

Tavuklarda Spontan Marek Hastalığının Histopatolojik ve İmmunoperoksidaz Yöntemle Tanısı Üzerine Çalışmalar*

Aydın GÜREL, S. Seçkin ARUN, Burak KUŞÇU, Tahsin YEŞİLDERE
İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 05.04.2002

Özet: Çalışmada ülkemizde tavukçuluk yapılan her bölgede görülen ve ekonomik kayıplar oluşturan, Marek hastalığından şüpheli kümeslerden alınan ölü veya canlı tavukların nekropsileri sonucunda, alınan organlarda hem histopatolojik incelemeler yapıldı, hem de immunoperoksidaz boyama ile direkt antijen arandı ve sonuçlara göre hastalığın kesin tanısı konuldu. Ayrıca immunoperoksidaz boyama sonuçlarına göre histopatolojik sonuçların doğruluğu belirlendi. Çalışmanın materyalini İstanbul, Adapazarı, Bolu ve Balıkesir illeri ve çevresindeki tavuk çiftliklerindeki Marek hastalığından şüpheli tavuklardan alınan değişik organlar oluşturdu. Bu amaçla 50 tavuk incelendi. Alınan organlardan hazırlanan kesitler histopatolojik incelemeler için rutin işlemlerden geçirilip Hematoksilen-Eozin ile, immunohistolojik incelemeler için de İşaretli StreptAvidin-Biotin Peroksidaz (LSAB) yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Marek hastalığı şüpheli tavukların histopatolojik incelemelerinde, başta karaciğer olmak üzere böbrek, dalak, proventrikulus, N. ischiadicus'ta değişik yoğunlukta atipik lenfoid hücre infiltrasyonları ve b. Fabricius'ta ise interfolliküler alanlarda retikulum hücreleri ve epiteloid-histiyositik seriden hücre infiltrasyonları ve folliküllerde kist oluşumuyla karakterize değişimler saptandı. İmmunoperoksidaz boyamalarda ise, lezyonların geliştiği karaciğer, dalak, böbrek, proventriculus, b. Fabricius gibi organlarda çoğunluğu intrasitoplazmik, tek tük de intranükleer yerleşimli çok sayıda antijen pozitif boyanmalar saptandı.

Sonuç olarak, Marek şüpheli olarak değerlendirilen 24 olgunun immunoperoksidaz boyanmasında, 17 adedinin Marek pozitif olduğu saptandı. Histopatolojik incelemede Marek hastalığı tanısı konulan 26 olgudan 21 adedinin immunoperoksidaz boyanması sonucunda ise bunların sadece 18 adedinin Marek pozitif olduğu tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: Tavuk, Marek hastalığı, histopatolojik bulgular, İmmunohistokimyasal bulgular

Studies on the Diagnosis of Spontaneous Marek's Disease of Chickens by Histopathological and Immunoperoxidase Methods

Abstract: In this study, organ and tissue samples were collected for routine histopathological examinations and also for the detection and definitive diagnosis of Marek's disease (MD) viral antigens by the Labeled StreptAvidin-Biotin Peroxidase (LSAB) method during post-mortem examinations of dead or sacrificed hens. The chickens were taken from various sites located in regions of intensive poultry production in Turkey. This disease is quite frequently encountered in Turkey and is still one of the major causes of economic losses in the poultry industry. The material of this study was composed of various organ samples collected from MD-suspected hens from various houses located within or around İstanbul, Adapazarı, Bolu and Balıkesir. Fifty hens were examined for the suspected disease. Sections prepared from collected organs or tissues were processed for both routine histopathological examinations and also for immunohistochemical evaluations under light microscope by the LSAB method. Lymphoid cell infiltrations of various sizes were observed, particularly in the liver and to a lesser extent in the kidney, spleen, proventricle and sciatic nerves. Various changes such as cell infiltrations through interfollicular areas and cyst formations in the follicular areas of the bursa of Fabricius were determined in the histopathological examinations of some of the samples of birds suspected of MD. In immunoperoxidase stained slides of birds suspected of MD, intracytoplasmic and less frequently intranuclear stainings were detected in a majority of antigen-positive cells.

In conclusion, in 24 cases suspected of MD in routine histopathological examinations, 17 were positive. Moreover, of 21 immunoperoxidase stainings of 26 cases diagnosed as having MD by routine histopathology, only 18 were verified to be positive.

Key Words: Chicken, Marek's disease, histopathological findings, immunohistochemical findings.

* Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Proje No: 1270/050599

Giriş

Marek hastalığı dünya tavuk yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara yol açan, yetişkin tavuklarda bacak ve kanatlarda felç, diğer bazı sinirlerin etkinlenmesine bağlı bozukluklar, iritis, kesim yaşındaki tavuklarda sinirsel bozukluklardan daha çok viseral organlarda tümörler ile b. Fabricius'ta atrofi ve kist oluşumuyla karakterize, lenfoproliferatif bir hastalıktır. Enfeksiyon özellikle gençlerde immunosupressif bir etkiye sahiptir (1-5).

Ülkemizde Marek hastalığının ilk defa 1968 yılında (3,6) teşhis edildiği bildirilmiştir. Günümüzde de gerek damızlık gerekse broiler ve yumurtacı tavuk yetiştirme kümeslerinde sık sık görülmekte ve önemli ekonomik kayıplar oluşturmaktadır (1-3,7). Hastalık etkeni herpes grubundan lenfotropik özellikte bir DNA virustur. Üç serotipi vardır. Serotip I içerisinde bulunan alt türler patojendir ve tavuklardaki akut veya klasik Marek hastalığını oluşturur. Hastalık doğal koşullarda sadece tavuklarda görülür (2,3,7). Hastalığın en fazla görüldüğü dönem 12 – 24 haftalık yaş dönemidir. Fakat 3-4 haftalık piliçlerde (1-5) ve 24. haftadan daha yaşlı tavuklarda da (1,2,8,9) görülmektedir. Erken dönemdeki enfeksiyonlarda, ileride önemli ekonomik kayıplara sebep olan immunosupresyon oluşabilmektedir (7,8). Klinik bulgular, etkilenen sinirlere ve bu sinirlerdeki bozuklukların şiddetine bağlıdır. Bütün sinirler enfeksiyona karşı duyarlıdır. Hasta hayvanlarda, parmakların içe doğru kıvrık olması, yürüyüş bozuklukları, ileri durumlarda paraliz ve kanatların sarkması, balerin oturuşu, kursak şişliği ve sarkması önemli klinik bulgulardır (2,3,7-13). Nekropside, sinirler de dahil olmak üzere kalp, karaciğer, dalak, bezli mide, böbrek ve genital organlar gibi değişik iç organlarda farklı büyüklükte tümöral oluşumların görülmesi, özellikle erken yaşta enfeksiyonlarda b. Fabricius ve timus'ta atrofi de belirgin bulgular arasındadır. Mikroskopik olarak karaciğer, dalak, bezli mide ve diğer organlarda farklı çapta atipik lenfoid hücrelerden oluşan tümöral hücre infiltrasyonları, b. Fabricius'da lenfoid folliküllerde atrofi ve interfolliküler alanlarda retikulum hücrelerinin yoğun olduğu hücre infiltrasyonları ve folliküllerde kistik yapılar tanıtıcı bulgulardır (1-3,5,7-9,11,12,14-18).

İmmunohistokimya, işaretlenmiş antikorlar kullanarak hücre ve dokularda yer alan antijenlerin buldukları yerlerde gösterilmesini sağlayan bir yöntemdir (10,18-21). Antijen-antikor birleşimi reaksiyonuna dayanan çok duyarlı ve özgün olan bu boyama yöntemleri sayesinde,

bu güne kadar saptanamayan bir çok yapı görülebilir duruma gelmiştir (19-27). İmmunoperoksidaz boyama tekniğinin, doku kesitlerinde aynı şekilde uygulanan immunofloresan tekniğinden (9,18,20) daha kolay ve daha hassas olmasının yanı sıra, enfekte materyalin teşhis ünitelerine tespit solusyonlarında gönderilebilme avantajı da oluşturduğu bilinmektedir (10,20,22,28). Son yıllarda geliştirilen immunoenzim tekniklerle parafinde bloklanmış doku kesitlerinde de viral antijenler tespit edilebilmektedir (19,22,24). Marek hastalığında da uygun monoklonal antikor kullanılarak etkenin (antijenin) değişik dokularda tespit edildiği bildirilmiştir (21,23-25,28,29).

Marek hastalığı'na, klinik ve mikroskopik bulgular ile muhtemelen tanı konulabilir. Fakat, dezavantaj benzer lezyonların birden fazla hastalıkta oluşmasıdır. Hastalık başta lökosis olmak üzere, eritroblastozis ve diğer tümöral hastalıklarla, B vitamini yetersizliği, Gumboro hastalığı ve İnfeksiyöz tavuk anemisi gibi hastalıklarla karıştırılmaktadır (1-3,8,9,12,14,30).

Çalışmada amaç, ülkemizde tavukçuluk yapılan her bölgede kümeslerde görülen, önemli ekonomik kayıplar oluşturan bu hastalığa ilgili şüpheli kümeslerden alınacak tavukların nekropsileri sonucu organlarda hem histopatolojik incelemeler yapmak, hem de İşaretli Streptavidin-Biyotin Peroksidaz (LSAB) boyama yöntemi ile antijen aramak ve sonuca göre hastalığın kesin olarak tanısını yapmaktır. Ayrıca, immunoperoksidaz boyama sonuçlarına göre de histopatolojik sonuçların doğruluk oranını belirlemektir.

Materyal ve Metot

Çalışmanın materyalini İstanbul, Adapazarı, Bolu ve Balıkesir illeri ve çevresindeki değişik tavuk çiftliklerinden Marek hastalığı şüpheli tavuklardan alınan değişik organlar oluşturdu.

Bu hastalıktan şüpheli olarak getirilen canlı tavuklar ötenazi edildikten sonra, ölü tavuklara ise doğrudan sistemik nekropsi yapıldı ve toplam 50 adet Marek hastalığı şüpheli tavuk incelendi. Nekropsilerde histopatolojik ve immunohistopatolojik incelemeler için karaciğer, dalak, kalp, böbrek, N. ischadicus varsa b. Fabricius ve lezyonlu diğer organlardan uygun büyüklükte parçalar alınarak tespit amacıyla % 10'luk formol saline solusyonuna konuldu. Daha sonra organ parçaları bilinen rutin işlemlerden (31) geçirilip, parafin bloklara gömüldü. Hazırlanan bloklardan rotary mikrotomla, histopatolojik

incelemeler için 5-6 mikron kalınlığında kesitler alınarak, bunlar hematoksilin-eozin (H-E) ile boyanıp ışık mikroskopunda incelendi. Aynı bloklardan ayrıca alınan 3 mikron kalınlığındaki kesitler kit prosedürüne göre LSAB (İşaretli StreptAvidin Biotin) yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

Çalışmada kullanılan Marek pozitif serum, monoklonal olarak Intervet International R&D service Laboratuvarından Dr. H. LENKENS'den alındı. Marek virusunun 3 serotipi olduğu için çalışmada serotip 1'e ait 2BN 90 monoklonal pozitif serumu kullanıldı. Pozitif serum, TBS (tris bufer solution, pH 7,4- 7,6)'de 1/100 oranında dilüe edildi ve LSAB tekniğinde DAKO LSAB2 KIT (DAKO K0675) kullanıldı.

Bulgular

Klinik ve Makroskopik Bulgular

Çalışmada, materyali oluşturan tavuklarda hastalığa ilgili Tablo 1'de belirtilen farklı klinik semptomlar gözlemlendi. Broiler yetiştirme ünitelerinde, bu bulgulardan özellikle boyun uzatma, parmakların içe kıvrılması, inkoordinasyona daha fazla rastlanırken, diğer bulgulara yumurtacı ve broiler damızlık sürülerde daha fazla oranda rastlandı. Ölüm oranı 4-10 haftalık tavuklarda, yaşlılara göre daha fazlaydı.

Yapılan nekropsilerde hayvandan hayvana farklı makroskopik bulgular gözlenirken, bazılarında ise herhangi bir makroskopik lezyona rastlanmadı. Özellikle balerin oturuşu, parmakların içe kıvrılması, inkoordinasyon gibi klinik bulgu gösteren bir çok

hayvanda N. ischiadicus'ların kalınlaştığı ve matlaştığı, enine çizgilerinin kaybolmuş olduğu ayrıca bazı iç organlarda farklı tümöral üremelerin geliştiği belirlendi. Özellikle 8-9. haftadan büyük yaştaki tavukların çoğunluğunda rastlanılan tipik görüntü, başta karaciğer olmak üzere dalak, böbrek gibi organlarda gözlenen büyüme ve bunların yüzeylerinde gelişen tek veya çok sayıda, farklı büyüklükte olan ve normal dokuya göre daha açık ve mat görünümlü, grimtrak renkli tümöral odaklardı. Yine, özellikle 4-6. haftadan büyük yaşta olan tavukların yaklaşık % 40'ında bezli mide mukozasının değişen oranlarda kalınlaşması da tespit edilen bulgulardandı. Bunlarla beraber, özellikle 15-20 haftalık yaştaki tavuklarda bütün iç organlara yayılan iri tümöral kitlelerin varlığı, dikkati çeken diğer bir bulguydu. Özellikle 4-10 haftalık arası yaşlardaki tavuklarda rastlanılan farklı bir bulgu da b. Fabricius'ta saptanan atrofi ve serozadan da görülebilen mukozada gelişen kistik yapılarıydı. Bunlar yanında 4-8 haftalık yaştaki bazı tavuklarda da paraliz ve boyun uzatma ve boynun dorsal bölgesindeki tüylerin dikleşmesi ile karakterize klinik bulgu gösteren tavuklarda beyinde hiperemi ve b. Fabricius'ta atrofi dışında başka bir bulgu görülmedi. Ayrıca, yumurtacı ve broiler parent iki sürüde 3 hayvanda iç organlarda yaygın tümöral üremeler yanında göğüs kaslarında belirgin atrofi gözlemlendi (Tablo 2).

Mikroskopik Bulgular

Çalışmada, tavuklara ait değişik organların mikroskopik incelemelerinde de birbirine benzeyen veya farklı özellikte ve değişik yoğunlukta lezyonlar tespit edildi (Tablo 3).

Tablo 1. Marek Hastalığı Tanısı Konulan Tavuklarda Klinik Bulguların* Görülme Sıklığı (50 hayvan)

Klinik Bulgular	Bulguların Görüldüğü Hayvan Sayısı
İnkoordinasyon	15
Boyun uzatma	11
Paraliz	20
Parmakların içe Kıvrılması	16
Kanatların düşmesi	12
Balerin oturuşu	6
Tortikollis	8
Kaşeksi	4
Tremor	14

* Klinik bulgular ile ilgili detaylar metin içerisinde açıklanmıştır.

Tablo 2. Marek Hastalığı Tanısı Konulan Tavuklarda Makroskopik Bulgu Gösteren İç organ Sayıları.

Organlar	Olgu Sayısı (50)
Bezsel mide	20
Karaciğer	25
Dalak	17
Böbrek	12
Kalp	7
N. ischiadicus	16
B. Fabricius	15
Beyin-Beyincik	10
Makroskopik lezyon yok	10

Tablo 3. Marek Hastalığında Organlarda Gelişen Mikroskopik Lezyonların Derecelendirilmesi

Hayvan No:	Kayıt No:	Karaciğer	Dalak	Böbrek	Kalp	N. ischiadicus	Bezli mide	B.Fabricsius	Beyin	Beyincik
1	99/129	+	+	-	-	-	+	+	+	++
2	99/101	+	+	-	-	-	++	+	-	+
3	99/140	+	+	+	-	-	+	-	-	-
4	99/261	+++	+	++	+	-	++	-	-	-
5	99/262	++	++	+++	-	-	+	-	-	-
6	99/263	+++	++	+++	+	++	++	-	-	-
7	99/264	+	+++	++	++	-	++	-	-	-
8	2000/6	+++	++	+	+	++	+	-	-	-
9	2000/8	++	++	++	-	-	++	-	-	-
10	2000/25	++	+	-	-	+	++	-	-	-
11	2000/40	+	+	+	-	++	+	+	-	-
12	2000/55	+	+	-	-	+++	+	-	+	-
13	2000/84	++	+	-	-	-	++	++	-	++
14	2000/101	+++	++	++	++	++	+	-	-	-
15	2000/109	+++	++	+	++	-	+	-	-	-
16	2000/110	-	+	-	-	-	+	++	+	+
17	2000/118	+	++	+	-	++	++	+	-	-
18	2000/120	+	+	-	-	-	++	+++	-	-
19	2000/121	+	+	+	-	-	++	++	-	-
20	2000/122	+	++	+	+	++	+++	+	-	-
21	2000/124	++	++	-	-	-	++	+	-	-
22	2000/127	+	+	+	-	++	+	-	-	-
23	2000/128	+++	+	+++	+	+	+	-	-	-
24	2000/149	+++	+	+	-	++	++	-	-	-
25	2000/150	++	+++	+	+	+	+	-	-	-
26	2000/151	+	+	+	-	+++	++	-	-	-
27	2000/152	++	+	+	+	+++	++	-	-	-
28	2000/156	+	-	+	-	++	+++	+	-	-
29	2000/160	++	+	+	-	-	++	++	+	+
30	2000/171	+++	++	++	++	+	++	-	-	-
31	2000/172	++	+	+	-	+	+++	++	-	-
32	2000/177	+	+	-	-	-	+	+	-	++
33	2000/180	++	-	-	-	-	++	+++	-	++
34	2000/183	+	+	+	-	-	++	++	+	++
35	2000/184	+	+	-	-	-	+	++	++	++
36	2000/185	++	+	+	-	-	+	++	-	-
37	2000/188	+	-	-	-	-	-	+	+	++
38	2000/190	++	+	+	-	++	++	-	-	-
39	2000/192	+	+	-	-	++	-	++	-	-
40	2000/195	+	-	-	-	-	++	+++	+	+++
41	2000/202	+++	++	+	+	-	++	-	-	-
42	2000/203	++	+	+++	++	+	-	-	-	-
43	2000/204	-	-	+	-	+++	++	-	-	-
44	2000/205	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
45	2000/206	+	++	+	-	++	++	-	-	-
46	2000/217	+	+	+	-	-	-	++	-	+
47	2000/219	+++	++	+++	++	-	-	-	-	-
48	2000/243	++	-	+	-	-	-	++	+	+++
49	2000/245	+	+	-	-	-	-	++	+	+
50	2000/276	++	+++	++	++	+	+	-	-	-

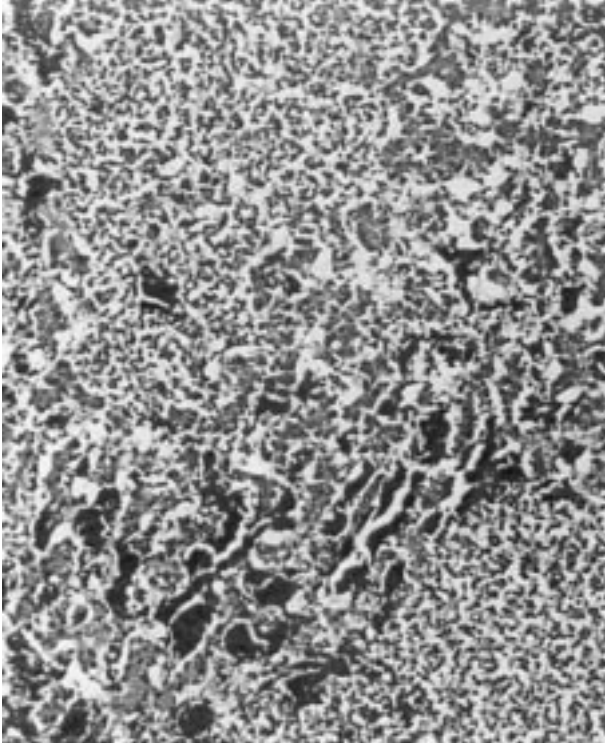
(-): Lezyon yok

(+: Hastalığa ilgili lezyon az ve sınırlı

(++): Hastalığa ilgili lezyon orta şiddette ve sınırlı.

(+++): Hastalığa ilgili lezyon şiddetli ve yaygın

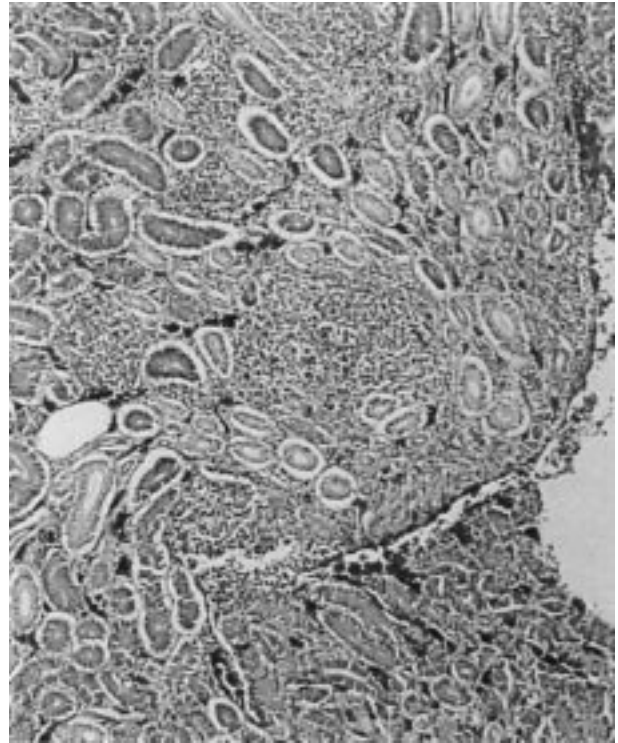
Özellikle bacaklara ilgili klinik bulgular gösteren 16 adet tavuğun *N. ischiadicus*'larında belirgin ödem, lenfosit-lenfoblast-plazma hücresi ve tek tük de histiyosit infiltrasyonundan oluşan bir nöyritis tablosu saptandı. Bunun yanında, klinik belirti göstermeyen özellikle 6-7 haftalık yaştaki tavukların 10 adedinin *N. ischiadicus*'larında da fazla geniş ve yoğun olmayan durumda, yukarıdaki tipte görüntüler belirlendi. *N. ischiadicus*'larında benzer mikroskopik lezyonlar tespit edilen 12 tavuğun başta karaciğer, dalak, böbrek olmak üzere değişik organlarında farklı genişlikte atipik veya normal yapıda lenfoid hücre üremeleri saptandı. Özellikle sinirsel belirti göstermeyen 10-12 hafta ile 20-25 haftalık yaşlar arasındaki 23 adet tavukta da çoğunluğu karaciğer, dalak, böbrek, bezli mide'de olmak üzere diğer organlarda da atipik veya normal yapıda lenfosit, lenfoblast, az sayıda histiyosit ve plazma hücresinden oluşan ve farklı yoğunlukta hücre infiltrasyonları tespit edildi. Bu hücre infiltrasyonlarının karaciğerde çoğunlukla perivasküler ve fokal olarak başladığı, sonra organ parankimine doğru yayıldığı gözlemlendi (Şekil 1). Bazı kesitlerde bu hücre üremeleri o kadar yoğun durumdaydı



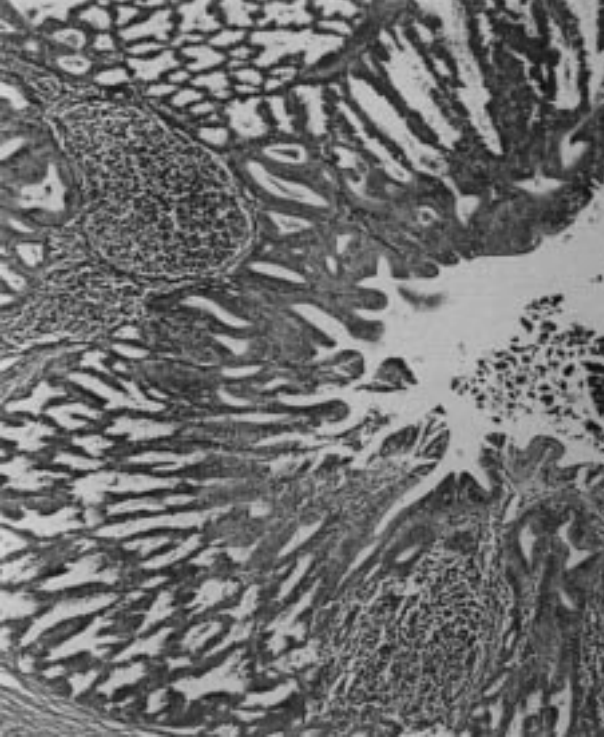
Şekil 1. Marek Hastalığı'nda karaciğerde yoğun atipik lenfoid ve histiyositik hücre infiltrasyonu. H.E. X 200.

ki, normal doku hücrelerinin ayırımı bile güçleşiyordu. Böbrekteki lezyonların da özellikle korteks de tubuluslar arasından başlayıp zamanla tubulusları da içine alarak çevreye doğru yayıldığı tespit edildi (Şekil 2). Bezli midede muskuler tabakadan başlayan atipik veya normal yapıda hücrelerden oluşan lenfoid üremelerin bezler arasına doğru yayıldığı ve şiddetli olaylarda interglanduler alanların, kimilerinde de bezlerin tamamıyla bu hücrelerle kaplandığı gözlemlendi (Şekil 3). Özellikle 5-10 haftalık arası yaşlarda olan tavukların 13 adedinin bezli midelerinin lamina muskularis'lerinde, yer yer de glandular alanlara kadar ilerleyen atipik lenfoid hücre üremeleri gözlemlendi. Bu vakaların bazılarında ayrıca, karaciğerde de özellikle perivasküler yerleşimli ve sınırlı çok sayıda atipik lenfoid hücre ve histiyositden oluşan hücre infiltrasyonları gözlemlendi.

Boyun uzatma ve felç gibi klinik bulgularla seyreden 11 adet olguda da beyincikte yoğun olmak üzere beyin ve beyincikte perivasküler atipik lenfoid hücre üremeleri, gliosis, ödem ve vaskulitis tespit edildi. Bu vakaların 6'sında b. Fabricius'ta interfolliküler alanlarda çoğunluğu retikulum hücrelerinden oluşan epitelooid, histiyosit hücre



Şekil 2. Marek Hastalığı'nda böbrekte intertubuler alanda yoğun atipik hücre infiltrasyonu. H. E. X 100.



Şekil 3. Marek Hastalığı'nda proventrikulusta bezler arasında atipik lenfoid hücre odakları. H. E. X 100. 0000

üremeleri ve bazı folliküllerde kistik oluşumlarla karakterize bir tablo tespit edildi. Bu tip lezyonlara özel bir klinik bulgu göstermeyen özellikle 5-8 haftalık arası yaştaki 10 hayvanın b. Fabricius'larında da rastlandı.

İmmunohistolojik Bulgular

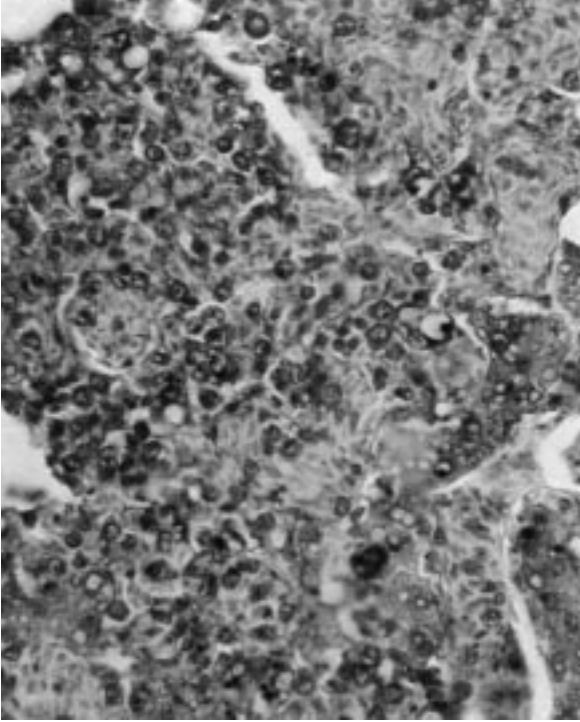
Histopatolojik incelemeler sonucunda, Marek Hastalığı olduğu kabul edilen veya şüpheli 45 adet tavuğa ait preparatların LSAB yöntemi ile boyanmaları sonucunda, bunlardan 35 tavuğa ait olan organlarda, çoğunlukla karaciğerde lezyonlu kısımlarda, farklı yoğunlukta intrasitoplazmik ve intranükleer yerleşimli antijen pozitif hücreler tespit edildi (Şekil 4). Bu alanların çevresindeki bazı karaciğer parankim hücrelerinin sitoplazmaları içerisinde de pozitif antijen granülleri gözlemlendi. Aynı tip hücreler lezyonlu bölgelerdeki kan damarları içinde de saptandı. Lezyonlu alanlarda özellikle hücreler arası boşluklarda lenfoid hücrelerin parçalanması sonucu olduğu düşünülen yoğun antijen boyanmaları gözlemlendi. Aynı görünüşte fakat farklı yoğunlukta antijen pozitif hücrelere değişik böbrek kesitlerinde özellikle

intertubuler alanlarda, yine lenfoid hücreler ve makrofajlardan oluşan hücre üremeleri arasında ve yer yer de böbrek epitel hücrelerinin sitoplazmaları içerisinde tespit edildi. Dalakta ise özellikle kırmızı pulpada gelişen sekonder lenfoid folliküllerde ve retikulum hücreleri içerisinde, bazı kesitlerde de beyaz pulpada lenfoid hücreler, retikulum hücreleri ve makrofajlar içerisinde intrasitoplazmik yerleşimli veya hücreler arasında dağınık durumda antijenik yapılar saptandı. Bezli midede özellikle lamina muskularis ve interglandular alanlardaki lenfoid hücre üremeleri, buna yakın bazı bez epitellerinin sitoplazmaları içerisinde ve yer yer de damarlar içerisinde antijen pozitif hücrelere rastlandı. B. Fabricius kesitlerinde de aynı görünüşte antijen pozitif boyanmalar çoğunlukla interfolliküler alanlarda, retikulum hücreleri, lenfoid hücreler ve epitel benzeri makrofajlarda, intrafolliküler alanlarda ise lenfoid hücreler ve makrofajlar içerisinde, çoğunluğu intrasitoplazmik ve az oranda da intranükleer yerleşimli olarak gözlemlendi (Şekil 5). Bu organda da hücre yıkımının fazla olduğu vakalarda inter ve intrafolliküler alanlarda hücre dışında ve dağınık durumda çok sayıda farklı büyüklükte pozitif boyanan antijen granülünün varlığı da saptandı. Beyinde özellikle glia hücreleri ve nöronlarda, beyincikte ise purkinje hücrelerinde intrasitoplazmik antijen boyanmaları saptandı (Şekil 6). N. ischiadicus kesitlerine uygulanan immunoperoksidaz boyamalarda hücre infiltrasyon alanları da dahil olmak üzere hiçbir alanda antijen pozitif hücreye rastlanmadı. Bu 45 adet tavuğun 24 adedinde histopatolojik bulgulara göre Marek hastalığı şüphesi vardı. Bunların LSAB ile boyanması sonucunda 17 adedinde, yukarıda detaylı olarak açıklandığı gibi, değişik organlarda Marek antijen pozitif boyanmalar tespit edilerek, bunların Marek hastalığı yönünden pozitif olduğu belirlendi. Yine histopatolojik lezyonlara göre Marek hastalığı tanısı konulan 26 tavuğun 21 adedine ait organların, yine LSAB ile boyanması ile de bunlardan sadece 18 adedinde Marek hastalığı antijen pozitif boyanmalar tespit edildi ve bunların Marek hastalığı pozitif olduğu kabul edildi. Beş olgudaki lezyonlar Marek hastalığı için çok tipik olduğundan bunlar LSAB ile boyanmadı. Kontrol amacıyla kullanılan pozitif dokularda hastalığa ilgili primer serum atlanarak aynı prosedürle, SPF hayvanlara ait dokularda pozitif serum kullanılarak uygulanan immunoperoksidaz-hematoksilen boyama yöntemi sonucunda herhangi bir organda pozitif boyanma saptanmadı (Şekil 7-8).

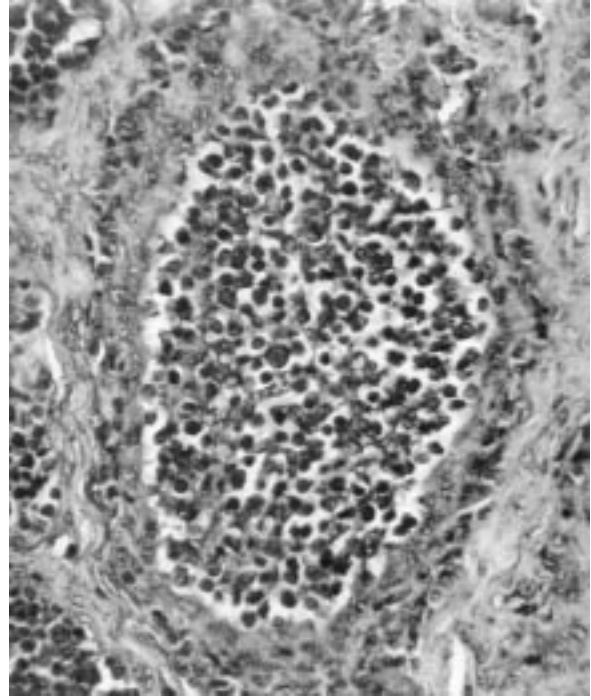
Tablo 4. Marek Hastalığına İlgili Anamnez Bilgileri ve Sonuçların Karşılaştırılması

Hayvan kayıt No	Geldiği Yer	Hayvanın Yaşı	Kümes Mevcudu	Histopatolojik Tanı	İmmunohistolojik Tanı
99/129	İzmit	25 günlük	10.000	Marek-Gumboro	Marek (+)
99/101	Göynük	32 günlük	15.000	Marek-Gumboro	Marek (+)
99/140	Ömerli	29 günlük	7.500	Marek	Marek (+)
99/261	Darıca	23 haftalık	8.000	Marek-Löykozis	Marek (+)
99/262	Darıca	23 haftalık	8.000	Marek-Löykozis	Marek (+)
99/263	Darıca	23 haftalık	8.000	Marek- Löykozis	Marek (+)
99/264	Darıca	23 haftalık	8.000	Marek- Löykozis	Marek (+)
2000/6	Hendek	20 haftalık	15.000	Marek	Marek (+)
2000/8	Adapazarı	18 haftalık	9.000	Marek	Marek (+)
2000/25	Akyazı	20 günlük	5.000	Marek-Gumboro	Marek (-)
2000/40	Geyve	40 günlük	10.000	Marek-Gumboro	Marek (-)
2000/55	Hendek	14 haftalık	10.000	Marek	Marek (+)
2000/84	Gebze	39 günlük	6.000	Marek	Marek (+)
2000/101	Adapazarı	24 hafta	8.000	Marek- Löykozis	Marek (-)
2000/109	Çatalca	25 haftalık	5.000	Marek- Löykozis	Marek (-)
2000/110	Gebze	24 günlük	5.000	Marek-Gumboro	Marek (+)
2000/118	Gebze	60 günlük	10.000	Marek	Marek (+)
2000/120	Mudurnu	34 günlük	12.000	Marek-Gumboro	Marek (+)
2000/121	Mudurnu	37 günlük	7.000	Marek-Gumboro	Marek (+)
2000/122	Silivri	12 haftalık	8.000	Marek	Marek (+)
2000/124	Akçakoca	45 günlük	12.000	Marek	Marek (-)
2000/127	Hendek	60 günlük	10.000	Marek	-*
2000/128	Çatalca	28 haftalık	7.500	Marek- Löykozis	Marek (-)
2000/149	Balıkesir	16 haftalık	7.000	Marek	Marek (+)
2000/150	Balıkesir	18 haftalık	6.000	Marek	Marek (+)
2000/151	Kartal	10 haftalık	6.000	Marek	Marek (+)
2000/152	Çatalca	12 haftalık	40 adet	Marek	Marek (+)
2000/156	Pendik	10 haftalık	5 adet	Marek	Marek (+)
2000/160	Düzce	40 günlük	5.000	Marek-Gumboro	Marek (+)
2000/171	Darıca	20 haftalık	12.000	Marek- Löykozis	Marek (+)
2000/172	Gebze	42 günlük	5.000	Marek	-*
2000/177	Çatalca	20 günlük	5.000	Marek	Marek (-)
2000/180	Ömerli	38 günlük	4.000	Marek	-*
2000/183	Akçakoca	39 günlük	10.000	Marek	Marek (+)
2000/184	Pendik	40 günlük	5.000	Marek	Marek (+)
2000/185	Akçakoca	40 günlük	6.000	Marek	-*
2000/188	Düzce	39 günlük	5.000	Marek	Marek (-)
2000/190	Mudurnu	14 hafta	6.000	Marek	-*
2000/192	Pamukova	45 günlük	10.000	Marek	Marek (+)
2000/195	Düzce	42 günlük	8.000	Marek	Marek (+)
2000/202	Adapazarı	28 haftalık	8.000	Marek- Löykozis	Marek (+)
2000/203	Adapazarı	28 haftalık	8.000	Marek- Löykozis	Marek (+)
2000/204	Mudurnu	18 haftalık	9.000	Marek- Löykozis	Marek (+)
2000/205	Mudurnu	18 haftalık	9.000	Marek- Löykozis	Marek (+)
2000/206	Bolu	16 haftalık	5.000	Marek	Marek (+)
2000/217	Gebze	23 günlük	7.000	Marek-Gumboro	Marek (+)
2000/219	İzmit	58 haftalık	6.000	Marek- Löykozis	Marek (-)
2000/243	Mudurnu	45 günlük	10.000	Marek	Marek (+)
2000/245	Çatalca	45 günlük	4.000	Marek-Gumboro	Marek (-)
2000/276	İzmit	24 haftalık	10.000	Marek- Löykozis	Marek (+)

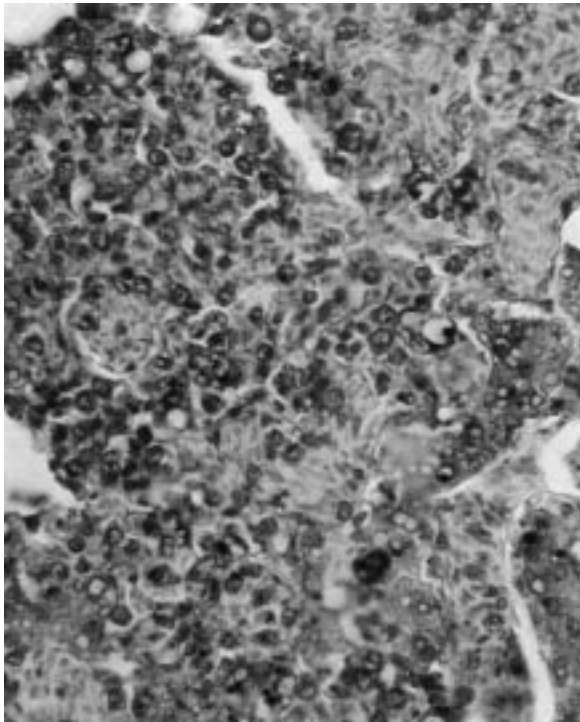
*Histopatolojik lezyonlar hastalık için tipik olduğundan immunoperoksidaz boyama yapılmadı



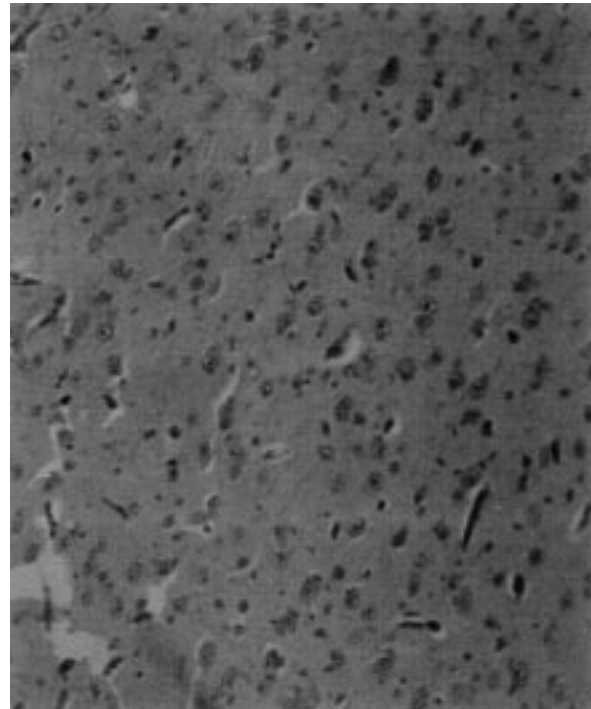
Şekil 4. Marek Hastalığında karaciğerde antijen pozitif hücreler. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen X 600.



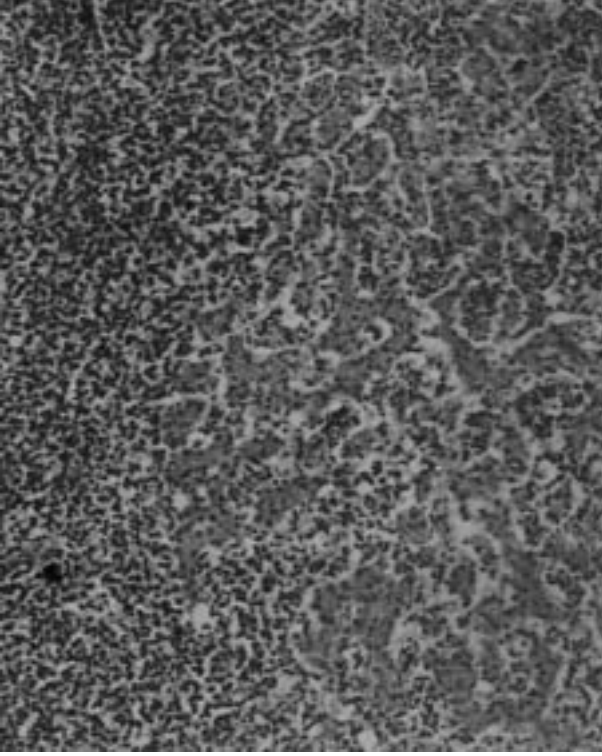
Şekil 5. Marek Hastalığında b. Fabricius'ta antijen pozitif hücreler. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen X 600.



Şekil 6. Marek hastalığında beyinde antijen pozitif hücreler. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen X 400.



Şekil 7. Marek Hastalığı pozitif bir beyinde primer serum atlanarak yapılan kontrol boyaması. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen X 400.



Şekil 8. Marek Hastalığı pozitif bir karaciğerde primer serum atlanarak yapılan kontrol boyaması. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen X 400.

Çalışmada kullanılan materyale ilgili anamnez bilgileri ve yapılan histopatolojik ve immunohistolojik tanı sonuçları karşılaştırmalı olarak Tablo 4'de verilmiştir.

Tartışma

Dünyada tavukçuluk yapılan bütün bölgelerde gözlenen ve ülkemizde de varlığı değişik çalışmalarda (1,3,7,11,12,18) bildirilen kanatlıların önemli viral hastalıklarından olan Marek hastalığı, İstanbul, Adapazarı, Bolu, Balıkesir ve çevresindeki değişik amaçlı yetiştirme kümeslerinde tespit edildi. Bir çok literatürde de bildirildiği (1,2,7,8,12,14,16) gibi, Marek hastalığı 23 günlükten-58 haftaya kadar farklı yaştaki tavuklarda saptandı (Tablo 4).

Çalışmada Marek hastalığı tanısı konulan kümeslerde hastalığın hem klasik formuna özgü (1,3,7,8,12,14), hem akut forma özgü (1,7,8,12,17), hem de transient paraliz formuna (1,8,10,12,32,33) ait klinik ve nekropsi bulguları tespit edildi. Literatürde bildirilen (2,7,12) iridosiklitis, kursak şişmesi gibi klinik bulgulara, çalışmada Marek hastalığı tanısı konulan kümeslerdeki her hangi bir

tavukta rastlanmadı. Değişik çalışmalarda (1,7,12,13,34) Marek hastalığının çoğunlukla görülen klasik formunun en tipik klinik belirtileri olan sinirsel belirtiler, çalışmada 20 adet hayvanda gözlemlendi. Hastalığın klasik formunu gösteren hayvan sayısının az olması, incelenen tavukların yaşlarının küçük olmasına bağlı olduğunu düşündürmüştür (Tablo 4). Literatürde de belirtildiği gibi (3,7,12), klasik formdaki Marek hastalığı genelde yaşlı hayvanlarda daha çoğunlukta gözlenmektedir. Ayrıca çalışmada tespit edilen mikroskopik bulguların, literatürde (3,7-10,12,13) bildirilenler ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Literatürde özellikle 5-18 haftalık yaşlar arasındaki tavuklarda daha çoğunlukta geliştiği bildirilen transient paraliz formundaki Marek hastalığı da, çalışmada 4-8 haftalık yaştaki 11 hayvanda tespit edildi. Bu hayvanların organlarının mikroskopik incelemelerinde, literatürde (1,8,12,32,33) belirtildiği gibi beyincik ve beyinde nonpurulent yangı ve b. Fabricius'ta atrofi yanısıra, bazılarında da bezli mide ve karaciğerde fazla yoğun olmayan atipik lenfoid hücre infiltrasyonları dışında bir bulguya rastlanmadı. Ölüm oranının yüksekliği ile karakterize akut Marek hastalığı formu, 19 tavukta saptandı. Bu forma soktuğumuz tavukların genel özelliği, genellikle 7-14 haftalık arası yaşta olmaları ve daha önce açıklanan tipik mikroskopik bulgulara sahip olmalarıydı. Ayrıca, bu hayvanların çoğunluğunda b. Fabricius atrofik durumdaydı. Bu forma giren bazı hayvanlarda da makroskopik bir bulgu gözlenmezken mikroskopik bakıda, bulgulara detaylı olarak açıklanan değişikliklerin tespit edilmesi, hastalığın tanısında histopatolojik incelemenin önemini göstermektedir. Ayrıca bu tip hayvanların hastalığın yayılmasında önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. Marek hastalığı şüpheli tavuklardan özellikle 4-10 haftalık yaşlardakilerden 15 adedinin b.Fabricius'larında makroskopik olarak da belirgin olan atrofi tespit edildi. Bu organların mikroskopik incelemelerinde tespit edilen ve daha önce açıklanan patolojik değişimlerin, Marek hastalığında b. Fabricius'ta bildirilen (1,3,5,7,12,14-16) değişimlerin bir çoğuyla uyumlu olduğu gözlemlendi. Fakat, bu konuda literatürde (8,12) bildirilen, lenfoid folliküllerdeki tümöral hücre artışına bağlı organdaki büyümeye, hiçbir hayvanda rastlanmadı.

Bazı çalışmalarda (7-9,11,12,17,34), en fazla makroskopik lezyonların sırasıyla karaciğer, dalak, n. ischiadicus, böbrek, akciğer, proventrikulus gibi

organlarda geliştiği bildirilmektedir. Çalışmada en fazla makroskopik lezyonun karaciğerde şekillendiği, bunu proventrikulus, dalak ve N. ischiadicus'un izlediği görülmektedir (Tablo 2). Çalışma bulgularının literatürle büyük oranda benzer olduğu görülmektedir. Yine bazı çalışmalarda (1,7,15) özellikle erken yaş dönemindeki (4-7 haftalık) hastalık durumlarında, diğer organlarda belirgin bir lezyon yokken veya çok az iken sadece proventrikulus mukozasında belirgin kalınlaşmaların şekillendiği belirtilmektedir. Çalışmada da literatürdeki (1,7,15,24) gibi 4-9 haftalık yaş dönemindeki 20 vakada bu organda makroskopik değişimler saptandı. Bazı literatürlerde (1,7,15) belirtildiği gibi bu organın özellikle erken dönemde Marek hastalığı'nın histopatolojik tanısı için önemli ve gerekli bir organ olduğu düşünülmektedir.

Hastalıkta bazı vakalarda, gerek klinik gerekse makroskopik ve histopatolojik bulgularla kesin tanının yapılamadığı bilinmektedir ve oluşan lezyonların benzerliğinden dolayı bazı hastalıklar ile karıştırılabileceği, literatürde (4,9,12,21,26,30) bildirilmektedir. Böyle durumlarda ek laboratuvar testlerinin yapılması gereği ortaya çıkar, bu da tanıda süreyi uzatarak, toplu yetiştirme yapılan tavukçuluk ünitelerinde önemli ekonomik kayıplara neden olabilir. Fakat bu çalışmada uygulandığı gibi, şüpheli vakalarda ilgili hastalığın pozitif serumu kullanılarak yapılan immunoperoksidaz boyama ile kesin sonucun en geç 48 saat içinde alınabilecek ve yapılacak ek laboratuvar testlerine gerek kalmadan, sonuca göre gerekli tedbirler alınarak önemli ekonomik kayıpların önüne geçilebilecektir.

Çalışmada uygulandığı gibi, immunoperoksidaz boyamalarla bir çok hastalığın kesin tanısının yapılabileceği literatürde (19,22,23,26,28) açıklanmaktadır. Marek hastalığı da bu hastalıklar arasındadır. Ayrıca, Marek hastalığı virusunun doku kültürüne ekimlerinde meydana gelen plakların tespitinin kolaylaştırılmasında, bu doku kültürlerine uygulanan immunoperoksidaz boyamaların kullanılabileceği, ayrıca kullanılan monoklonal orijinli pozitif serumun duyarlı olduğu antijenin hangi serotipe ait olduğunun da bu şekilde belirlenebileceği bildirilmektedir (27). Buna bağlı olarak aynı uygulamanın doku kültürüne ekilen diğer hastalık etkenlerinin burada hücrelerde meydana getirdiği değişimleri daha kolay tespit etmek amacıyla kullanılabilir.

Marek hastalığı'nın erken yaşlarda gözlenen akut formunun, bazen de transient paraliz formunun, b. Fabricius'taki lezyonların benzerliğinden dolayı Gumboro

hastalığı'yla karıştırıldığı, literatürde (3,5,14-16,34) bildirilmektedir. Çalışmada, Tablo 4'te görüldüğü gibi özellikle 20 günlük ile 7 haftalık arası yaşlardaki 10 adet tavukta tespit edilen histopatolojik bulgular sonucu da bunlara kesin Marek hastalığı tanısı konulamadı. Fakat bu hayvanların organlarından alınan kesitlere Marek hastalığı virusu 2BN-90 suşundan hazırlanan pozitif serumla yapılan immunoperoksidaz boyama sonucunda, şüpheli kesitlerden 6 adedinde Marek antijen pozitif hücreler tespit edilerek bunların kesin Marek hastalığı olduğuna karar verildi. Aynı şekilde, çalışmada 18-28 haftalık yaştaki 14 vakada histopatolojik muayenede olayın Marek mi, lenfoid lökosis mi, yoksa eritroblastozis mi olduğuna karar verilemedi. Bunlara da aynı şekilde Marek 2BN-90 pozitif serumu ile yapılan immun boyamada, 10 adedinde Marek antijen pozitif hücreler saptanarak bu vakaların da kesin olarak Marek hastalığı olduğu belirlendi (Tablo 4).

Marek virusunun değişik suşlarına ait monoklonal antikolar kullanılarak yapılan çalışmalarda (21,23,25,28,29,34) dalakta; retikulum hücrelerinde ve beyaz pulpada lenfoid hücrelerde, b. Fabricius'ta; interfolliküler alanlardaki retikuler makrofajlarda ve folliküllerde lenfoid hücrelerde, karaciğerde; sinüzoidleri döşeyen makrofajlarda ve gelişen lezyonlardaki lenfoid hücrelerde, proventrikulus'ta ise yine aynı tip hücrelerde pozitif boyanmaların meydana geldiği bildirilmiştir. Çalışmada da, başta karaciğer olmak üzere, bazı dalak, böbrek, b. Fabricius, proventrikulus, beyin ve beyincik kesitlerinde detayları bulgular bölümünde açıklandığı şekilde literatürde bildirildiği gibi (21,23,25,28,29), makrofajlar ve lenfoid hücreler içerisinde antijen pozitif boyanmalar saptandı. Sadece N. ischiadicus'lardaki boyamalarda antijen pozitif hücreye rastlanmadı. Bu çalışmadaki gibi, Marek hastalığına ilgili immunohistokimyasal çalışmalardan (21,23,25,28,29), sadece bir tanesinde (29) periferik sinirlerde lenfoblastlarda viral partiküllerin tespit edildiği bildirilmektedir.

Çalışmada, immunoperoksidaz boyamalarda bazı karaciğer, b. Fabricius, proventrikulus, böbrek ve dalak, kesitlerinde tek tek boyanan hücreler yanında, lezyonlu kısımlarda veya çevresinde, hücre dışlarında genişçe pozitif boyanan alanlar gözlemlendi. Bu görüntü sonuçları değerlendirme sırasında bizi başlangıçta şüpheye düşürdü. Fakat aynı kesitlere, ilgili hastalıkların sadece monoklonal pozitif serumlarının atlanarak veya SPF tavuk organlarından alınan kesitlere, aynı prosedürle yapılan

kontrol boyamalarında, kesitlerde bu pozitif gibi görünen boyanmaların meydana gelmemesi, hücre dışında da olsa bu tip boyanmaların hastalık etkenini gösteren pozitif antijen boyanmaları olduğunu ve bunların daha önce de belirtildiği gibi etkenlerin replike olduğu hücrelerin veya bunları fagosite eden makrofajların parçalanması sonucu çevreye yayılan antijen parçaları olduğunu düşündürdü.

Sonuç olarak Tablo 4'te görülebileceği gibi, histopatolojik incelemede Marek hastalığı şüpheli 24 vakanın LSAB tekniği ile boyanmasında 17 adedinin, histopatolojik incelemede Marek hastalığı olarak tanı konulan 26 vakanın 21 adedinin immunoperoksidaz boyanması sonucunda bunların da sadece 18 adedinin Marek hastalığı pozitif olduğu saptandı.

Kaynaklar

- Ademoğulları, N., Gürel, A., Çelik, M.: Piliçlerde Görülen Marek Olgularının Histopatolojik Yöntemlerle Teşhisi. *Pendik. Mikrobiyol. Derg.* 1993; 24: 81-89.
- Arda, M., Mimbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M.: Gumboro Hastalığı. *Kanatlı Hayvan Hastalıkları. Pfizer İlaçları. İstanbul.* 1990.
- Başkaya, H., Mimbay, A.: Marek Hastalığı. *A.Ü. Vet. Fak. Yay.: 354, Ders Kitabı: 252, Sayfa: 229-243, 246-252. Ankara.* 1974.
- Gürel, A., Yeşildere, T.: Civcivlerde Deneysel Olarak Oluşturulan Gumboro Hastalığında bursa Fabricius Lezyonları. *İ.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 1992; 19: 197-211.
- Jakowski, R.M., Fredrickson, T.M., Luginbuhl, R.E., Hemboch, C.F.: Early Changes in bursa of Fabricius from Marek's Disease. *Avian Dis.* 1969; 13: 215-222.
- Atılğan, T., Yeşilada, I.: Marek Hastalığından Korunma. *Bornova Vet. Araşt. Enst. Derg.* 1971; 23: 17-31.
- Çetin, İ.: İzmir Yöresinde Tavuklarda Marek Hastalığı ve Patolojik Karakteristikleri. *Hayv. Aşuları Kont. Merkez. Derg.* 1993; 17: 78-104
- Jordan, F.T.W.: *Poultry Diseases.* 3rd ed., 96-105, 177-181. Bailliere Tindall. London/England. 1990.
- Kutsal, O.: Bursa Yöresi Tavuklarında Görülen Marek Hastalığının Teşhisinde Deri ve İç Organ Bulguları Üzerinde Floresan Antikor ve Histolojik Yöntemler Kullanarak Yapılan Araştırmalar. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 1989; 36: 15-39.
- Gimeno, B.T., Witter, R.L., Reed, W.M.: Four Distinct Neurologic Syndromes in Marek's Disease: Effect of Viral Strain and Pathotype. *Avian Dis.* 1999; 43: 721-737.
- Heier, B.T., Jarp, J.: Risk Factor for Marek's Disease and Mortality in White Leghorns in Norway. *Prev. Vet. Med.* 2000; 44: 153-165.
- Calnek, B.W., Witter, R.L.: *Marek's Disease, Disease of Poultry.* Ninth Edition. Iowa State University Press. 342-385. Iowa. 1992.
- Ubertini, T., Calnek, B.W.: Marek's Disease Herpes Virus in Peripheral Nerve Lesions. *J. Natl. Cancer Inst.* 1970; 45: 507-514.
- Aksoy, E.: Kanatlılarda Marek Hastalığı ve Bursal Lezyonlar. *Etilik Vet. Mikrobiyol. Derg.* 1992; 7: 1-13.
- Fujimoto, Y., Okada, K., Kakihata, K., Matsui, T., Narita, M., Onuma, M., Mikama, T.: Initial Lesions in Chickens Infected with JM Strain of Marek's Disease Virus. *Jpn. J. Vet. Res.* 1974; 22: 80-94.
- Gürel, A., Yeşildere, T.: Civcivlerde Deneysel Olarak Oluşturulan Marek Hastalığında bursa Fabricius Lezyonları. *İ.Ü. Vet. Fak. Derg.* 1992; 19: 183 -195.
- Jani, P.B., Ghodasara, D.J., Khana, K., Prajapati, K.S.: Pathological and Serological Studies on Natural Outbreaks of Acute Marek's Disease in Chickens (Visceral) *Indian Vet. J.* 1993; 70: 108-112.
- Köküslü, C., Özkul, İ.A., Alçıgür, G.: Tavukların Lenfoid Leukozis, Retiküloendotheliosis ve Marek Hastalıklarının Ayrımsal Tanımında Uygulanan Histopatolojik Yöntemlerle İmmunofloresan Tekniği Sonuçlarının Karşılaştırılması. *DOGA TU Vet. Hay. D.* 1989; 13: 180-190.
- Aksoy, E.: Sığır Vebası Hastalığının Histolojik ve İmmunoperoksidaz Yöntemle Tanımı Üzerine Çalışmalar. *Doktora Tezi. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.* 1997.
- Can, A.: *Uygulamalı İmmunositokimya Teknikleri Kursu Kitapçığı.* A.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 8-10 Mayıs 1996, Ankara. 1996.
- Jeurissen, S.H.M., Janse, E.M., Kok, G.L., De Boer, G.F.: Distribution and Function of Non-Lymphoid Cells Positive for Monoclonal Antibody CVI-ChNL-68.2 in Health Chickens and Those Infected with Marek's Disease Virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1989; 22: 123-133.
- Bourgon, A.R., Charlton, K.M.: The demonstration of rabies antigen in paraffin embedded tissues using the peroxidase-antiperoxidase method. A comparative study. *Can. J. Vet. Res.* 1987; 51: 117-120.
- Cho, K.O., Ohashi, K., Onuma, M.: Electron Microscopic and Immunohistochemical Localisation of Marek's Disease (MD) Herpes Virus Particles in MD Skin Lymphomas. *Vet. Pathol.* 1999; 36: 314-320.
- Cruz-Coy, J.S., Grambrone, J.J., Hoerr, F.J.: Immunohistochemical detection of infectious bursal disease virus in formalian-fixed, paraffin embedded chicken tissues using monoclonal antibody. *Avian Dis.* 1993; 37: 577-581.

25. Jeurissen, S.H.M., Scholten, R., Hilgers, L.A., Pol, J.M.A., De Boer, G.F.: In situ Detection by Monoclonal Antibody D-35.1 of Cells Infected with Marek's Disease Virus that Interact with Splenic Ellipsoid-Associated Reticulum Cells. *Avian Dis.*, 1989; 33: 657-663.
26. McNeilly, F., Allan, G.M., Moffet, D.A., McNulty, M.S.: Detection of Chicken Anaemia Agent by Immunofluorescence and Immunoperoxidase Staining. *Avian Path.* 1991; 20: 125-132.
27. Silva, R.F., Calvert, J.G., Lee, L.F.: A Simple Immunoperoxidase Plaque Assay to Detect and Quantitate Marek's Disease Virus Plaques. *Avian Dis.* 1995; 41: 528-534.
28. Calnek, B.W., Hitchner, S.B.: Localisation of Viral Antigen in Chickens Infected with Marek's Disease Herpes Virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 1969; 43: 935-949.
29. Calnek, B.W., Ubertini, T., Addinger, H.K.: Viral Antigen, Virus Particles and Infectivity of Tissues from Chickens with Marek's Disease. *J. Natl. Cancer Inst.* 1970; 45: 341-351.
30. Yamamoto H., Yoshino, T.: Histopathologic Comparison of Marek's Disease with Avian Leucosis. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* 1972; 12: 29-42.
31. Luna, L.G.: *Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, 3rd ed. McGraw Hill Book Company. 1968.
32. Swayne, D.E., Fletcher, O.J., Schierman, L.W.: Marek's Disease Virus-Induced Transient Paralysis in Chicken: Demonstration of Vasogenic Brain Oedema by Immunohistochemical Method. *J. Comp. Path.*, 1989; 101: 451-462.
33. Witter, R.L., Gimeno, I.M., Reed, W.M., Bacon, L.D.: An Acute Form of Transient Paralysis Induced by Highly Virulent Strains of Marek's Disease Virus. *Avian Dis.* 1999; 43: 704-720.
34. Witter, R.L., Sharma, J. M.: Pathogenicity of Variant Marek's Disease Virus Isolants in Vaccinated and Unvaccinated chickens. *Avian Dis.* 1980; 24: 210-232.