açan varyantların değerlendirilmesinin etkili teşhis ve aşılama stratejilerinin belirlenmesinde çok önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abro, S. (2013). *Molecular Characterization and Detection of Infectious Bronchitis Virus*. [Doctoral dissertation, Swedish University of Agricultural Sciences].
- Abro, S. H., Renström, L. H., Ullman, K., Isaksson, M., Zohari, S., Jansson, D. S., ... & Baule, C. (2012). Emergence of novel strains of avian infectious bronchitis virus in Sweden. *Veterinary microbiology*, 155(2-4), 237-246. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.09.022.
- Akalın, N., & Ergün, A. (1995). Detection of antibodies against reo and adenoviruses in serum from chicks with growth retardation syndrome. *Bornova Vet Kont ve Araşt Enst Müd Derg*, 19(33), 109-116.
- Akan, M., İzgür, M., & Sareyyüpoğlu, B. (2007). Tavuklarda infeksiyöz bronşitisin polimeraz zincir reaksiyonu ve floresan antikör tekniği ile teşhisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 54, 47-54.
- Al Afaleq, A., & Jones, R. (1991). A trypsin-sensitive avian reovirus: Isolation and experimental infection of poult and chicks. *Avian pathology*, 20(1), 5-16.
- Alexander, D., & Collins, M. (1975). Effect of pH on the growth and cytopathogenicity of avian infectious bronchitis virus in chick kidney cells. *Archives of virology*, 49(4), 339-348.
- Alexander, H. S., & Nagy, É. (1997). Polymerase chain reaction to detect infectious laryngotracheitis virus in conjunctival swabs from experimentally infected chickens. *Avian diseases*, 646-653.
- Al-Muffarej, S., Savage, C. E., & Jones, R. (1996). Egg transmission of avian reoviruses in chickens: Comparison of a trypsin-sensitive and a trypsin-resistant strain. *Avian pathology*, 25(3), 469-480.
- Al-Shekaili, T., Baylis, M., & Ganapathy, K. (2015). Molecular detection of infectious bronchitis and avian metapneumoviruses in Oman backyard poultry. *Research in Veterinary Science*, 99(2015), 46-52. DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.12.018.
- Andral, B. C., Louzis, C., Trap, D., Newman, J. A., Toquin, D., & Bennejean, G. (1985). Respiratory disease (rhinotracheitis) in turkeys in Brittany, France, 1981–1982. I. Field observation and serology. *Avian diseases*, 29, 35-42.
- Andreopoulou, M., Franzo, G., Tucciarone, C. M., Prentza, Z., Koutoulis, K. C., Cecchinato, M., & Chaligianni, I. (2019). Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus and avian metapneumovirus in Greece. *Poultry Science*, 98(11), 5374-5384. DOI: 10.3382/ps/pez360.
- Anon, K. (1985). Turkey rhinotracheitis of unknown aetiology in England and Wales. *Veterinary Record*, 117, 653-654.
- Aral, E. M. (2016). *Türkiye’de İnfeksiyöz Bronşitis Viruslarının RT-PCR ile Saptanması ve Moleküler Karakterizasyonu*. [Yayınlanmış doktora tezi, Ankara Üniversitesi]

- Armstrong, W. (1959). A slide smear technique for the diagnosis of laryngotracheitis. *Avian diseases*, 3(1), 80-84.
- Awad, F., Baylis, M., & Ganapathy, K. (2014). Detection of variant infectious bronchitis viruses in broiler flocks in Libya. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 2(1), 78-82. DOI: 10.1016/j.ijvsm.2014.01.001.
- Aydın, N., Akan, M., & Erdeğer, J. (1993). Ankara ve çevresinde swollen head syndrome (şişkin baş sendromu) olguları üzerine bir çalışma. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 7, 24-33.
- Aydın, S. B., & Nural, E. (2017). A Serological Investigation of Avian Reovirus Infections in Poultry Enterprises in Balıkesir and Bolu Provinces in Turkey. *Van Veterinary Journal*, 28(1), 47-52.
- Bächi, T., & Howe, C. (1973). Morphogenesis and ultrastructure of respiratory syncytial virus. *Journal of virology*, 12(5), 1173-1180.
- Bagust, T. (1986). Laryngotracheitis (gallid-1) herpesvirus infection in the chicken 4. latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus. *Avian pathology*, 15(3), 581-595.
- Bande, F., Arshad, S. S., Omar, A. R., Bejo, M. H., Abubakar, M. S., & Abba, Y. (2016). Pathogenesis and diagnostic approaches of avian infectious bronchitis. *Advances in virology*, 2016, Article ID 4621659. DOI: 10.1155/2016/4621659.
- Baxter-Jones, C., Wilding, G., & Grant, M. (1986). Immunofluorescence as a potential diagnostic method for turkey rhinotracheitis. *Veterinary Record*, 119(24), 600-601.
- Bäyon-Auboyer, M., Jestin, V., Toquin, D., Cherbonnel, M., & Eterradossi, N. (1999). Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. *Archives of virology*, 144(6), 1091-1109.
- Bayraktar, E., Umar, S., Yılmaz, A., Turan, N., Franzo, G., Tucciarone, C. M., ... & Yılmaz, H. (2018). First Molecular Characterization of Avian Metapneumovirus (aMPV) in Turkish Broiler Flocks. *Avian diseases*, 62(4), 425-430. DOI: 10.1637/11915-061818-ResNote.1.
- Beaudette, F. (1937). Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 90, 51-60.
- Benavente, J., & Martínez-Costas, J. (2007). Avian reovirus: structure and biology. *Virus research*, 123(2), 105-119. DOI: 10.1016/j.virusres.2006.09.005.
- Benton, W., Cover, M., & Greene, L. (1958). The clinical and serological response of chickens to certain laryngotracheitis viruses. *Avian diseases*, 2(4), 383-396.
- Bijlenga, G., Cook, J. K., Gelb Jr., Jack, & de Wit, J. (2004). Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. *Avian pathology*, 33(6), 550-557. DOI: 10.1080/03079450400013154.
- Bochkov, Y. A., Batchenko, G. V., Shcherbakova, L. O., Borisov, A. V., & Drygin, V. V. (2006). Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. *Avian pathology*, 35(5), 379-393. DOI: 10.1080/03079450600921008.

- Bodelón, G., Labrada, L., Martínez-Costas, J., & Benavente, J. (2001). The avian reovirus genome segment S1 is a functionally tricistronic gene that expresses one structural and two nonstructural proteins in infected cells. *Virology*, 290(2), 181-191. DOI: 10.1006/viro.2001.1159.
- Bradbury, J. M., & Garuti, A. (1978). Dual infection with *Mycoplasma synoviae* and a tenosynovitis-inducing reovirus in chickens. *Avian pathology*, 7(3), 407-419.
- Brandly, C., & Bushnell, L. (1934). A report of some investigations of infectious laryngotracheitis. *Poultry Science*, 13(4), 212-217.
- Braune, M., & Gentry, R. (1965). Standardization of the fluorescent antibody technique for the detection of avian respiratory viruses. *Avian diseases*, 9(4), 535-545.
- Broor, S., & Bharaj, P. (2007). Avian and human metapneumovirus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1102(1), 66-85. DOI: 10.1196/annals.1408.005.
- Buys, S. (1980). A preliminary report on the isolation of a virus causing sinusitis in turkeys in South Africa and attempts to attenuate the virus. *Turkeys*, 28, 36.
- Buys, S., Du Preez, J., & Els, H. (1989a). Swollen head syndrome in chickens: a preliminary report on the isolation of a possible aetiological agent. *Journal of the South African Veterinary Association*, 60(4), 221-222. DOI: 10520/AJA00382809_1283.
- Buys, S., Du Preez, J., & Els, H. (1989b). The isolation and attenuation of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res*, 56, 87-98.
- Cadman, H. F., Kelly, P. J., Zhou, R., Davelaar, F., & Mason, P. R. (1994). A serosurvey using enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against poultry pathogens in ostriches (*Struthio camelus*) from Zimbabwe. *Avian diseases*, 621-625.
- Callison, S. A., Hilt, D. A., Boynton, T. O., Sample, B. F., Robison, R., Swayne, D. E., & Jackwood, M. W. (2006). Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *Journal of virological methods*, 138(1-2), 60-65. DOI: 10.1016/j.jviromet.2006.07.018.
- Catelli, E., Cook, J., Chesher, J., Orbell, S., Woods, M., Baxendale, W., & Huggins, M. (1998). The use of virus isolation, histopathology and immunoperoxidase techniques to study the dissemination of a chicken isolate of avian pneumovirus in chickens. *Avian pathology*, 27(6), 632-640.
- Cavanagh, D. (2001). A nomenclature for avian coronavirus isolates and the question of species status. *Avian pathology*, 30(2), 109-115. DOI: 10.1080/03079450120044506.
- Cavanagh, D. (2005). Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian pathology*, 34(6), 439-448. DOI: 10.1080/03079450500367682.
- Cavanagh, D. (2007). Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Veterinary research*, 38(2), 281-297. DOI: 10.1051/vetres:2006055.
- Cavanagh, D., & Barrett, T. (1988). Pneumovirus-like characteristics of the mRNA and proteins of turkey rhinotracheitis virus. *Virus research*, 11(3), 241-256.

- Cavanagh, D., Davis, P., Cook, J. K., Li, D., Kant, A., & Koch, G. (1992). Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian pathology*, 21(1), 33-43.
- Cavanagh, D., Elus, M., & Cook, J. (1997). Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian pathology*, 26(1), 63-74.
- Cavanagh, D., & Gelb Jr, J. (2008). *Infectious Bronchitis: Diseases of Poultry*, 12 ed., pp. 117-135, Ames, Iowa, ABD, Blackwell Publishing.
- Cavanagh, D., Mawditt, K., Britton, P., & Naylor, C. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian pathology*, 28(6), 593-605.
- Cavanagh, D., & Naqi, S. (2003). *Infectious Bronchitis: Diseases of Poultry*, 11 ed., pp. 101-119, Ames, Iowa, ABD, Iowa State University Press.
- Cecchinato, M., Ferreira, H. L., Munir, M., & Catelli, E. (2016). *Avian Metapneumovirus: Mononegaviruses of Veterinary Importance, Molecular Epidemiology and Control*, pp. 127-143, Oxfordshire, UK, CABI.
- Cecchinato, M., Lupini, C., Munoz Pogoreltseva, O. S., Listorti, V., Mondin, A., Drigo, M., & Catelli, E. (2013). Development of a real-time RT-PCR assay for the simultaneous identification, quantitation and differentiation of avian metapneumovirus subtypes A and B. *Avian pathology*, 42(3), 283-289. DOI: 10.1080/03079457.2013.788130.
- Chacón, J., Assayag Jr, M., Revolledo, L., Astolfi-Ferreira, C., Vejarano, M., Jones, R., & Piantino Ferreira, A. (2014). Pathogenicity and molecular characteristics of infectious bronchitis virus (IBV) strains isolated from broilers showing diarrhoea and respiratory disease. *British poultry science*, 55(3), 271-283. DOI: 10.1080/00071668.2014.903558.
- Chacón, J. L., & Ferreira, A. J. P. (2009). Differentiation of field isolates and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus by DNA sequencing. *Vaccine*, 27(48), 6731-6738. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.08.083.
- Chacon, J. L., Mizuma, M. Y., & Piantino Ferreira, A. J. (2010). Characterization by restriction fragment length polymorphism and sequence analysis of field and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus involved in severe outbreaks. *Avian pathology*, 39(6), 425-433. DOI: 10.1080/03079457.2010.516386.
- Chang, P.-C., Lee, Y.-L., Shien, J.-H., & Shieh, H. K. (1997). Rapid differentiation of vaccine strains and field isolates of infectious laryngotracheitis virus by restriction fragment length polymorphism of PCR products. *Journal of virological methods*, 66(2), 179-186.
- Chang, P., Yates, V., Dardiri, A., & Fry, D. (1960). Some observations of the propagation of infectious laryngotracheitis virus in tissue culture. *Avian diseases*, 4(4), 384-390.
- Chary, P., Rautenschlein, S., Njenga, M., & Sharma, J. M. (2002a). Pathogenic and immunosuppressive effects of avian pneumovirus in turkeys. *Avian diseases*, 46(1), 153-161. DOI: 10.1637/0005-2086(2002)046[0153:PAIEOA]2.0.CO;2.

- Chary, P., Rautenschlein, S., & Sharma, J. M. (2002b). Reduced efficacy of hemorrhagic enteritis virus vaccine in turkeys exposed to avian pneumovirus. *Avian diseases*, 46(2), 353-359. DOI: 10.1637/0005-2086(2002)046[0353:REOHEV]2.0.CO;2.
- Clubbe, J., & Naylor, C. J. (2011). Avian metapneumovirus M2: 2 protein inhibits replication in Vero cells: modification facilitates live vaccine development. *Vaccine*, 29(51), 9493-9498. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.10.024.
- Collins, M., & Gough, R. (1988). Characterization of a virus associated with turkey rhinotracheitis. *Journal of general Virology*, 69(4), 909-916.
- Cook, J. (2000a). Avian pneumovirus infections of turkeys and chickens. *The Veterinary Journal*, 160(2), 118-125. DOI: 10.1053/tvjl.2000.0486.
- Cook, J. (2000b). Avian rhinotracheitis. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 19(2), 602-607.
- Cook, J., Chesher, J., Baxendale, W., Greenwood, N., Huggins, M., & Orbell, S. (2001). Protection of chickens against renal damage caused by a nephropathogenic infectious bronchitis virus. *Avian pathology*, 30(4), 423-426. DOI: 10.1080/03079450120066421.
- Cook, J., Huggins, M., Orbell, S., Mawditt, K., & Cavanagh, D. (2001). Infectious bronchitis virus vaccine interferes with the replication of avian pneumovirus vaccine in domestic fowl. *Avian pathology*, 30(3), 233-242. DOI: 10.1080/03079450120054640.
- Cook, J. K., & Cavanagh, D. (2002). Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). *Avian pathology*, 31(2), 117-132. DOI: 10.1080/03079450120118603.
- Cook, J. K., Ellis, M. M., Dolby, C. A., Holmes, H. C., Finney, P. M., & Huggins, M. B. (1989). A live attenuated turkey rhinotracheitis virus vaccine. 1. Stability of the attenuated strain. *Avian pathology*, 18(3), 511-522.
- Cook, J. K., Jackwood, M., & Jones, R. (2012). The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian pathology*, 41(3), 239-250. DOI: 10.1080/03079457.2012.680432.
- Coppo, M. J., Noormohammadi, A. H., Browning, G. F., & Devlin, J. M. (2013). Challenges and recent advancements in infectious laryngotracheitis virus vaccines. *Avian pathology*, 42(3), 195-205. DOI: 10.1080/03079457.2013.800634.
- Cover, M. S. (1996). The early history of infectious laryngotracheitis. *Avian diseases*, 40(3), 494-500.
- Cover, M. S., & Benton, W. (1958). The biological variation of the infectious laryngotracheitis virus. *Avian diseases*, 2(4), 375-383.
- Crawshaw, G. J., & Boycott, B. R. (1982). Infectious laryngotracheitis in peafowl and pheasants. *Avian diseases*, 397-401.
- Creelan, J. L., Calvert, V. M., Graham, D. A., & McCullough, S. J. (2006). Rapid detection and characterization from field cases of infectious laryngotracheitis virus by real-time polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Avian pathology*, 35(02), 173-179. DOI: 10.1080/03079450600598244.

- Crespo, R., Woolcock, P. R., Chin, R. P., Shivaprasad, H., & García, M. (2007). Comparison of diagnostics techniques in an outbreak of infectious laryngotracheitis from meat chickens. *Avian diseases*, 51(4), 858-862. DOI: 10.1637/7875-011907-REGR1.1.
- Cruickshank, J., Berry, D., & Hay, B. (1963). The fine structure of infectious laryngotracheitis virus. *Virology*, 20(2), 376-378.
- Çarlı, K., Şen, A., Ülgen, M., & Kahraman, M. (1992). Detection of anti-reovirus precipitating antibodies in serum of broiler breeders in Bursa province. *Uludağ Üniv Vet Fak Derg*, 11, 161-164.
- Çelebi, M. (2009). *Yeni bir İnfeksiyöz Bronşitis Virusü olan 4/91 (793B)'in Ege Bölgesinde varlığının ortaya konulması*. [Yayınlanmış yüksek lisans tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü] Erişim merkezi <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>.
- Çokal, Y., & Şen, A. (2003). Serological and microbiological investigation on turkey rhinotracheitis virus (TRTV) infection of chickens and turkeys. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27(1), 61-74.
- Çöven, F., & Çarlı, K. (1997). Isolation of reovirus, adenovirus and newcastle disease virus from gumboro outbreaks. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 28, 153-161.
- Çöven, F., Ergün, A., Orhan, G., Karaçalı, S., & Deveci, R. (1994). İzmir ve Bursa bölgesinde infeksiyöz bronşitis olaylarının araştırılması ve izolasyon çalışmaları. *Hayvan Aşılıları Kontrol Merkezi Mdr Derg*, 18, 32.
- de Graaf, M., Herfst, S., Aarbiou, J., Burgers, P. C., Zaaraoui-Boutahar, F., Bijl, M., ... & Andeweg, A. C. (2013). Small hydrophobic protein of human metapneumovirus does not affect virus replication and host gene expression in vitro. *PloS one*, 8(3), e58572. DOI: 10.1371/journal.pone.0058572.
- de Macedo Couto, R., Preis, I. S., Braga, J. F. V., Brasil, B. S., Drummond, M. G., da Silva Martins, N. R., & Ecco, R. (2015). Molecular characterization of infectious laryngotracheitis virus in naturally infected egg layer chickens in a multi-age flock in Brazil. *Archives of virology*, 160(1), 241-252. DOI: 10.1007/s00705-014-2273-2.
- de Wit, J. (2000). Detection of infectious bronchitis virus. *Avian pathology*, 29(2), 71-93. DOI: 10.1080/03079450094108.
- de Wit, J., Cazaban, C., Dijkman, R., Ramon, G., & Gardin, Y. (2018). Detection of different genotypes of infectious bronchitis virus and of infectious bursal disease virus in European broilers during an epidemiological study in 2013 and the consequences for the diagnostic approach. *Avian pathology*, 47(2), 140-151. DOI: 10.1080/03079457.2017.1387231.
- de Wit, J., Cook, J. K., & Van der Heijden, H. M. (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian pathology*, 40(3), 223-235. DOI: 10.1080/03079457.2011.566260.
- Demiröz, K., Altınöz, C., & Alp, A. (1989). Marmara bölgesinde IB infeksiyonunun HI testi ile saptanması ve etkenin serotiplerinin belirlenmesi. *Pendik Hay Hast Merk Arast Ens Derg*, 2, 65-67.

- Dobson, K., & Glisson, J. (1992). Economic impact of a documented case of reovirus infection in broiler breeders. *Avian diseases*, 788-791.
- Domingo, E., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J. C., Portela, A., Ortín, J., ... & Nájera, R. (1985). The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance—a review. *Gene*, 40(1), 1-8.
- Dufour-Zavala, L. (2008). Epizootiology of infectious laryngotracheitis and presentation of an industry control program. *Avian diseases*, 52(1), 1-7. DOI: 10.1637/8018-051007-Review.
- Easton, A. J., Domachowske, J. B., & Rosenberg, H. F. (2004). Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), 390-412. DOI: 10.1128/CMR.17.2.390-412.2004.
- Endo-Munoz, L. B. (1990). A western blot to detect antibody to avian reovirus. *Avian pathology*, 19(3), 477-487.
- Eterradossi, N., Toquin, D., Guittet, M., & Bennejean, G. (1995). Evaluation of different turkey rhinotracheitis viruses used as antigens for serological testing following live vaccination and challenge. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 42(1-10), 175-186.
- Fabris, G., & D'aprile, P. (1990). Rinotracheite infettiva del tacchino: osservazioni sul campo ed indagini di laboratorio. *Zootecnica International*, 6, 36-40.
- Fahey, J., & Crawley, J. (1954). Studies on chronic respiratory disease of chickens II. Isolation of a virus. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, 18(1), 13.
- Fischer, F., Stegen, C. F., Masters, P. S., & Samsonoff, W. A. (1998). Analysis of constructed E gene mutants of mouse hepatitis virus confirms a pivotal role for E protein in coronavirus assembly. *Journal of virology*, 72(10), 7885-7894.
- Fuchs, W., Veits, J., Helferich, D., Granzow, H., Teifke, J. P., & Mettenleiter, T. C. (2007). Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. *Veterinary research*, 38(2), 261-279. DOI: 10.1051/vetres:200657.
- Fulton, R., Schrader, D., & Will, M. (2000). Effect of route of vaccination on the prevention of infectious laryngotracheitis in commercial egg-laying chickens. *Avian diseases*, 8-16. DOI: 10.2307/1592502.
- Ganapathy, K., Ball, C., & Forrester, A. (2015). Genotypes of infectious bronchitis viruses circulating in the Middle East between 2009 and 2014. *Virus research*, 210, 198-204. DOI: 10.1016/j.virusres.2015.07.019.
- Ganapathy, K., Bufton, A., Pearson, A., Lemiere, S., & Jones, R. C. (2010). Vaccination of commercial broiler chicks against avian metapneumovirus infection: a comparison of drinking-water, spray and oculo-oral delivery methods. *Vaccine*, 28(23), 3944-3948. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.03.065.
- Ganapathy, K., Wilkins, M., Forrester, A., Lemiere, S., Cserep, T., McMullin, P., & Jones, R. (2012). QX-like infectious bronchitis virus isolated from cases of proventriculitis in commercial broilers in England. *Veterinary Record*, 171(23), 597-597.

- García, M., Spatz, S., & Guy, J. S. (2013). *Infectious Laryngotracheitis: Diseases of Poultry*. 13 ed., pp. 161-179, Ames, Iowa, ABD: John Wiley & Sons, Inc. Publication.
- Gelb Jr, J., Weisman, Y., Ladman, B., & Meir, R. (2005). S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). *Avian pathology*, 34(3), 194-203. DOI: 10.1080/03079450500096539.
- Gelenczei, E., & Marty, E. (1965). Strain stability and immunologic characteristics of a tissue-culture-modified infectious laryngotracheitis virus. *Avian diseases*, 9(1), 44-56.
- Gharaibeh, S., & Algharaibeh, G. (2007). Serological and molecular detection of avian pneumovirus in chickens with respiratory disease in Jordan. *Poultry Science*, 86(8), 1677-1681. DOI: 10.1093/ps/86.8.1677.
- Gholami, F., Karimi, V., Ghalyanchi Langeroudi, A., Hashemzadeh, M., & Vasfi Marandi, M. (2018). Genotyping of Infectious bronchitis viruses isolated from broiler chicken farms in Iran during 2015-2016. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 12(1), 9-17. DOI: 10.22059/ijvm.2017.228730.1004797.
- Giambrone, J., Dormitorio, T., & Lockaby, S. (1992). Coarse-spray immunization of one-day-old broilers against enteric reovirus infections. *Avian diseases*, 364-368.
- Giraud, P., Bennejean, G., Guittet, M., & Toquin, D. (1986). Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. *Veterinary Record*, 119(24), 606-607.
- Godet, M., L'Haridon, R., Vautherot, J.-F., & Laude, H. (1992). TGEV corona virus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology*, 188(2), 666-675.
- Gough, R., Collins, M., Cox, W., & Chettle, N. (1988). Experimental infection of turkeys, chickens, ducks, geese, guinea fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus. *Veterinary Record*, 123(2), 58-59.
- Goyal, S. M., Chiang, S.-J., Dar, A. M., Nagaraja, K. V., Shaw, D. P., Halvorson, D. A., & Kapur, V. (2000). Isolation of avian pneumovirus from an outbreak of respiratory illness in Minnesota turkeys. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 12(2), 166-168. DOI: 10.1177/104063870001200214.
- Griffin, A., & Bournsnel, M. (1990). Analysis of the nucleotide sequence of DNA from the region of the thymidine kinase gene of infectious laryngotracheitis virus; potential evolutionary relationships between the herpesvirus subfamilies. *Journal of general Virology*, 71(4), 841-850.
- Gulacti, I., Eroksuz, Y., Bulut, H., & Ceribasi, A. (2007). Outbreak of clinical infectious laryngotracheitis in Turkey. *Veterinary Record*, 160(16), 554.
- Guo, Z., Giambrone, J., Liu, Z., Dormitorio, T., & Wu, H. (2004). Effect of in ovo administered reovirus vaccines on immune responses of specific-pathogen-free chickens. *Avian diseases*, 48(1), 224-228. DOI: 10.1637/7087.
- Guo, Z., Giambrone, J., Wu, H., & Dormitorio, T. (2003). Safety and efficacy of an experimental reovirus vaccine for in ovo administration. *Avian diseases*, 47(4), 1423-1428. DOI: 10.1637/7009.

- Guy, J. S., Barnes, H. J., & Smith, L. (1991). Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage. *Avian diseases*, 348-355.
- Guy, J. S., & García, M. (2008). *Laryngotracheitis: Diseases of Poultry*, 12 ed., pp. 137-152, Ames, Iowa, ABD: Blackwell Publishing.
- Hafez, H., Emele, J., & Woernle, H. (1990). Turkey rhinotracheitis (TRT): Serological flock profiles and economic parameters and treatment trials using Enrofloxacin (Baytril). *Tieraerztliche Umschau*, 45(2), 111-114.
- Hafez, H., & Woernle, H. (1989). Rhinotracheitis in turkeys-a serological survey. *Tieraerztliche Umschau*, 44(8), 476-480.
- Hamadan, A. M., Ghalyanchilangeroudi, A., Hashemzadeh, M., Hosseini, H., Karimi, V., Yahyaraeyat, R., & Najafi, H. (2017). Genotyping of Avian infectious bronchitis viruses in Iran (2015–2017) reveals domination of IS-1494 like virus. *Virus research*, 240, 101-106. DOI: 10.1016/j.virusres.2017.08.002.
- Han, M. G., & Kim, S. J. (2001). Analysis of Korean strains of infectious laryngotracheitis virus by nucleotide sequences and restriction fragment length polymorphism. *Veterinary microbiology*, 83(4), 321-331. DOI: 10.1016/S0378-1135(01)00423-0.
- Hidalgo, H. (2003). Infectious laryngotracheitis: a review. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 5(3), 157-168. DOI: 10.1590/S1516-635X2003000300001.
- Homayounimehr, A., Pakbin, A., Momayyez, R., & Fatemi, S. M. R. (2016). Detection and identification of infectious bronchitis virus by RT-PCR in Iran. *Tropical animal health and production*, 48(5), 973-978.
- Hosseini, H., Fard, M. H. B., Charkhkar, S., & Morshed, R. (2015). Epidemiology of avian infectious bronchitis virus genotypes in Iran (2010–2014). *Avian diseases*, 59(3), 431-435. DOI: 10.1637/11091-041515-ResNote.1.
- Houta, M. H., Hassan, K. E., Azza, A., Elkady, M. F., Kilany, W. H., Ali, A., & Abdel-Moneim, A. S. (2021). The emergence, evolution and spread of infectious bronchitis virus genotype GI-23. *Archives of virology*, 166, 9-26. DOI: 10.1007/s00705-020-04920-z
- Hu, H., Roth, J. P., Estevez, C. N., Zsak, L., Liu, B., & Yu, Q. (2011). Generation and evaluation of a recombinant Newcastle disease virus expressing the glycoprotein (G) of avian metapneumovirus subgroup C as a bivalent vaccine in turkeys. *Vaccine*, 29(47), 8624-8633. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.09.007.
- Hughes, C., Gaskell, R., Bradbury, J., Jordan, F., & Jones, R. (1991). Survey of field outbreaks of avian infectious laryngotracheitis in England and Wales. *The Veterinary Record*, 129(12), 258-260.
- Hughes, C., Gaskell, R., Jones, R., Bradbury, J., & Jordan, F. (1989). Effects of certain stress factors on the re-excretion of infectious laryngotracheitis virus from latently infected carrier birds. *Research in veterinary science*, 46(2), 274-276.
- Hughes, C. S., & Jones, R. (1988). Comparison of cultural methods for primary isolation of infectious laryngotracheitis virus from field material. *Avian pathology*, 17(2), 295-303.
- Hughes, L. A., Savage, C., Naylor, C., Bennett, M., Chantrey, J., & Jones, R. (2009). Genetically diverse coronaviruses in wild bird populations of northern England.

- Emerging infectious diseases*, 15(7), 1091-1094. DOI: 10.3201/eid1507.090067.
- Humberd, J., García, M., Riblet, S. M., Resurreccion, R., & Brown, T. (2002). Detection of infectious laryngotracheitis virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested polymerase chain reaction. *Avian diseases*, 46(1), 64-74. DOI: 10.1637/0005-2086(2002)046[0064:DOILVI]2.0.CO;2.
- ICTV Taxonomy, (2015a). aMPV. Retrieved from <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> access date 2021, 7 May.
- ICTV Taxonomy (2015b). ILTV. Retrieved from <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> access date 2021, 7 May.
- ICTV Taxonomy (2018a). ARV. Retrieved from <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> access date 2021, 7 May.
- ICTV Taxonomy (2018b). IBV. Retrieved from <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> access date 2021, 7 May.
- Ide, P. (1982). Avian reovirus antibody assay by indirect immunofluorescence using plastic microculture plates. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 46(1), 39.
- İça, T. (2005). Hindi ve tavuklarda avian pneumovirus enfeksiyonlarının indirek floresan antikor testi ve reverse transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu ile teşhisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 52, 179-184.
- Jackwood, M. W. (2012). Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian diseases*, 56(4), 634-641. DOI: 10.1637/10227-043012-Review.1.
- Jackwood, M. W., & de Wit, S. (2013). *Infectious Bronchitis: Diseases of Poultry*, 13 ed., pp. 139-159, Ames, Iowa, ABD: John Wiley & Sons, Inc. Publication.
- Jackwood, M. W., & de Wit, S. (2020). *Infectious Bronchitis: Diseases of Poultry*, 14 ed., pp. 167-188, John Wiley & Sons, Inc. Publication.
- Jackwood, M. W., Hall, D., & Handel, A. (2012). Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(6), 1305-1311. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.05.003.
- Jackwood, M. W., Hilt, D. A., Williams, S. M., Woolcock, P., Cardona, C., & O'Connor, R. (2007). Molecular and serologic characterization, pathogenicity, and protection studies with infectious bronchitis virus field isolates from California. *Avian diseases*, 51(2), 527-533. DOI: 10.1637/0005-2086(2007)51[527:MASCPA]2.0.CO;2.
- Jing, L., Cook, J. K., David, T., Brown, K., Shaw, K., & Cavanagh, D. (1993). Detection of turkey rhinotracheitis virus in turkeys using the polymerase chain reaction. *Avian pathology*, 22(4), 771-783.
- Jirjis, F. F., Noll, S. L., Halvorson, D. A., Nagaraja, K. V., & Shaw, D. P. (2001). Immunohistochemical detection of avian pneumovirus in formalin-fixed tissues. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 13(1), 13-16. DOI: 10.1177/104063870101300103.
- Johnson, D. I., Vagnozzi, A., Dorea, F., Riblet, S. M., Mundt, A., Zavala, G., & García, M. (2010). Protection against infectious laryngotracheitis by in ovo vaccination with commercially available viral vector recombinant vaccines. *Avian diseases*, 54(4), 1251-1259. DOI: 10.1637/9401-052310-Reg.1.

- Johnson, M., Prideaux, C., Kongsuwan, K., Sheppard, M., & Fahey, K. (1991). Gallid herpesvirus 1 (infectious laryngotracheitis virus): cloning and physical maps of the SA-2 strain. *Archives of virology*, 119(3-4), 181-198.
- Johnson, M. A., Tyack, S. G., Prideaux, C., Kongsuwan, K., & Sheppard, M. (1995). Nucleotide sequence of infectious laryngotracheitis virus (gallid herpesvirus 1) ICP4 gene. *Virus research*, 35(2), 193-204.
- Joncas, J., Berthiaume, L., & Pavilanis, V. (1969). The structure of the respiratory syncytial virus. *Virology*, 38(3), 493-496.
- Jones, R. (2000). Avian reovirus infections. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 19(2), 614-619.
- Jones, R., Al-Afaleq, A., Savage, C. E., & Islam, M. (1994). Early pathogenesis in chicks of infection with a trypsin-sensitive avian reovirus. *Avian pathology*, 23(4), 683-692.
- Jones, R., & Georgiou, K. (1984). Reovirus-induced tenosynovitis in chickens the influence of age at infection. *Avian pathology*, 13(3), 441-457.
- Jones, R., & Jordan, F. (1972). Persistence of virus in the tissues and development of the oviduct in the fowl following infection at day old with infectious bronchitis virus. *Research in veterinary science*, 13(1), 52-60.
- Jones, R., & Onunkwo, O. (1978). Studies on experimental tenosynovitis in light hybrid chickens. *Avian pathology*, 7(1), 171-181.
- Jones, R., Williams, R., Baxter-Jones, C., Savage, C., & Wilding, G. (1988). Experimental infection of laying turkeys with rhinotracheitis virus: distribution of virus in the tissues and serological response. *Avian pathology*, 17(4), 841-850.
- Jones, R. C. (2013). *Reovirus Infections: Diseases of Poultry*, 13 ed., pp. 351-373, Ames, Iowa, ABD: John Wiley & Sons, Inc. Publication.
- Jones, R. C., & Rautenschlein, S. (2013). *Avian Metapneumovirus: Diseases of Poultry*, 13 ed., pp. 112-138, Ames, Iowa, ABD: John Wiley & Sons, Inc. Publication.
- Jordan, F. (1964). Diagnosis of infectious laryngotracheitis by chick embryo inoculation. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 74, 119-128.
- Jordan, F. (1966). A review of the literature on infectious laryngotracheitis (ILT). *Avian diseases*, 10(1), 1-26.
- Jordan, F., Evanson, H. M., & Bennett, J. M. (1967). The survival of the virus of infectious laryngotracheitis. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 14(2), 135-150.
- Juhasz, K., & Easton, A. (1994). Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *Journal of general Virology*, 75(11), 2873-2880.
- Jungherr, E. I., Chomiak, T. W., & Luginbuhl, R. E. (1956). Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. *Proc. 60th Annual Meeting U.S. Livestock Sanitary Association.*, 203-209.
- Kahya, S., Coven, F., Temelli, S., Eyigor, A., & Carli, K. T. (2013). Presence of IS/1494/06 genotype-related infectious bronchitis virus in breeder and broiler

- flocks in Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 60(1), 27-31.
- Kant, A., Koch, G., Van Roozelaar, D., Kusters, J., Poelwijk, F., & Van der Zeijst, B. (1992). Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. *Journal of general Virology*, 73(3), 591-596.
- Kapczynski, D. R. (2004). Development of a virosome vaccine against avian metapneumovirus subtype C for protection in turkeys. *Avian diseases*, 48(2), 332-343. DOI: 10.1637/7115.
- Karaca, K., Naqi, S., & Gelb Jr, J. (1992). Production and characterization of monoclonal antibodies to three infectious bronchitis virus serotypes. *Avian diseases*, 903-915.
- Karron, R. A., Buonagurio, D. A., Georgiu, A. F., Whitehead, S. S., Adamus, J. E., Clements-Mann, M. L., ... & Murphy, B. R. (1997). Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 13961-13966.
- Kawamura, H. a., & Tsubahara, H. (1966). Common antigenicity of avian reoviruses. *National Institute of Animal Health Quarterly*, 6(4), 187-193.
- Kaya, İ., & Akan, M. (2018). First report of avian infectious laryngotracheitis infection in broiler breeders in Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 65(3), 331-334.
- Ke, G. M., Cheng, H. L., Ke, L. Y., Ji, W. T., Chulu, J. L., Liao, M. H., ... & Liu, H. J. (2006). Development of a quantitative Light Cycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus. *Journal of virological methods*, 133(1), 6-13. DOI: 10.1016/j.jviromet.2005.09.011.
- Keam, L., York, J. J., Sheppard, M., & Fahey, K. (1991). Detection of infectious laryngotracheitis virus in chickens using a non-radioactive DNA probe. *Avian diseases*, 257-262.
- Keeler Jr, C. L., Hazel, J. W., Hastings, J. E., & Rosenberger, J. K. (1993). Restriction endonuclease analysis of Delmarva field isolates of infectious laryngotracheitis virus. *Avian diseases*, 418-426.
- Kiss, I., Mató, T., Homonnay, Z. G., Kojer, J., Farsang, A., Bálint, Á., & Palya, V. (2015). Survey indicates circulation of 4/91 and QX-type infectious bronchitis viruses in Hungary in 2014. *Acta Veterinaria Hungarica*, 63(3), 382-388. DOI: 10.1556/004.2015.036.
- Kwon, H. M., Jackwood, M. W., & Gelb Jr, J. (1993). Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian diseases*, 37, 194-202.
- Ladman, B. S., Loupos, A. B., & Gelb Jr, J. (2006). Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization. *Avian pathology*, 35(02), 127-133. DOI: 10.1080/03079450600597865.

- Lai, M. M. C., & Cavanagh, D. (1997). The molecular biology of coronaviruses *Advances in virus research*, 48, 1-100. DOI: 10.1016/S0065-3527(08)60286-9.
- Lee, C.-W. (2002). Evolution of avian infectious bronchitis virus: genetic drift and recombination. *Korean Journal of Veterinary Service*, 25(1), 97-103.
- Lee, C.-W., Hilt, D. A., & Jackwood, M. W. (2003). Typing of field isolates of infectious bronchitis virus based on the sequence of the hypervariable region in the S1 gene. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 15(4), 344-348. DOI: 10.1177/104063870301500407.
- Lee, C.-W., & Jackwood, M. W. (2001). Origin and evolution of Georgia 98 (GA98), a new serotype of avian infectious bronchitis virus. *Virus research*, 80(1-2), 33-39. DOI: 10.1016/S0168-1702(01)00345-8.
- Lee, L. H., Shien, J. H., & Shieh, H. K. (1998). Detection of avian reovirus RNA and comparison of a portion of genome segment S3 by polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. *Research in veterinary science*, 65(1), 11-15.
- Lee, S.-W., Markham, P. F., Coppo, M. J., Legione, A. R., Markham, J. F., Noormohammadi, A. H., ... & Devlin, J. M. (2012). Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses. *Science*, 337(6091), 188-188. DOI: 10.1126/science.1217134.
- Li, H., & Yang, H. (2001). Sequence analysis of nephropathogenic infectious bronchitis virus strains of the Massachusetts genotype in Beijing. *Avian pathology*, 30(5), 535-541. DOI: 10.1080/03079450120078734.
- Liman, M., & Rautenschlein, S. (2007). Induction of local and systemic immune reactions following infection of turkeys with avian Metapneumovirus (aMPV) subtypes A and B. *Veterinary immunology and immunopathology*, 115(3-4), 273-285. DOI: 10.1016/j.vetimm.2006.12.001.
- Linares, J., Bickford, A., Cooper, G., Charlton, B., & Woolcock, P. (1994). An outbreak of infectious laryngotracheitis in California broilers. *Avian diseases*, 188-192.
- Ling, R., Easton, A., & Pringle, C. (1992). Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses. *Journal of general Virology*, 73(7), 1709-1715.
- Lister, S. A. (1998). Current experiences with respiratory diseases in meat turkeys in the UK. In proceeding: 1st international symposium on turkey diseases. Berlin, Germany, (pp. 104-113).
- Liu, H. J., Chen, J. H., Liao, M. H., Lin, M. Y., & Chang, G. N. (1999). Identification of the σ C-encoded gene of avian reovirus by nested PCR and restriction endonuclease analysis. *Journal of virological methods*, 81(1-2), 83-90.
- Liu, H. J., & Giambrone, J. J. (1997a). Characterization of a nonradioactive cloned cDNA probe for detecting avian reoviruses. *Avian diseases*, 374-378.
- Liu, H. J., & Giambrone, J. J. (1997b). In situ detection of reovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded chicken tissues using a digoxigenin-labeled cDNA probe. *Avian diseases*, 447-451.
- Liu, S., Zhang, Q., Chen, J., Han, Z., Liu, X., Feng, L., ... & Tong, G. (2006). Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China

- between 1995 and 2004. *Archives of virology*, 151(6), 1133-1148. DOI: 10.1007/s00705-005-0695-6.
- Lu, H., Tang, Y., Dunn, P. A., Wallner-Pendleton, E. A., Lin, L., & Knoll, E. A. (2015). Isolation and molecular characterization of newly emerging avian reovirus variants and novel strains in Pennsylvania, USA, 2011–2014. *Scientific reports*, 5(1), Article number: 14727.
- Lwamba, H. C., Alvarez, R., Wise, M. G., Yu, Q., Halvorson, D., Njenga, M. K., & Seal, B. S. (2005). Comparison of the full-length genome sequence of avian metapneumovirus subtype C with other paramyxoviruses. *Virus research*, 107(1), 83-92. DOI: 10.1016/j.virusres.2004.07.002.
- Mahmood, Z. H., Sleman, R. R., & Uthman, A. U. (2011). Isolation and molecular characterization of Sul/01/09 avian infectious bronchitis virus, indicates the emergence of a new genotype in the Middle East. *Veterinary microbiology*, 150(1-2), 21-27. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.12.015.
- Majo, N., Allan, G., O'loan, C., Pages, A., & Ramis, A. (1995). A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chickens, turkey poults, and broiler breeders experimentally infected with turkey rhinotracheitis virus. *Avian diseases*, 887-896.
- Martínez-Costas, J., Grande, A., Varela, R., García-Martínez, C., & Benavente, J. (1997). Protein architecture of avian reovirus S1133 and identification of the cell attachment protein. *Journal of virology*, 71(1), 59-64.
- Martinez-Costas, J., Varela, R., & Benavente, J. (1995). Endogenous enzymatic activities of the avian reovirus S1133: identification of the viral capping enzyme. *Virology*, 206(2), 1017-1026.
- May, H. G., & Tittsler, R. P. (1925). Tracheo-laryngitis in poultry. *J. Am. Vet. Med. Assoc*, 67, 229-231.
- McDougall, J., & Cook, J. (1986). Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations. *Veterinary Record*, 118(8), 206-207.
- McKinley, E. T., Hilt, D. A., & Jackwood, M. W. (2008). Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. *Vaccine*, 26(10), 1274-1284. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.01.006.
- McNeilly, F., Smyth, J., Adair, B., & McNulty, M. (1995). Synergism between chicken anemia virus (CAV) and avian reovirus following dual infection of 1-day-old chicks by a natural route. *Avian diseases*, 532-537.
- McNulty, M., Allan, G., & McCracken, R. (1985). Infectious laryngotracheitis in Ireland. *Irish Veterinary Journal*, 39(8), 124-125.
- Meir, R., Rosenblut, E., Perl, S., Kass, N., Ayali, G., Hemsani, E., & Perk, S. (2004). Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. *Avian diseases*, 48(3), 635-641. DOI: 10.1637/7107.
- Menendez, N., Calnek, B., & Cowen, B. (1975). Localization of avian reovirus (FDO isolant) in tissues of mature chickens. *Avian diseases*, 112-117.
- Meulemans, G., Carlier, M., Gonze, M., Petit, P., & Vandebroek, M. (1987). Incidence, characterisation and prophylaxis of nephropathogenic avian infectious bronchitis viruses. *Veterinary Record*, 120(9), 205-206.

- Montassier, H. J. (2010). Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 12(2), 87-96. DOI: 10.1590/S1516-635X2010000200003.
- Moradian, A., Thorsen, J., & Julian, R. (1990). Single and combined infections of specific-pathogen-free chickens with infectious bursal disease virus and an intestinal isolate of reovirus. *Avian diseases*, 63-72.
- Moya, A., Holmes, E. C., & González-Candelas, F. (2004). The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 2(4), 279-288.
- Mutlu, O., & Yiğit, A. (1997). Identification and serological comparison of various reovirus strains isolated from chickens suspected of having hunting syndrome in Turkey. *Bornova Vet Kont Araşt Enst Müd Derg*, 22(36), 85-98.
- Najafi, H., Langeroudi, A. G., Hashemzadeh, M., Karimi, V., Madadgar, O., Ghafouri, S. A., ... & Farahani, R. K. (2016). Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler chicken farms in Iran, 2014-2015. *Archives of virology*, 161(1), 53-62. DOI: 10.1007/s00705-015-2636-3.
- Naylor, C. J., Brown, P. A., Edworthy, N., Ling, R., Jones, R. C., Savage, C. E., & Easton, A. J. (2004). Development of a reverse-genetics system for Avian pneumovirus demonstrates that the small hydrophobic (SH) and attachment (G) genes are not essential for virus viability. *Journal of general Virology*, 85(11), 3219-3227. DOI: 10.1099/vir.0.80229-0.
- Neff, C., Sudler, C., & Hoop, R. (2008). Characterization of western European field isolates and vaccine strains of avian infectious laryngotracheitis virus by restriction fragment length polymorphism and sequence analysis. *Avian diseases*, 52(2), 278-283. DOI: 10.1637/8168-110107-Reg.1.
- Neighbor, N., Newberry, L., Bayyari, G., Skeeles, J., Beasley, J., & McNew, R. (1994). The effect of microaerosolized hydrogen peroxide on bacterial and viral poultry pathogens. *Poultry Science*, 73(10), 1511-1516.
- Nibert, M. L., & Schiff, L. A. (2001). *Reoviruses and their replication: Fields Virology*, 4 ed., pp. 1679–1728, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Nural, E., & Şengül, S. S. (2012). Seroprevalence of avian reovirus infections in chickens in western provinces of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18(4), 653-656. DOI: 10.9775/kvfd.2012.6171.
- OIE. (2018a). *Avian Infectious Bronchitis: Terrestrial Manual*, Chapter 3.3.2. pp. 796-809.
- OIE. (2018b). *Avian Infectious Laryngotracheitis: Terrestrial Manual*, Chapter 3.3.3, pp. 810-820.
- OIE. (2018c). *Avian Influenza (Infection with Avian Influenza Viruses): Terrestrial Manual*, Chapter 3.3.4, pp. 821-843.
- OIE. (2018d). *Newcastle Disease (Infection with Newcastle Disease Virus): Terrestrial Manual*, Chapter 3.3.14, pp. 964-983.
- OIE. (2018e). *Turkey Rhinotracheitis (avian metapneumovirus infections): Terrestrial Manual*, Chapter 3.3.15, pp. 984-997.
- Ojkic, D., Swinton, J., Vallieres, M., Martin, E., Shapiro, J., Sanei, B., & Binnington, B. (2006). Characterization of field isolates of infectious laryngotracheitis virus

- from Ontario. *Avian pathology*, 35(4), 286-292. DOI: 10.1080/03079450600815481.
- Oldoni, I., & García, M. (2007). Characterization of infectious laryngotracheitis virus isolates from the US by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of multiple genome regions. *Avian pathology*, 36(2), 167-176. DOI: 10.1080/03079450701216654.
- Olson, N., & Kerr, K. (1966). Some characteristics of an avian arthritis viral agent. *Avian diseases*, 10(4), 470-476.
- Olson, N., & Weiss, R. (1972). Similarity between arthritis virus and Fahey-Crawley virus. *Avian diseases*, 535-540.
- Onen, E. (2011). *Tavuklarda İnfeksiyöz Bronşitis Virus (IBV) suşlarının Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) kullanılarak araştırılması*. [Yayınlanmış doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü] Erişim merkezi <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>.
- Ongor, H., Karahan, M., Kalin, R., Bulut, H., & Cetinkaya, B. (2010). Detection of avian metapneumovirus subtypes in turkeys using RT-PCR. *Veterinary Record*, 166(12), 363-366. DOI: 10.1136/vr.c1607.
- Özdemir, D. (2007). *Kanatlılarda Infectious Laryngotracheitis (ILT) Hastalığı Etkeninin PCR ve ELISA ile saptanması*. [Yayınlanmış doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü] Erişim merkezi <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>.
- Öztürk, G., & Çöven, F. (1997). Broilerlerde infeksiyöz bursal hastalığı (IBD), reovirus infeksiyonu ve bursal cryptosporidiosis. *Fırat Üniv Sağ Bil Derg Vet*, 11(2), 341-349.
- Panigrahy, B., Senne, D. A., Pedersen, J. C., Gidlewski, T., & Edson, R. K. (2000). Experimental and serologic observations on avian pneumovirus (APV/turkey/Colorado/97) infection in turkeys. *Avian diseases*, 44(1), 17-22. DOI: 10.2307/1592503.
- Petek, M., Felluga, B., Borghi, G., & Baroni, A. (1967). The Crawley agent: an avian reovirus. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 21(3-4), 413-424.
- Picault, J., Giraud, P., Drouin, P., Guittet, M., Bennejean, G., Lamande, J., ... & Gueguen, C. (1987). Isolation of a TRTV-like virus from chickens with swollen-head syndrome. *Veterinary Record*, 121(6).
- Pirozok, R., Helmboldt, C., & Jungherr, E. (1957). A rapid histological technique for the diagnosis of infectious avian laryngotracheitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 130(9), 406.
- Qingzhong, Y., Barrett, T., Brown, T. D. K., Cook, J. K., Green, P., Skinner, M. A., & Cavanagh, D. (1994). Protection against turkey rhinotracheitis pneumovirus (TRTV) induced by a fowlpox virus recombinant expressing the TRTV fusion glycoprotein (F). *Vaccine*, 12(6), 569-573.
- Rabenau, H., Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Preiser, W., & Doerr, H. (2005). Stability and inactivation of SARS coronavirus. *Medical microbiology and immunology*, 194(1-2), 1-6.
- Rosenberger, J.K. (2003). *Reovirus infections: Diseases of Poultry*, Ames: Iowa State University Press 11: 283-298.

- Rosenberger, J. K., & Olson, N. O. (1997). *Viral arthritis: Diseases of Poultry*, 10 ed., pp. 711-718, Ames, Iowa, ABD.
- Ruano, M., El-Attrache, J., & Villegas, P. (2000). A rapid-plate hemagglutination assay for the detection of infectious bronchitis virus. *Avian diseases*, 44(1) 99-104. DOI: 10.2307/1592512.
- Saadat, Y., Fard, M. H. B., Charkhkar, S., Hosseini, H., Shaikhi, N., & Akbarpour, B. (2017). Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler flocks in Bushehr province, Iran: 2014-2015. *Veterinary Research Forum*, 8(3), 195-201.
- Samberg, Y., Cuperstein, E., Bendheim, U., & Aronovici, I. (1971). The development of a vaccine against avian infectious laryngotracheitis IV. Immunization of chickens with a modified laryngotracheitis vaccine in the drinking water. *Avian diseases*, 413-417.
- Schalk, A. F., & Hawn, M. C. (1931). An apparent new respiratory disease of baby chicks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 78, 413-422.
- Schnitzer, T. J., Ramos, T., & Gouvea, V. (1982). Avian reovirus polypeptides: analysis of intracellular virus-specified products, virions, top component, and cores. *Journal of virology*, 43(3), 1006-1014.
- Seal, B. S., Sellers, H. S., & Meinersmann, R. J. (2000). Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates. *Virus research*, 66(2), 139-147. DOI: 10.1016/S0168-1702(99)00133-1.
- Seddon, H. (1935). The occurrence of infectious laryngo-tracheitis in fowls in New South Wales. *Australian Veterinary Journal*, 11, 212-223.
- Seger, W., GhalyanchiLangeroudi, A., Karimi, V., Madadgar, O., Marandi, M. V., & Hashemzadeh, M. (2016). Genotyping of infectious bronchitis viruses from broiler farms in Iraq during 2014-2015. *Archives of virology*, 161(5), 1229-1237. DOI: 10.1007/s00705-016-2790-2.
- Sellers, H. S., Garcia, M., Glisson, J. R., Brown, T. P., Sander, J. S., & Guy, J. S. (2004). Mild infectious laryngotracheitis in broilers in the southeast. *Avian diseases*, 48(2), 430-436. DOI: 10.1637/7129.
- Shibley, G., Luginbuhl, R., & Helmboldt, C. (1962). A study of infectious laryngotracheitis virus. I. Comparison of serologic and immunogenic properties. *Avian diseases*, 6(1), 59-71.
- Shmulevitz, M., Yameen, Z., Dawe, S., Shou, J., O'Hara, D., Holmes, I., & Duncan, R. (2002). Sequential partially overlapping gene arrangement in the tricistronic S1 genome segments of avian reovirus and Nelson Bay reovirus: implications for translation initiation. *Journal of virology*, 76(2), 609-618. DOI: 10.1128/JVI.76.2.609-618.2002.
- Silim, A., & Venne, D. (1989). Comparison of egg-yolk and serum antibody titers to four avian viruses by enzyme-linked immunosorbent assay using paired field samples. *Avian diseases*, 643-648.
- Sinkovic, B., & Hunt, S. (1968). Vaccination of day-old chickens against infectious laryngotracheitis by conjunctival instillation. *Australian Veterinary Journal*, 44(2), 55-57.

- Slaght, S. S., Yang, T. J., van der Heide, L., & Fredrickson T. N. (1978). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting chicken anti-reovirus antibody at high sensitivity. *Avian Diseases*, 22(4), 802-805. DOI: 10.2307/1589661.
- Spandidos, D. a., & Graham, A. (1976). Physical and chemical characterization of an avian reovirus. *Journal of virology*, 19(3), 968-976.
- Sterner, F., Rosenberger, J., Margolin, A., & Ruff, M. (1989). In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. II. Clinical evaluation of chickens infected with two avian reovirus pathotypes. *Avian diseases*, 545-554.
- Stuart, J. (1989). Turkey rhinotracheitis (TRT) in Great Britain. Poultry Science Symposium.
- Subramanyam, P., & Pomeroy, B. (1960). Studies on the Fahey-Crawley virus. *Avian diseases*, 4(2), 165-175.
- Şen, A., Sönmez, G., Caner, V., & Özyiğit, M. Ö. (2002). Detection of Infectious Bronchitis Virus in Tracheal Organ Cultures Using the Immunoperoxidase Technique. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 26(6), 1381-1388.
- Tarpey, I., Huggins, M., Davis, P., Shilleto, R., Orbell, S., & Cook, J. (2001). Cloning, expression and immunogenicity of the avian pneumovirus (Colorado isolate) F protein. *Avian pathology*, 30(5), 471-474. DOI: 10.1080/03079450120078653.
- Thayer, S., Villegas, P., & Fletcher, O. (1987). Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays and conventional methods for avian serology. *Avian diseases*, 120-124.
- Thureen, D. R., & Keeler, C. L. (2006). Psittacid herpesvirus 1 and infectious laryngotracheitis virus: comparative genome sequence analysis of two avian alphaherpesviruses. *Journal of virology*, 80(16), 7863-7872. DOI: 10.1128/JVI.00134-06.
- Timurkaan, N., Yilmaz, F., Bulut, H., Ozer, H., & Bolat, Y. (2003). Pathological and immunohistochemical findings in broilers inoculated with a low virulent strain of infectious laryngotracheitis virus. *Journal of veterinary science*, 4(2), 175-180.
- Tiwari, A., Patnayak, D. P., & Goyal, S. M. (2006). Attempts to improve on a challenge model for subtype C avian pneumovirus. *Avian pathology*, 35(02), 117-121. DOI: 10.1080/03079450600597675.
- Toquin, D., Bâyon-Auboyer, M., Eterradossi, N., Jestin, V., & Morin, H. (1999). Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck. *The Veterinary Record*, 145(23), 680-680.
- Touris-Otero, F., Martinez-Costas, J., Vakharia, V. N., & Benavente, J. (2004). Avian reovirus nonstructural protein μ NS forms viroplasm-like inclusions and recruits protein σ NS to these structures. *Virology*, 319(1), 94-106. DOI: 10.1016/j.virol.2003.10.034.
- Trites, J., Mills, D., & Rosenberger, J. K. (2011). Reovirus and turkey tenosynovitis. North Carolina Industry Days, North Carolina State University, Wilmington, North Carolina.

- Tucciarone, C. M., Franzo, G., Lupini, C., Alejo, C. T., Listorti, V., Mescolini, G., ... & Cecchinato, M. (2017). Avian Metapneumovirus circulation in Italian broiler farms. *Poultry Science*, 97(2), 503-509. DOI: 10.3382/ps/pex350.
- Vagnozzi, A., Zavala, G., Riblet, S. M., Mundt, A., & García, M. (2012). Protection induced by commercially available live-attenuated and recombinant viral vector vaccines against infectious laryngotracheitis virus in broiler chickens. *Avian pathology*, 41(1), 21-31. DOI: 10.1080/03079457.2011.631983.
- Valastro, V., Holmes, E. C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M. W., Cattoli, G., & Monne, I. (2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: an attempt to harmonize virus classification. *Infection, Genetics and Evolution*, 39, 349-364. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.02.015.
- Van der Heide, L. (1996). Introduction on avian reovirus. *Proc. International Symposium on Adenovirus and Reovirus Infection in Poultry*, 1996, 138-142.
- Van der Heide, L. (2000). The history of avian reovirus. *Avian diseases*, 44(3), 638-641. DOI: 10.2307/1593104.
- Van Kammen, A., & Spradbrow, P. (1976). Rapid diagnosis of some avian virus diseases. *Avian diseases*, 748-751.
- Van Loon, A., Braber, M., & Roessler, D. (1996). Vaccination of one-day-old chickens with a new live avian reovirus vaccine (strain 2177). Proceedings of the International symposium on adenovirus and reovirus infections in poultry, Rauschholzhausen, Germany.
- Van Roeckel, H., Bullis, K. L., Flint, O. S., & Clarke, M. K. (1942). Poultry disease control service. Massachusetts Agricultural Experiment Station, MA. Annual Report. *Bulletin*, 388, 99-103.
- Varela, R., & Benavente, J. (1994). Protein coding assignment of avian reovirus strain S1133. *Journal of virology*, 68(10), 6775-6777.
- Varela, R., Martínez-Costas, J., Mallo, M., & Benavente, J. (1996). Intracellular posttranslational modifications of S1133 avian reovirus proteins. *Journal of virology*, 70(5), 2974-2981.
- Velayudhan, B. T., McComb, B., Bennett, R. S., Lopes, V. C., Shaw, D., Halvorson, D. A., & Nagaraja, K. V. (2005). Emergence of a virulent type C avian metapneumovirus in turkeys in Minnesota. *Avian diseases*, 49(4), 520-526. DOI: 10.1637/7388-052805R.1.
- Viralzone, ARV genome, (2021, 7 May). Retrieved from https://viralzone.expasy.org/105?outline=all_by_species
- Vögtlin, A., Bruckner, L., & Ottiger, H.-P. (1999). Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of vaccine contamination by infectious laryngotracheitis virus. *Vaccine*, 17(20-21), 2501-2506. DOI: 10.1016/S0264-410X(99)00068-7.
- Watrach, A., Hanson, L., & Watrach, M. (1963). The structure of infectious laryngotracheitis virus. *Virology*, 21(4), 601-608.
- Wilks, C., & Kogan, V. (1979). An immunofluorescence diagnostic test for avian infectious laryngotracheitis. *Australian Veterinary Journal*, 55(8), 385-388.

- Williams, A. K., Li, W., Sneed, L. W., & Collisson, E. W. (1992). Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses. *Virus research*, 25(3), 213-222.
- Williams, R., Savage, C. E., & Jones, R. (1994). A comparison of direct electron microscopy, virus isolation and a DNA amplification method for the detection of avian infectious laryngotracheitis virus in field material. *Avian pathology*, 23(4), 709-720. DOI: 10.1080/03079459408419039.
- Williams, R., Savage, C. E., & Jones, R. (1991). Development of a live attenuated vaccine against turkey rhinotracheitis. *Avian pathology*, 20(1), 45-55.
- Winterfield, R., & Hitchner, S. (1962). Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *American Journal of Veterinary Research*, 23, 1273-1279.
- Wood, G., Muskett, J., & Thornton, D. (1986). Observations on the ability of avian reovirus vaccination of hens to protect their progeny against the effects of challenge with homologous and heterologous strains. *Journal of comparative pathology*, 96(2), 125-129.
- Worthington, K. J., Currie, R., & Jones, R. C. (2008). A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian pathology*, 37(3), 247-257. DOI: 10.1080/03079450801986529.
- Worthington, K. J., Sargent, B. A., Davelaar, F., & Jones, R. (2003). Immunity to avian pneumovirus infection in turkeys following in ovo vaccination with an attenuated vaccine. *Vaccine*, 21(13-14), 1355-1362. DOI: 10.1016/S0264-410X(02)00689-8.
- Xie, Z., Fadl, A. A., Girshick, T., & Khan, M. I. (1997). Amplification of avian reovirus RNA using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian diseases*, 654-660.
- Yavuz, O., Özdemir, Ö., Aras, Z., & Terzi, F. (2018). Immunohistochemical Studies on Infectious Laryngotracheitis in the Respiratory Tract Lesions in Naturally Infected Laying Hens. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24(2), 257-264. DOI: 10.9775/kvfd.2017.18805.
- Yilmaz, H., Altan, E., Cizmecigil, U. Y., Gurel, A., Ozturk, G. Y., Bamac, O. E., ... & Turan, N. (2016). Phylogeny and S1 gene variation of infectious bronchitis virus detected in broilers and layers in Turkey. *Avian diseases*, 60(3), 596-602. DOI: 10.1637/11346-120915-Reg.1.
- Yin, H. S., & Lee, L. H. (1998). Development and characterization of a nucleic acid probe for avian reoviruses. *Avian pathology*, 27(4), 423-426.
- York, J. J., & Fahey, K. (1988). Diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody ELISA. *Avian pathology*, 17(1), 173-182.
- Yousefi, Y., Bassami, M. R., Kalidari, G. A., & Seno, M. M. G. (2019). Sequence characterization of full-length S. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 43(2), 235-243. DOI: 10.3906/vet-1808-19.
- Yu, Q., Davis, P., Brown, T., & Cavanagh, D. (1992). Sequence and in vitro expression of the M2 gene of turkey rhinotracheitis pneumovirus. *Journal of general Virology*, 73(6), 1355-1363.

7. SİMGE ve KISALTMALAR

μ l	mikrolitre
AGID	Agar gel immunodifüzyon
AIV	Avian Influenza Virus
aMPV	Avian Metapneumovirus
ARV	Avian Reovirus
CAM	Koryoallantoik membran
CEF	Chicken embriyo fibroblast
CEL	Chicken embryo liver
CEO	Chicken embryo origin
Ct	Cycle threshold
DNA	Deoksiribonükleik asit
DRV	Duck reovirus
ETY	Embriyolu tavuk yumurtası
FPV	Fowlpoxvirus
GaHV-1	Gallid alphaherpesvirus 1
<i>gE</i>	glikoprotein E
<i>gG</i>	glikoprotein G
GRV	Geese reovirus
HA	Hemaglutinasyon
HI	Hemaglutinasyon-inhibisyon
HVR	Hyper variable region
HVT	Herpesvirus of turkey
IB	Infectious Bronchitis
IBDV	Infectious Bursal Disease Virus
IBV	Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus
<i>ICP4</i>	Infected Cell Polypeptide 4
IFAT	İmmunofloresan antikor tekniği
IIF	İndirekt immunofloresan
ILTV	Infectious Laryngotracheitis Virus
IPA	Immunoperoxidase assay
NDV	Newcastle Disease Virus
NS	Nonstructural protein
OIE	The World Organisation for Animal Health
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP	Restriction fragment length polymorphism

RNA	Ribonükleik asit
rPCR	Real-Time PCR
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SHS	Swollen Head Syndrome
SPF	Specific Pathogen Free
TCO	Tissue culture origin
<i>TK</i>	Thymidine Kinase
T _m	Melting temperature
TRV	Turkey reovirus
U _L	Unique long
U _S	Unique short
VN	Virus nötralizasyon

8. EKLER

TABLO LİSTESİ

- Tablo 1.** Yumurtacı kümeslerden alınan örneklere ait bilgiler
Tablo 2. Broiler kümeslerinden alınan örneklere ait bilgiler
Tablo 3. Çoklu enfeksiyon görünen yumurtacı ve broiler örnekler
Tablo 4. rRT-PCR ile elde edilen Ct değerleri ve sonuçların değerlendirilmesi
Tablo 5. rRT-PCR ile test edilen örnekler ve sonuçların değerlendirilmesi
Tablo 6. *ICP4* geni fragment 1’de belirlenen mutasyonlar ve referans suşlarla karşılaştırılması
Tablo 7. *TK* geninde belirlenen mutasyonlar ve referans suşlarla karşılaştırılması
Tablo 8. rRT-PCR ile test edilen örnekler ve sonuçların değerlendirilmesi
Tablo 9. rRT-PCR ile test edilen örnekler ve sonuçların değerlendirilmesi
Tablo 10. Enfeksiyonların görüldüğü iller

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** IBV genomu
Şekil 2. ILTV genomu
Şekil 3. aMPV genomu
Şekil 4. ARV genomu
Şekil 5. Örneklerin toplandığı illerin harita üzerinde gösterilmesi. İşaretlenen illerden kümes bazında 1-10 arası örnek alınanlar sarı, 10’dan fazla örnek alınanlar kırmızı belirteçle işaretlenmiştir.
Şekil 6. SPF embriyolu tavuk yumurtalarına inokulasyon (a), ışıkla muayene (b) ve inokulasyondan sonraki embriyodaki değişimlerin görüntüleri (c ve d).
Şekil 7. Hemaglutinasyon aktivitesinin görüntüsü
Şekil 8. Broiler (n:48) ve yumurtacı (n:45) kümeden alınan trakeal svabta etkenlerin görülme sıklıklarına göre dağılımları. Kırmızı renk broileri, mavi renk yumurtacıları temsil etmektedir. Yüzde hesaplamalarında çoklu enfeksiyonların sıklıkları göz ardı edilmiştir.
Şekil 9. Yumurtacı örneklerde çoklu enfeksiyon sayıları
Şekil 10. Broiler örneklerde çoklu enfeksiyon sayıları
Şekil 11. Pozitif (a) ve negatif (b) kontrollerin amplifikasyon eğrileri.
Şekil 12. Pozitif örneklere ait amplifikasyon eğrileri
Şekil 13. Pozitif örneklere ait amplifikasyon eğrileri
Şekil 14. Y37 örneğine ait *S1* gen sekansı
Şekil 15. Y38 örneğine ait *S1* gen sekansı

- Şekil 16.** Y39 örneğine ait *SI* gen sekansı
- Şekil 17.** Y45 örneğine ait *SI* gen sekansı
- Şekil 18.** B42 örneğine ait *SI* gen sekansı
- Şekil 19.** Referans suşların ve çalışmadaki IBV pozitif örneklerin *SI* geni baz alınarak oluşturulan filogenetik ağaç
- Şekil 20.** Pozitif (a) ve negatif (b) kontrollerin amplifikasyon eğrileri
- Şekil 21.** Pozitif (a) ve negatif (b) kontrollerin T_m grafiği
- Şekil 22.** Pozitif örneklere ait amplifikasyon eğrileri
- Şekil 23.** Pozitif örneklere ait T_m grafiği
- Şekil 24.** Referans suşların ve çalışmadaki ILTV pozitif örneklerin *ICP4* geni baz alınarak oluşturulan filogenetik ağaç
- Şekil 25.** Referans suşların ve çalışmadaki ILTV pozitif örneklerin *TK* geni baz alınarak oluşturulan filogenetik ağaç
- Şekil 26.** Pozitif (a) ve negatif (b) kontrollerin amplifikasyon eğrileri
- Şekil 27.** Pozitif (a) ve negatif (b) kontrollerin T_m grafiği
- Şekil 28.** Pozitif örneklere ait amplifikasyon eğrileri
- Şekil 29.** Pozitif örneklere ait T_m grafiği
- Şekil 30.** Pozitif ve negatif kontrollerin amplifikasyon eğrileri
- Şekil 31.** Pozitif ve negatif kontrollerin T_m grafiği
- Şekil 32.** Pozitif örneklere ait amplifikasyon eğrileri
- Şekil 33.** Pozitif örneklere ait T_m grafiği

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	Önemli Kanatlı Solunum Virus Enfeksiyonlarının Real-time PCR ile Araştırılması
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Prof. Dr. Kamil Tayfun ÇARLI UU Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Araş. Gör. Özge YILMAZ
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Özge YILMAZ'ın Doktora Tez Projesi
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	2016 – 2018
	KULLANILACAK HAYVAN TURU VE SAYISI	700 Adet Embriyolu Tavuk Yumurtası
	DESTEKLEYİCİ KURULUŞ	UU – BAPK'na Başvurulacak

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi
	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	25.01.2016

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2016 - 02 / 06	Tarih : 02.02.2016
	<p>Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırmacıya iletmesine oy birliğiyle çoğunluğu ile karar verildi.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması; 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmalarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması; 3) Deneysel hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihinin bildirilmesi; 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması; 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi. 	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeligi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza		Düşünceler
				Kabul	Ret	
Prof. Dr. Kasım ÖZLÜK Başkan	Tıp- Fizyoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Levent BÜYÜKUYSAL Başkan Yardımcısı	Tıp- Farmakoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Erdoğan ŞENDEMİR Üye	Tıp - Anatomi	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. M. Müfit KAHRAMAN Üye	Vet- Patoloji	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Ayşe TOPAL Üye	Vet- Cerrahi	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Aydın İPEK Üye	Ziraat- Zootečni	Ziraat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Sibel TAŞ Üye	Fen Edebiyat - Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Sema ÖZKAN Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Makine Mühendisi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Taner GÜLER Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Ziraat Yüksek Mühendisi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Faruk KÜÇÜKYILDIZ Üye	Veteriner Hekim	UU-DEHYUAM	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			

* Araştırma ile İlişkisi

9. TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın her anında değerli tecrübelerini benimle paylaşarak bilimsel ve akademik olarak gelişmemde katkılar sağlayan, engin bilgileriyle bana yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. K. Tayfun CARLI'ya, doktora eğitimim boyunca her zaman desteğini gördüğüm, tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle katkı sağlayan Doç. Dr. Fethiye ÇÖVEN'e, akademik hayatımın şekillenmesinde yoluma ışık tutan hocalarım Prof. Dr. Mihriban ÜLGEN, Prof. Dr. Ayşin ŞEN, Prof. Dr. Cengiz ÇETİN, Doç. Dr. Esra BÜYÜKCANGAZ, Doç. Dr. Serpil KAHYA DEMİRBİLEK ve Dokt. Öğr. Üyesi Hüban GÖÇMEN'e, hocam olmasından gurur ve mutluluk duyduğum Prof. Dr. Zeki YILMAZ'a, her anımda yanımda olan dostlarım Dr. Eda Baldan TOKER ve Vet. Hek. Ersin ASLAN'a, laboratuvarında keyifle çalıştığım iş arkadaşlarım Dokt. Öğr. Havva KURNAZ ve Laborant Ayşe UYAR'a, filogenetik çalışmalarda yardımcı olan arkadaşım Araş. Gör. Dr. İzzet Burçin SATICIOĞLU'na, hayatım boyunca her koşulda sevgi ve şefkatle yanımda olup attığım her adımı destekleyen, bana her zaman cesaret veren, doktora eğitim sürecinde bana sonsuz destek olan canım annem Melahat BİLGİ ve canım babam Seçkin YILMAZ'a, beni dünyanın en şanslı ablası yapan kardeşim Deniz YILMAZ'a, sevgileriyle beni hep teşvik eden biricik kayınvalidem Nuran ARDIÇLI ve kayınpederim Ali İhsan ARDIÇLI'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Her zaman koşulsuz sevgisiyle yanımda olan, ilham aldığım, akademik hayatımın pek çok aşamasında ve tezimde sonsuz emeği bulunan kıymetli eşim Doç. Dr. Sena ARDIÇLI'ya gönülden teşekkür ederim.

10. ÖZGEÇMİŞ

Özge Ardıçlı, lise öğrenimini 2006 yılında Ulubatlı Hasan Anadolu Lisesinde tamamlamıştır. Aynı yıl üniversite eğitimine başladığı Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesini 2012 yılında bitirerek Veteriner Hekim ünvanını almaya hak kazanmıştır. 2013 bahar yarıyılında Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında doktora programına başlamıştır. Araştırma görevlisi olarak 2015'te ataması yapılmış ve doktora eğitimini 2021 yılında tamamlamıştır. Doktora eğitimi sürecinde yurt içi ve uluslararası indekslerde taranan dergilerde yer alan araştırma makaleleri bulunmaktadır. Evlidir ve Bursa'da ikamet etmektedir.