VETERİNERLİK VİROLOJİSİ DERLEMELERİ

Editör:
B. Taylan KOÇ





BİDGE Yayınları

Veterinerlik Virolojisi Derlemeleri

Editör: B. TAYLAN KOÇ

ISBN: 978-625-5057-35-8

1. Baskı
Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL
Yayınlama Tarihi: 2026-10-25
BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374
Yayın hakları © BİDGE Yayınları
www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com
Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.
Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya / Ankara

İÇİNDEKİLER

KEDİLERDE HEPATOTROPİK VİRUSLAR 1
ZEYNEP DEĞİRMENCİ, BAHATTİN TAYLAN KOÇ

ENDOJEN RETROVIRUSLER 35
TEMMUZ EYLEM YAYGIN, B. TAYLAN KOÇ

EMBRİYOLU TAVUK YUMURTASINA VİRUS İNOKÜLASYON YÖNTEMLERİ 63
YUNUS ÇAKICI, IRMAK DİK

ASSOCIATIONS BETWEEN SARS-COV-2 INFECTION, COVID-19 VACCINATION, AND AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS 101
AYŞEN ALTINER

BÖLÜM 1

KEDİLERDE HEPATOTROPİK VİRUSLAR

Zeynep DEĞİRMENCİ[1]
B. Taylan KOÇ[2]

Giriş

Karaciğer, kedilerde metabolik homeostasisin sürdürülmesi, detoksifikasyon ve immün yanıtın düzenlenmesinde merkezi bir rol oynamaktadır (Frogley, 2013). Hayati bir öneme sahip olan karaciğer, anatomik konumu ve işlevi gereği patojenlerin hedefi haline gelerek inflamatuar hastalıklara açık bir yapı sunmaktadır (Keller, 2017).

Karaciğerin yüksek fonksiyonel rezervi nedeniyle hepatik patolojiler genellikle sinsi bir şekilde seyretmektedir. Hastalığın erken evrelerinde ortaya çıkan; anoreksi, letarji ve kusma gibi non-spesifik semptomlar gastrointestinal bir rahatsızlık olarak yorumlanabilmektedir. Hastalığın progresyonu ile birlikte ikterus, asites, hepatik ensefalopati gibi klinik olarak belirgin semptomlar ortaya çıkmaktadır (Negasee, 2021). Klinik tablonun başlangıçta maskelenmiş şekilde ilerlemesi, arka planda seyreden enfeksiyöz süreçlerin teşhisini de zorlaştırmaktadır (Rondeau, 2014).

[1] Vet. Hek. Zeynep Değirmenci, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Orcid: 0009-0003-0940-5311
[2] Doç. Dr. Bahattin Taylan Koç, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Orcid: 0000-0002-4279-6233

Ancak son yıllarda veteriner viroloji alanındaki gelişmeler, kedilerde kronik karaciğer hastalıklarının arkasındaki gizli viral etkenleri ortaya çıkarmaktadır. Yapılan araştırmalar göz önüne alındığında; Domestic Cat Hepadnavirus (DCH), Feline İnfeksiyöz Peritonitis (FIP) ve Hepatit E virusu'nun hem Türkiye hem de dünya çapında görülmekte olan hepatotropik viral ajanlar arasında yer aldığı tespit edilmiştir (Capozza ve ark., 2021a; Adıgüzel ve ark., 2023). Ayrıca Feline Calisivirus (FCV), Feline Panlökopeni Virus (FPV) ve Feline Lösemi Virus (FeLV) viruslarının da karaciğere yönelik sekonder etkilerinin bulunduğu görülmüştür (Caringella ve ark., 2019; Lamuanpuii ve ark., 2025; Reinacher ve Theilen, 1987).

Feline İnfeksiyöz Peritonitis (FIP)

1. Etiyoloji

Feline koronavirus (FCoV), *Coronaviridae* ailesinin *Alphacoronavirus* cinsinde yer alan, yaklaşık 30 kb uzunluğunda tek sarmallı, zarflı bir RNA virusudur (Hartmann, 2005; Barker ve Tasker, 2020). Koronavirus genomu; Viral RNA polimeraz ve proteazları oluşturan büyük bir poliprotein (pp1a; pp1ab), hücreye girişi sağlayan trimerik Spike (S) glikoproteini, genomik RNA ile etkileşen Nükleokapsid (N) proteini, viral zarfı oluşturan E ve M (Matriks) proteinlerinden oluşmaktadır (Barker ve Tasker, 2020).

FCov; in vitro büyüme özellikleri, genomik yapısı ve antijenitesine göre dünya genelinde enfeksiyonların çoğunu oluşturan Tip I ve hücre kültüründen izole etmeye daha uygun olan Tip II olarak sınıflandırılır (Tasker ve ark., 2023). Patojenitesine göre ise kedi enterik koronavirusu (FECV) ve kedi enfeksiyöz peritonit virusu (FIPV) olarak adlandırılan iki biyotipe ayrılmaktadır (Tekes ve Thiel, 2016).

2. Epidemiyoloji

İlk kez 1963 yılında tanımlanan hastalık Felidae ailesindeki tüm üyeleri etkilemekte ve dünya genelinde görülmektedir (Chappuis ve Duret, 1978; Holzworth, 1963; Tasker ve ark., 2023). Enfeksiyon fekal-oral yolla yayılır ve virus bulaştıktan sonraki bir hafta içinde dışkıda virus saçılımı gerçekleşir (Pedersen ve ark., 2008). Virus saçılımı genellikle birkaç haftadan birkaç aya kadar

sürer, bazıları ömür boyu kalıcı enfeksiyon olarak yaymaya devam etmektedir (Tasker ve ark., 2023).

FCoV ve dolayısıyla FIP, kalabalık ortamlarda yaygındır özellikle küçük bir alanda birçok kedinin bir arada tutulduğu ortamlarda yaygın olarak görülmektedir. FIP geliştirme riski, bağışıklık sistemi zayıf ve iki yaşının altındaki kedilerde daha yüksektir bu yüzden yavru kediler yetişkinlere göre daha yüksek risk altındadır (Hartmann, 2005; Hu ve ark., 2024). FCoV, çok kedili ortamlarda oldukça yaygın olup kedilerin %90 kadarını enfekte etmesine rağmen enfekte olan bireylerin yalnızca %5-10'unda FIP gelişmektedir (Tasker ve ark., 2023).

Birkaç izole ada haricinde FCoV enfeksiyonu dünya çapında bildirilmiştir (Tasker ve ark., 2023). Türkiye'de ise antikor seroprevalansının %90'ın üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Yuzbasioglu Ozturk ve ark., 2025).

3. Patogenez

FIPV'nin FECV ile enfekte olmuş kedilerin viral genomlarında meydana gelen delesyon mutasyonları yoluyla evrimleştiği hipotezi bulunmaktadır ve bu mutasyonların 3c, 7b ORF bölümlerinde ve S geninde oluştuğu görülmüştür (Vennema ve ark., 1998; Chang ve ark., 2012). İçsel mutasyon teorisine göre enterositlerden makrofajlara geçen tropizm ve sonucunda çoklu organ tutulumu oluşmasıyla birlikte ölümcül bir hastalık haline gelmiştir (Kipar ve Meli, 2014). Mutasyonun meydana gelmesinden yaklaşık 14 gün sonra makrofajlar tarafından tüm vücuda dağıtılan mutasyona uğramış viruslar; kör bağırsak, kolon, bağırsak lenf düğümleri, dalak, karaciğer ve merkezi sinir sisteminde bulunmaktadır (Hartmann, 2005).

FIP patogenezinde, monosit ve makrofajlarda FCoV replikasyonunun gerçekleşmesi önemli bir rol oynamaktadır. Monositler damar duvarına tutunarak metalloproteinaz-9 salgılayarak bazal laminanın yapısını bozmaktadır. Ardından damar dışına çıkarak makrofajlara dönüşmektedir. Bu süreçte, immun komplekslerin birikimi ve yoğun inflamatuar yanıt damar geçirgenliğini arttırmaktadır. Endotelyal bağlantıların bozulması

plazmanın damar dışına sızmasına ve sonucunda perikardiyal boşluklarda efüzyonla kendini gösteren klinik belirtilerin gözlenmesine yol açmaktadır (Tasker ve ark., 2023).

FECV nin monositlerde de çoğaldığı düşünüldüğünde mutasyonun epitel hücreleri yerine monositlerde meydana geldiği de düşünülmektedir. Virusun intravasküler makrofajlar ve kupfer hücrelerini enfekte ettiği bilinmektedir. Kandaki partikülleri fagosite ettikleri sırada mutasyonun meydana geldiği ve sonrasında çoğalarak kana verildiği düşünülürse bu şekilde tüm sistemlere yayılabildiği sonucuna varılabilmektedir (Kipar ve Meli, 2014).

4. Klinik Bulgular

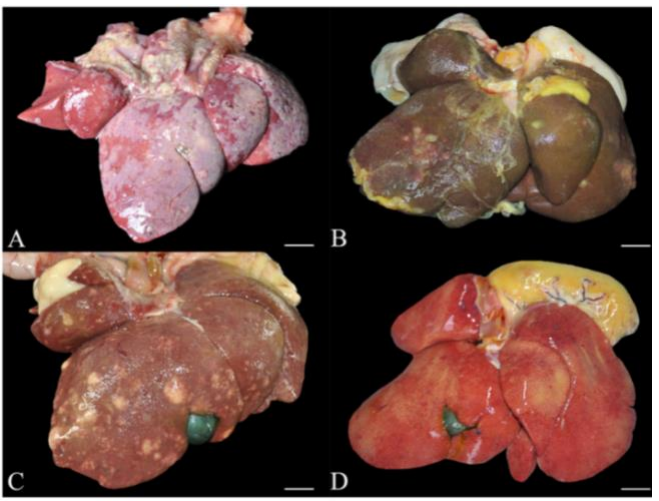
FIP, primer viral hasardan çok konağın immün yanıtına bağlı gelişen bir aşırı duyarlılık reaksiyonudur (Hartmann, 2017). FIP'in spesifik olmayan belirtileri arasında iştahsızlık, uyuşukluk, lenfadenopati, kilo kaybı ve genellikle antibiyotiklere yanıt vermeyen ateş bulunur. Son evrede ise, lenfopeni ve normositer normokromik anemi ile birlikte spesifik olmayan lökositoz gibi bulguları içermektedir (Mir ve ark., 2025).

FIP, klinik olarak ıslak (efüzif) form ve kuru form olmak üzere sınıflandırılmıştır (Ozturk ve ark., 2025). Islak formda kan damarlarının inflamasyonu sonucunda vasküler geçirgenlik artar; abdominal, torasik ve perikardiyal boşluklarda efüzyon şekillenir (Solikhah ve ark., 2024). Kuru formda; bölgeye bağlı olarak değişmekle birlikte karaciğer, dalak, böbrek, pankreas ve bağırsaklarda granülomatoz lezyonlar ve sinir tutulumu meydana gelir (Solikhah ve ark., 2024; Tasker ve ark., 2023). Abdominal bölgede granülomu bulunan kedilerde mezenterik lenfadenopati, omental yapışıklıklar, pankreatit, splenomegali hepatomegali, ikterus ve karaciğer yetmezliği belirtileri görülmektedir (Sherding, 2009). FIP'teki patolojik bulgular iyi belgelenmiş olsa da, literatürde FIP tanılı kedilerde hepatik lezyonlara yönelik çalışmalar sınırlıdır. Ancak mevcut bulgular kayda değer oranda karaciğer inflamasyonunun şekillendiğini ortaya koymaktadır (Cony ve ark., 2024; Ozturk ve ark., 2025; Müller ve ark., 2023).

FIP'te ultrason bulgularını araştıran bir çalışmada kedilerin %80'inde diffüz veya fokal hepatik ultrasonografik değişiklikler bulunmuş; bunların %52'sinde hepatomegali, %48'inde ise diffüz hipoekojenite görülmüştür (Müller ve ark., 2023).

FIP teşhisi konulan 131 kedi üzerinde yapılan karaciğer lezyonlarına yönelik çalışmada 59 kedinin karaciğerinde inflamasyona yönelik saptanan lezyonlar Resim 1'de gösterilmiştir. Karaciğer örneklerinin %35,6'sında perihepatit görülmüştür, (şekil A). Perihepatitli (%30,5) kedilerde beyaz ve sarı renkte multifokal nodüller görülmüştür (Şekil B). %22'sinde karaciğer parankimi boyunca dağılmış çok odaklı beyaz ve sarı renkli nodül varlığı tespit edilmiştir (Şekil C). %11,9'unda yaygın karaciğer lezyonları ve hepatomegali varlığı saptanmıştır (Şekil D). Karaciğerinde patolojik lezyonlar bulunan kediler FIP'in hem kuru hem de effüzif formunda tespit edilmiştir (Cony ve ark., 2024).

Resim 1 Karaciğer Lezyonları



Kaynak: Cony ve ark., 2024

5. Tanı

Hastanın 2 yaşından küçük olması, çok kedili ortam ve klinik bulgular yol göstericidir (Tasker ve ark., 2023).

Hematolojik olarak anemi, trombositopeni ve efüzyonlu kedilerde lenfopeni görülmektedir (Felten ve Hartmann, 2019). Biyokimyasal olarak hiperglobülinemi, hipoalbuminemi ve düşük albümin/globülin (A:G) oranı görülmektedir. A:G oranının <0,4 olması durumunda FIP olasılığını yüksek, A:G oranının >0,8 olması ise düşük kılmaktadır (Esin ve ark., 2025; Tasker, 2018).

Serum biyokimya bulgularında hiperglobulinemi ve hipoalbunemi görülmesi sonucu (ALB/GLOB) oranının düştüğü tespit edilmiştir (Esin ve ark., 2025; Moyadee ve ark., 2024). A:G oranının <0,4 olması durumunda FIP olasılığının çok yüksek olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda karaciğer enzimlerinde (ALT, AST) artış ve hiperbilirubinemi tespit edilmiştir (Norris ve ark., 2005; Sherding, 2009).

Tanıda effüzyon analizinden yararlanılmaktadır. Islak FIP formunda; abdomen, toraks ve perikartta sarı renkte, yüksek proteinli sıvı birikimi olması tipiktir. Efüzyona rivalta testinin uygulunarak pozitif sonuç vermesi ve sitoloji yapılarak dejenere olmamış nötrofiller ve makrofajların görülmesi tanıyı güçlendirmektedir (Tasker ve ark., 2023).

Efüzyon sitolojisi ve biyokimyası FIP ile uyumlu olduğu belirlendiğinde viral Nükleik asidin RT-PCR ile tespit edilmesi teşhis yöntemlerinden biridir (Thayer ve ark., 2022). Ancak RT-PCR biyotipleri ayırt edememekte, antikor testleri ise taşıyıcıların pozitif çıkması nedeniyle sınırlı değer taşımaktadır (Kipar ve Meli, 2014). Kesin tanı için doku örneklerinde FCoV antijeninin immünohistokimyasal boyanması altın standart kabul edilir (Felten ve Hartmann, 2019).

6. Tedavi

GS-441524: Remdesivir ile ilişkili bir antiviral olan GS-441524 gibi nükleozit analogları, virusun RNA'sını çoğaltma yeteneğini engelleyerek viral çoğalmayı durdurma prensibiyle çalışmaktadır (Mir ve ark., 2025). GS-441524'ün aktif NTP (nükleozit trifosfat) analoğu, viral RNA sentezi sırasında doğal nükleozit trifosfatlar ile yarışmalı bir etkileşime girerek inhibitör görevi üstlenmektedir. Aktif formunun, yeni sentezlenen viral

transkriptin yapısına katılarak erken zincir sonlanmasına yol açtığı ve bu mekanizmayla RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRp) aracılı transkripsiyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Murphy ve ark., 2018). FIP'li kedilerde yapılan çalışmalarda tedavide GS441524'ün kullanılmasının efektif olduğu bulunmuştur (Pedersen ve ark., 2019). 2018-2024 yılları arasında GS441524 etkinliğiyle ilgili yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde klinik başarı oranı 80.6% olarak bulunmuş ve %4'ü nüks sonrası tekrardan ilaç kullanımıyla iyileşmiştir (Gokalsing ve ark., 2025). GS-441524 ilaçlarının potansiyel faydaları yapılan çalışmalarla vurgulanmaktadır ancak onaylanmamış bu tedavilerin yaygın kullanımıyla ilgili birçok endişe devam etmektedir; bunlar arasında dirençli viral suşların ortaya çıkma olasılığı bulunmaktadır (Delaplace ve ark., 2021).

Remdesivir (GS-5734): Çeşitli RNA viruslarına karşı geniş antiviral aktiviteye sahip bir nükleozit analoğudur. Tek bir diastereomer olan Remdesivir, bir ön ilaç olarak monofosforamidattır ve uygulandıktan sonra aktif form olan GS-441524'e dönüştürülür (Bakheit ve ark., 2023). Remdesivir, oral yolla uygulanan GS-441524'e göre daha pahalı bulunmuştur ayrıca intravenöz ve subkutan uygulandığı için stres faktörü oluşturduğu düşünülmektedir (Taylor ve ark., 2023).

Molnupiravir (EIDD-2801): Koronaviruslar da dahil olmak üzere geniş spektrumlu antiviral aktiviteye sahip, ağızdan alınabilen bir ribonükleosit analogu ön ilaçtır. Aktif metaboliti EIDD-1931, translasyonel mutagenezi uyararak ve RNA'ya bağımlı RNA polimerazı bozarak koronavirus replikasyonunu inhibe etme prensibiyle çalışmaktadır (Clark ve ark., 2025). Molnupiravir ile tedavi edilen 18 kediden 14'ünde iyileşme olduğu görülmüştür (Sase, 2023).

Molnupiravir'e yanıt, GS-441524'e göre daha yavaş olabilmektedir. Ayrıca yan etkileri değerlendirildiğinde GS-441524 gibi diğer nükleozit analoglarının tercih edilmesinin daha uygun olacağı düşünülmektedir (Tasker ve ark., 2026).

Proteaz inhibitörü (GC376): Koronaviruslar, konakçının transkripsiyon mekanizmasını kullanarak, pp1a ve pp1ab olmak üzere iki örtüşen poliprotein kodlarlar; bu poliproteinler,

koronavirus tarafından kodlanan proteazlar olan papain benzeri proteaz (PLpro) ve ana proteaz (3CLpro) tarafından parçalanır ve viral replikasyon için gerekli olan yapısal olmayan proteinler meydana gelir. Bu nedenle Mpro koronaviruslara karşı ilaç geliştirme konusunda cazip bir hedeftir (Lu ve ark., 2022). Proteaz inhibitörü olan GC376 ile yapılan bir çalışmada, 20 kediden 19'una 2 hafta içerisinde iyileşme gözlemlenmiş fakat 13'ünde ilerleyen zamanda nüks görülmüştür (Pedersen ve ark., 2018).

Aşı: FIP tedavisinde, virüsün yüksek mutasyon hızı nedeniyle gelişen direnç ve sentetik bileşiklerin hücresel düzeydeki toksisitesi, mevcut terapötik etkinlikleri sınırlandırmaktadır. Benzer şekilde aşı çalışmalarında da S proteinini hedefleyen tasarımlar, nötralizan epitoplar ile ADE (Antikor Aracılı Gelişme) epitoplarının yakın ilişkisi nedeniyle daha şiddetli enfeksiyonları tetikleyebilmekte; M ve N protein tabanlı alternatifler ise mutant suşlara karşı yetersiz koruma sağlamaktadır (Gao ve Wen, 2025).

FIP patogenezinde kritik bir rol ADE mekanizması; virusa spesifik antikorların varlığına rağmen, FCoV'lerin makrofajlara girişinin kolaylaşmasıyla daha şiddetli ve ölümcül bir hastalık formunun tetiklenmesine neden olmaktadır. Klinik çalışmalarda, aşılama sonrası ADE reaksiyonunun şekillenmesi, etkili ve güvenli aşı tasarımını büyük ölçüde zorlaştırmıştır (Hartmann, 2005). WSAVA (Dünya Küçük Hayvan Veteriner Hekimleri Birliği) aşı rehberinde FIP aşısı önerilmeyen kategorisinde değerlendirmiştir (Day ve ark., 2016).

Koruma Kontrol için stres faktörleri azaltılmalı, fekal-oral bulaş nedeniyle kum ve mama kaplarının hijyenine önem verilmelidir (Sherding, 2009).

Hepatit E

Hepatit E Virusu; *Hepeviridae* ailesine, *Orthohepevirus* cinsine aittir ve Orthohepevirus A'dan D'ye kadar 4 türü içermektedir (Smith ve ark., 2014). Orthohepevirus A, HEV-1'den HEV-8'e kadar sekiz genotipten oluşmaktadır. HEV 1,2,3,4,7 genotiplerinin insanları enfekte ettiği bilinmektedir (Velavan ve ark., 2021). HEV3 ve HEV4 çoğunlukla gelişmiş bölgelerde görülen zoonotik viruslardır. İçme suyunun dışkı ile kontamine olması veya enfekte

hayvanlardan elde edilen etin tüketilmesi yoluyla insanlara bulaşmaktadır (Kamar ve ark., 2017). Hepeviridae ailesinde; memelileri, kuşları ve balıkları enfekte eden, bağırsak yoluyla bulaşan küçük, yarı zarflı veya zarfsız, tek sarmallı pozitif polariteli RNA virusları bulunmaktadır (Purdy ve ark., 2022). Hepatit E (HEV), 27-34 nm çapında, tek sarmallı pozitif yönlü RNA genomuna sahip, zarfsız küçük bir virustur (Kamar ve ark., 2017).

Hepatit E'nin halk sağlığı açısından önemi çok büyüktür. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, her yıl dünya genelinde tahmini 20 milyon hepatit E virusu (HEV) enfeksiyonu meydana gelmektedir (World Health Organization [WHO], 2023). Hepatit E virusu, insanlarda kendiliğinden iyileşen akut hepatite neden olmaktadır ve kontamine su, çiğ et tüketimi, kan transfüzyonu ve organ nakli yoluyla bulaşmaktadır (Purdy ve ark., 2022).

Evcil domuzlar, yaban domuzları, geyikler ve tavşanlar gibi memelileri enfekte eden HEV suşları, insanlarda zoonotik enfeksiyonlara neden olmasıyla hayvan rezervuarlarının önemi açıkça ortaya çıkmıştır (Kamar ve ark., 2014). Amerika Birleşik Devletleri'nde, domuz veteriner hekimlerinin kontrol gruplarına göre HEV antikorları için seropozitif olma olasılığı 1,51 kat daha fazla bulunmuştur (Wang ve Meng, 2021). Son yıllarda sokak kedi ve köpeklerinin sayısı artmaktadır ve bu artış HEV de dahil olmak üzere zoonotik patojenlerin bulaşması için potansiyel kaynaklar olarak kabul edilmektedir (Caballero-Gómez ve ark., 2022). Kedilerin de insanlar için potansiyel bir HEV enfeksiyon kaynağı olabileceği ilk kez 2003 yılında, Japonya'da yaşamakta olan bir adamın açıklanamayan bir şekilde akut hepatit E geçirmesi ve kedisinden alınan kanda HEV antikorunun çıkması sonucu öne sürülmüştür. Fakat aynı enfekte gıdayı tüketme ihtimalleri göz önüne alındığında kesin bir sonuca varılamamaktadır (Kuno ve ark., 2003).

1. Epidemiyoloji

İspanya‘da kedilerden toplanan 144 kan numunesinde %2.8 seropozitiflik bulunmuştur (Caballero-Gómez ve ark., 2022). İtalya’da 324 kedi serum örneğinden genel prevalans %3,1 olarak bulunmuşur ve ek olarak akut karaciğer hastalığı olan bir kedinin de HEV pozitif olduğu tespit edilmiştir (Capozza ve ark., 2021b).

Hollanda'da kedi serum örneklerinde %14,89 oranında anti-HEV antikoru bulunmuştur fakat dışkıda veya serumda HEV RNA'sı saptanamamıştır (Li ve ark., 2020). Türkiye'de ise çalışma grubunun %5,4'ü seropozitif olarak bulunmuştur (Cagirgan ve ark., 2022). Ayrıca Çin'de yapılan bir çalışmada mutfak artıklarıyla beslenen kedilerde HEV antikorunun varlığı, sadece paketli mamayla beslenen kedilere göre önemli ölçüde yüksek bir oranda saptanmıştır (Liang ve ark., 2014). Kedilerde HEV antikoru varlığı kanıtlanmış olmasına rağmen kedilerde herhangi bir spesifik klinik bulgu tespit edilememiştir (Capozza ve ark., 2021b).

Sonuç olarak, evcil hayvanlarda önemli oranda HEV maruziyeti olduğu ve hayvanlarla yakın temasta bulunan insanlar için potansiyel olarak bulaşıcı olduğunu göstermektedir. Buna paralel olarak, genel nüfusla karşılaştırıldığında, veteriner hekimler ve köpek çiftliği çalışanlarının anti-HEV antikor pozitifliğinin önemli ölçüde daha yüksek olduğu görülmüştür (Zeng ve ark., 2017). HEV enfeksiyonun zoonotik potansiyeli göz önüne alındığında hastalığın gözetimi ve kontrolünde Tek sağlık yaklaşımı gün geçtikçe önem kazanmaktadır (Prpić ve Baymakova 2023).

Domestic Cat Hepadnavirus (DCH)

1. Etiyoloji

Hepadnaviridae ailesi; 3.0–3.4 kb büyüklüğünde, kısmi çift sarmallı DNA genomuna sahip, küçük ve zarflı viruslardan oluşmaktadır. Hepadnavirusların replikasyon süreçleri, hepatosit sitoplazmasındaki nükleokapsid içerisinde gerçekleşen reverse transkripsiyon aşamasını içermektedir. Aile bünyesinde beş cins bulunmaktadır: *Parahepadnavirus*, *Metahepadnavirus*, *Herpetohepadnavirus*, *Avihepadnavirus* ve *Orthohepadnavirus* (Magnius ve ark., 2020). Primatlar, yarasalar ve kemirgenler dâhil çeşitli memelileri enfekte eden *Orthohepadnavirus* cinsi üyeleri hepatotropiktir (Aghazadeh ve ark., 2018; Karayiannis, 2017)

İnsan Hepatit B Virusu olarak bilinen HBV siroz ve hepatosellüler karsinom (HCC) gibi komplikasyonlarla ilişkili önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olmasıyla ciddi bir küresel sağlık sorunudur (Abdelhamed ve El-Kassas, 2024). Hepatit B

enfekte 2022 yılı verilerine göre 254 milyon insan bulunmaktadır (Global Hepatitis report, 2024).

HBV, hepatositlerde pregenomik RNA (pgRNA)'nın ters transkripsiyonu aracılığıyla çoğalmaktadır. Virusun preS1 alanı; hepatositlerin yüzeyinde bulunan, besin ve safra tuzlarını içeri almak için kullanılan heparan sülfat proteoglikanlarına (HSPG'ler) ve sodyum taurokolat kotransport polipeptit (NTCP) reseptörüne bağlanmaktadır. İçeriye giren pgRNA, mikrotubüller aracılığıyla çekirdeğe ulaşmaktadır (Gómez-Moreno ve Ploss, 2024).

HBV'nin ters transkriptaz enzimi olan P proteini, sentezlendiğinde aktif formda değildir. Enzimin işlevsel hale gelmesi için hücre içindeki şaperon proteinleri (Hsp70 ve Hsp40) kullanılır. Şaperonlar, P proteininin yapısını değiştirerek RNA bağlama bölgesini açar. Aktif hale gelen P proteini saç tokası şeklindeki epsilon (ε) dizisine bağlanır ardından kısa bir DNA parçası sentezlenir. Sentezlenen DNA, pgRNA'nın 5' ucundan koparak 3' ucunda bulunan DR1 bölgesine taşınır. Pozitif ipliğin sentezi ise kalan küçük RNA parçasının DR2 bölgesine transferi ile gerçekleşir. (Nassal, 2008; Chuang ve ark., 2022).

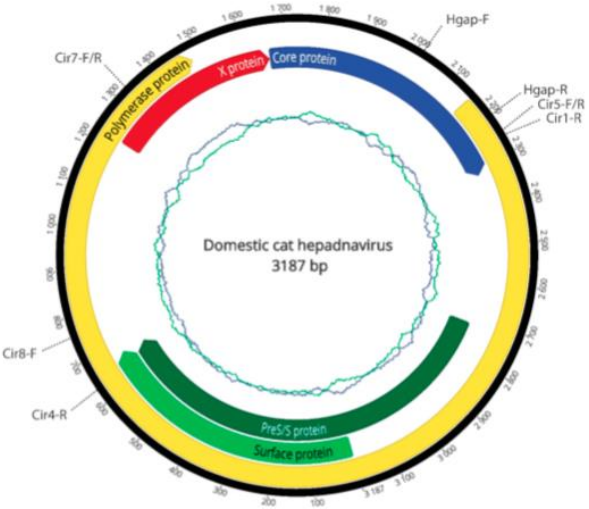
Virusun çoğalabilmesi için RNA'ları üzerinde bazı kimyasal değişiklikler meydana gelmektedir. Adenozin bazının 6. azot atomuna bir metil grubunun eklenmesiyle oluşan metiladenozin (m6A), Hepatit B Virusunun (HBV) döngüsünü viral RNA üzerindeki konumuna ve etkileşime girdiği okuyucu proteinlere bağlı olarak farklı şekillerde etkiler. 3' ucunda m6A modifikasyonu, okuyucu proteinler tarafından tanınarak viral RNA'nın stabilitesinin azalmasına neden olurken, 5' ucundaki epsilon (ε) yapısına m6A modifikasyonu, virusun ters transkripsiyon aktivitesini pozitif yönde etkilemektedir (Kim ve Siddiqui, 2021).

HBV, kendi RNA'larını m6A ile modifiye ederek hücrenin bağışıklık sensörleri olan RIG-I proteininden gizlenir, RNA'nın yabancı olarak tanımasını engeller ve böylece interferon üretimini baskılayarak virusun bağışıklık sisteminden kaçmasını sağlar (Moon ve ark., 2023).

HBV ile aynı ailede bulunan ve 42–50 nm çapında, kısmen çift sarmallı, dairesel bir DNA virusu olan Evcil Kedi Hepadnavirusu (DCH), ilk olarak Avustralya'da multisentrik B-hücreli lenfoma ve Feline İmmün Yetmezlik virusu enfeksiyonu bulunan bir kedide tespit edilmiştir (Aghazadeh ve ark., 2018). Yaklaşık 3.2 kb uzunluğundaki genomu: polimeraz (P/L), surface (S), core (C) ve X proteinlerini kodlayan üst üste kesişen açık okuma çerçevesine (ORF**)** sahiptir. (Aghazadeh ve ark., 2018; Capozza ve ark., 2021a). DCH genomik yapısı Resim 2'de gösterilmiştir. HBV'de C proteinleri nükleokapsidi bir araya getirmek, nükleozomların aralığını düzenlemek amacıyla cccDNA'ya bağlanır. Aynı zamanda reverse transkripsiyonu başlatmada ve olgun nükleokapsidin zarflanmasında aktif bir rol oynamaktadır (Lamontagne ve ark., 2016). X proteini, Orthohepadnavirusler'in konak olarak memelilere adapte olması sırasında kazanılan bir fonksiyondur (Lauber ve ark., 2017). Replikasyon ve enfeksiyonda önemli rol oynayan HBx'in doğrudan onkogenik mi yoksa HCC gelişiminde yalnızca kofaktör mü olduğu henüz netleşmemiştir (Lamontagne ve ark., 2016). HBX proteini, sitozolde m6A bağlanmasını sağlayan METTL3 ve METTL14 proteinleri ile etkileşime girerek bu proteinlerin çekirdeğe taşınmasını teşvik eder. Çekirdekte bu kompleksi cccDNA'ya yönlendirir ve bu sayede viral RNA'ların henüz sentez aşamasındayken m6A ile modifiye edilmesi sağlanır (Moon ve ark., 2023). Viral bağlanmada önemli rol oynayan S proteinleri (yüzey proteinleri) S, preS2 ve preS1 olmak üzere üç bölgeden oluşmaktadır (Churin ve ark., 2015). P geni, en büyük ORF'dir. Viral genomun yaklaşık %80'ini oluşturur ve diğer tüm ORF'lerle örtüşür. DNA polimerazı kodlar ve bu polimeraz dört alan içerir. Bu alanlar, eksi iplikli DNA sentezi için astar görevi gören terminal protein (TP) alanı, bir "ara" alan, katalitik ters transkriptaz (RT) alanı ve RNase H alanıdır (Chuang ve ark., 2022).

DCH ve HBV, Orthohepadnavirus cinsinde birlikte gruplandırılmış olsalar da DCH'nin her bir viral proteininin işlevi henüz aydınlatılmamıştır fakat genomik yapılarındaki benzerlikler dikkat çekmektedir (Shofa ve ark., 2023; Koç ve ark., 2024).

Resim 2 DCH Genomik Yapısı



Kaynak: Aghazadeh ve ark., 2018

2. Epidemiyoloji

Henüz bulaşma şekline yönelik kesin bir bilgi olmamakla birlikte insanlarda HBV bulaşımının kan ve diğer vücut sıvıları yoluyla gerçekleştiği bilinmektedir (MacLachlan ve Cowie, 2015). DCH için de benzer bulaşma şekillerinin varsayılabileceği düşünülmektedir (Lanave ve ark., 2019). Son yıllarda yapılan bir çalışmada, kanında DCH virusuna ait DNA bulunan kedilerden alınan oral, nazal, rektal ve vajinal sürüntü örneklerinde virus varlığı saptanmıştır. Vajinal sekresyonda virus DNA'sının bulunması, kedilerin cinsel temas yoluyla virusu yaydığını düşündürmektedir (Pellegrini ve ark., 2026).

Yapılan literatür taramasında Avustralya, Hong Kong (%11,1), USA (%1,3), Malezya (12,3), Tayland (%18,5), Japonya (%0,78), İtalya (%10,8), ve Türkiye'de (%4 ve %11,6) oranlarında DCH varlığının bildirildiği görülmüştür. Bu durum DCH enfeksiyonunun klinik açıdan önemini ve yaygınlığını göstermektedir (Adıgüzel ve ark., 2023; Aghazadeh ve ark., 2018; Anpuanandam ve ark., 2021; Capozza ve ark.,2023a; Chen ve ark., 2025; Korkulu ve ark., 2024; Lanave ve ark., 2019; Piewbang ve ark., 2022; Takahashi ve ark., 2022). Avustralya, Asya ve Avrupa suşları Genotip A olarak isimlendirilmiştir. Japonya ve Brezilya'da

tespit edilen suş ise Genotip B olarak adlandırılmıştır (Capozza ve ark., 2023a; Tessmann ve ark., 2025). Tayland'daki evcil kedi hepadnavirusu (DCH) suşları üzerinde yapılan analizler, CP23S THA/2016 suşundaki C geninde homolog bir rekombinasyon olayını ortaya koymuştur. Coğrafi bakımdan farklı mutasyonlar sonucu suşlar arasındaki rekombinasyonların olabileceği düşünülmektedir (Piewbang ve ark., 2020).

Ülkemizde Domestic Cat Hepadnavirusa yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda rastgele seçilen kan örnekleri kullanılmıştır ve 550 örnek arasında 22 pozitiflik bulunmuştur (Adıgüzel ve ark., 2023), FeLV ile enfekte olduğu bilinen numunelerle yapılan araştırmada %11,6 oranında kedinin DCH ile koenfekte olduğu bulunmuştur (Korkulu ve ark., 2024).

3. Patogenez

HBV ve DCH, konak hücre hepatositlerine giriş sürecinde kritik rol oynayan NTCP yüzey reseptörüne bağlanma işlemini preS1 peptidi aracılığıyla gerçekleştirmektedir (Shofa ve ark., 2023). DCH'nin pregenomik RNA yapısında, İnsan Hepatit B virusundaki yapıya benzer güçlü bir saç tokası (stem-loop) yapısı gösteren bir epsilon dizisi tanımlanmıştır. Bu yapılar, hepadnavirus replikasyonu için gerekli olup, özellikle pre-genomik RNA'nın ters transkripsiyonunun başlatılmasında rol oynamaktadır. Epsilon dizisindeki çıkıntı bölgesinde yer alan üç nükleotitlik UUC dizisinin, hem DCH hem de HBV'de aynı olması benzer replikasyon mekanizmasına sahip olabileceklerini düşündürmektedir (Capozza ve ark., 2023b). DCH DNA'sı sitoplazmada bir araya getirildikten sonra ER'ye tomurcuklanarak taşınır. DCH gelişim süreci, ER'de zarın içe doğru kıvrılmasıyla kurbağa yavrusu benzeri bir yapı oluşturarak gerçekleşir. Daha sonra, ER zarının aktivitesiyle virus zarfı gelişir ve son olarak tomurcuklanma süreciyle tamamlanmış DCH virionunu dışarı atmak üzere plazma zarına taşınır (Piewbang ve ark., 2020).

DCH pozitif olan karaciğer bölgelerinde, hücre ölümlerine bağlı olarak hepatositlerin çoğalma hızının DCH negatif alanlara göre çok daha yüksek olduğu saptanmıştır. HBV'de olduğu gibi, konakçının bağışıklık sisteminin virusa verdiği tepkiyle tetiklenen

bu sürekli hücre çoğalması, hücrelerin kanserleşmesine (HCC) zemin hazırlamaktadır (Capozza ve ark., 2021a).

HCC'si bulunan kediler üzerinde yapılan bir çalışmada %23,9'unda DCH DNA'sı saptanmıştır ayrıca HBV ve DCH'nin hepatosellüler karsinom olgularında homolog bölgelere (CCNE1) entegrasyon gösterdiği ortaya koyulmuştur. CCNE1, G1 fazından S fazına geçişi için gerekli olan ve hücre çoğalmasını düzenleyen Siklin E1 proteinini kodlamaktadır. Virusun bu bölgeye yerleşmesi hücrelerin durdurulmaz bir şekilde çoğalmasına neden olmaktadır (Cavasin ve ark., 2025).

Benzerlikleri göz önüne alındığında evcil kediler üzerinde yapılacak saha çalışmalarının laboratuvar deneylerinden daha kullanışlı bir yaklaşım olacağı ayrıca kedilerde görülen viral onkolojinin kanser tıbbının ilerlemesinde potansiyelinin olduğu düşünülmektedir (Beatty ve Tu, 2026).

4. Klinik Bulgular

HBV'nin insanlarda karaciğer hastalıklarında etkili olduğu gibi DCH'nin de kedi karaciğer hastalıklarında potansiyel bir rolü olduğu düşünülmektedir (Capozza ve ark., 2021a; Pesavento ve ark., 2019). Fakat kedilerde henüz yeni saptanmış bir virus olması sebebiyle kliniklerde başka viruslarla karışmaktadır. Kedilerde karaciğer hastalıklarıyla bağlantılı viruslar olarak FeLV ve FIPV düşünülmektedir (Capozza ve ark., 2021a). Ayrıca kronik hepatit ve HCC kedilerde görüldüğünde genellikle idiopatik olarak değerlendirilmektedir (Bayton ve ark., 2018). Ancak yapılan bir çalışmada 14 kronik hepatit olgusunun 6'sında (%43) ve hepatoselüler karsinom (HCC) olgularının 29'undan 8'inde (%28) DCH DNA'sı amplifiye edilmiştir. (Pesavento ve ark., 2019). Ayrıca yapılan bir çalışmada rutin nekropsisi yapılacak ve karaciğerle ilişkili hastalıkları bulunan kedilerden, PCR yoluyla DCH varlığı kesinleştirilmiş olan kedilerin beyin, kalp, böbrek, karaciğer, akciğer ve lenf düğümleri dokularına yapılan ISH (in stu hibridizasyon) sonucu bu dokularda da DCH varlığı saptanmıştır. Bu durum virusun sadece karaciğere tropizm göstermekle kalmayıp çeşitli organları da etkileyebildiğini göstermektedir (Piewbang ve ark., 2020).

HBV, insan immün yetmezlik virusu (HIV) ile enfekte bireylerde yaygın bir kopatojen olduğu gibi DCH'de FIV ile enfekte kedilerde daha yüksek prevalansta görülmektedir (Aghazadeh ve ark., 2018; Piewbang ve ark., 2020).

Biyokimyasal parametreler ele alındığında DCH ile enfekte kedilerde AST ve ALT gibi karaciğer enzimlerinde anlamlı artışların olduğu saptanmıştır (Anpuanandam ve ark., 2021; Piewbang ve ark., 2022). DCH pozitifliği ile cinsiyet, yaş, sahiplik türü veya karaciğer hastalığı durumu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır fakat yapılan başka bir çalışma 1 yaşını geçen kedilerde daha güçlü immun yanıt oluştuğunu ve IgG üretme kapasitesinin genç kedilere kıyasla daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır (Scavone ve ark., 2022; Pellegrini ve ark., 2026).

5. Teşhis

Viral nükleik asitler konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) gibi moleküler yöntemlerle tespit edilerek DCH varlığı saptanmaktadır ve yapılan çalışmalarda en çok tercih edilen yöntemdir (Capozza ve ark., 2021a; Pesavento ve ark., 2019; Piewbang ve ark., 2022).

Dokuda veya hücre içinde hedef DNA dizisinin yerini ve varlığını gösteren ISH (In Stu Hibridizasyon) ve doku örneklerindeki belirli antijenleri (proteinleri) tespit etmek için antikor-antijen etkileşimini kullanan bir yöntem olan İmmünohistokimya (IHC) teşhiste kullanılmaktadır (Pesavento ve ark., 2019; Piewbang ve ark., 2020; Piewbang ve ark., 2022).

6. Koruma, Kontrol ve Tedavi

Henüz bir tedavisi bulunmamakla birlikte; HBV ve DCH replikasyon döngülerindeki ters transkripsiyon aşamasında, P proteinlerinin epsilon (ε) dizisine bağlanma mekanizmasındaki benzerliğe dayanarak; veteriner hekimliği alanında yeni antiviral ilaçların geliştirilmesi öngörülmektedir (Koç ve ark., 2024). Fakat insan HBV antiviral tedavisinin temelini oluşturan birçok nükleotid analoğu kediler için kabul edilemeyecek kadar toksiktir (Capozza ve ark., 2023b). DCH enfeksiyonuna yönelik önleme stratejilerinin

tasarlanabilmesi için epidemiyolojisi ve olası bulaşma yolları ile ilişkili çalışmaların arttırılması, buna ek olarak hızlı tanı kitlerinin geliştirilmesi virusun kontrol altına alınmasına katkı sağlaması beklenmektedir (Shofa ve ark., 2022).

Seconder Olarak Karaciğeri Etkileyen Viral Ajanlar

Feline Calicivirus (FCV)

Caliciviridae ailesi, *Vesivirus* genusunda yer alan FCV, tek iplikcikli RNA yapısına sahiptir (Hofmann-Lehmann ve ark., 2022). Enfekte hayvanlarda genellikle yüksek morbiditeye ancak düşük mortaliteye neden sahiptir. Virus öncelikle ağız ve burun salgıları yoluyla yayılır, ancak göz ve rektal sürüntülerde, dışkıda, kanda ve nadiren idrar örneklerinde de tespit edilmiştir (Di Profio ve ark., 2025).

Hastalık klinik görünüm olarak ağız ve dilde ülserasyon, gingivostomatitis, hapşırma ve seröz burun akıntısı ile seyretmektedir, eklem ağrıları sebebiyle topallama sendromu görülmektedir (Hofmann-Lehmann ve ark., 2022). Bunlara ek olarak karaciğerle ilgili bulgular da mevcuttur, karaciğerle ilişkili en belirgin klinik semptom sarılıktır. Karaciğer hasarı nedeniyle gelişen bu durum, kedilerde diş etleri, gözler ve ciltte sarımsı bir renk değişimi ile kendini gösterir (Coyne ve ark., 2006).

FCV enfeksiyonu olan kedilerin karaciğer parankiminin histopatolojik muayenesinde; yaygın ve dağılmış şekilde hepatosellüler nekroz, multifokal hepatit ve kolanjiohepatit tabloları tespit edilmiştir. Bu yangısal sürece, sinüzoidlerde belirgin dilatasyon ve lümen içerisinde yoğun lökosit infiltrasyonu eşlik etmektedir. Ayrıca, vasküler trombüs oluşumları gözlemlenmiştir (Caringella ve ark., 2019). Coyne ve ark. (2006) tarafından FCV antijeni ve virus benzeri partiküller kupffer hücrelerinde ve hepatositlerde doğrudan tespit edilmiştir. Fakat başka bir çalışmada karaciğer hasarına rağmen dokuda viral antijen saptanmamıştır; bu da karaciğer hasarının her zaman doğrudan viral replikasyondan kaynaklanmayabileceğini, sistemik mediyatörlerin de rol oynayabileceğini göstermektedir (Pesavento ve ark., 2004).

Feline Panlökopeni Virusu (FPV)

Kedi panlökopeni virüsü; zarfsız, ikosahedral, tek sarmallı bir DNA virusu olup Parvoviridae ailesi, Protoparvovirus genusunda yer almaktadır (Rehme ve ark., 2022; Truyen ve ark., 2009).

Sistemik bir enfeksiyona neden olan virus fekal-oral yolla bulaşmaktadır. Başlangıçta orofaringeal lenfoid dokuda replike olan virus kan yoluyla tüm dokulara yayılır. Lenfoid dokuların enfeksiyonu ve nekrozuna yol açar. Kemik iliğinin enfeksiyonu, hasarlı gastrointestinal dokudaki nötrofil sekestrasyonu ile daha da şiddetlenen bir lökopeni tablosu ile ilişkilidir. Virus, intestinal kript hücrelerinde replike olarak villuslarda kısalmaya, bağırsak geçirgenliğinde artışa ve malabsorbsiyona neden olmaktadır (Sykes, 2013).

FPV, evcil kedilerde iştahsızlık, kusma, ishal, lökopeni ve yavru kedilerde yüksek ölüm oranı ile karakterize edilmektedir. Feline panlökopeni virusunun karaciğere; makroskobik, mikroskobik ve biyokimyasal etkileri bulunmaktadır. Makroskobik olarak karaciğer büyümesi, kenarlarında kütleşme ve safra kesesinde genişleme tespit edilirken yapılan histopatolojik incelemede hepatosit dejenerasyonu ve periportal bölgede şiddetli sinüzoidal konjesyon tanımlanmıştır (Lamuanpuii ve ark., 2025). Şiddetli etkilenen kedilerde, azotemi, AST veya ALT serum aktivitelerinde artış ve hiperbilirubinemi görülebilmektedir (Sykes, 2013).

Feline Lösemi Virusu (FeLV)

Retroviridae familyası, *Gammaretrovirus* genusunda yer alan feline lösemi virusu (FeLV); bağışıklık baskılanmasına, kemik iliği bozukluklarına ve hematopoetik neoplaziye neden olması sebebiyle evcil kedilerde önemli ve ölümcül bir hastalık olmaya devam etmektedir (Sykes ve Hartmann, 2013). Enfeksiyon FeLV'nin lenfositleri enfekte ettiği orofarenkste başlamaktadır; bu lenfositler daha sonra kemik iliğine göç ederek birkaç hafta içerisinde viremi şekillendirir. Viremi sonucu, tükürük bezinde ve bağırsak mukozasında meydana gelen enfeksiyon tükürük ve dışkıyla çevreye saçılmaktadır (Lutz ve ark., 2009).

Gelişen viremi süreci karaciğer parankimini de doğrudan veya dolaylı mekanizmalarla etkileyebilmektedir. FeLV ayrıca sarılık ve fokal karaciğer nekrozu da dahil olmak üzere çeşitli

inflamatuar ve dejeneratif karaciğer hastalıklarıyla da ilişkilendirilmiştir (Reinacher ve Theilen, 1987). Cristo ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada FeLV ile enfekte hayvanların nekropsi bulgularında, hepatomegali ve hepatik lipidoz varlığı tespit edilmiştir. Ek olarak en çok portal bölgede olmak üzere karaciğer neoplastik hücre infiltrasyonun en çok olduğu organ olarak bulunmuştur. Serum kimyasında en sık rastlanan bulgu karaciğer enzimlerinde yükselme olmuştur. Kedilerin %30'undan fazlasında hiperbilirubinemi ve yüksek karaciğer enzimleri (ALT, AST) bildirilmiştir (Pare ve ark., 2022).

Kaynakça

Abdelhamed, W., & El-Kassas, M. (2024). Hepatitis B virus as a risk factor for hepatocellular carcinoma: there is still much work to do. *Liver Research, 8*(2), 83-90. https://doi.org/10.1016/j.livres.2024.05.004

Adıgüzel, E., Erdem-Şahinkesen, E., Koç, B. T., Demirden, C., & Oğuzoğlu, T. Ç. (2023). The detection and full genomic characterization of domestic cat Orthohepadnaviruses from Türkiye. *Veterinary Medicine and Science, 9*(5), 1965-1972. https://doi.org/10.1002/vms3.1217

Aghazadeh, M., Shi, M., Barrs, V. R., McLuckie, A. J., Lindsay, S. A., Jameson, B., ... Beatty, J. A. (2018). A novel hepadnavirus identified in an immunocompromised domestic cat in Australia. *Viruses, 10*(5), 269. https://doi.org/10.3390/v10050269

Anpuanandam, K., Selvarajah, G. T., Choy, M. M. K., Ng, S. W., Kumar, K., Ali, R. M., ... Tan, W. S. (2021). Molecular detection and characterisation of Domestic Cat Hepadnavirus (DCH) from blood and liver tissues of cats in Malaysia. *BMC Veterinary Research, 17*(1), 9. https://doi.org/10.1186/s12917-020-02700-0

Bakheit, A. H., Darwish, H., Darwish, I. A., & Al-Ghusn, A. I. (2023). Remdesivir. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, 48*, 71-108. https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2022.11.003

Barker, E. N., & Tasker, S. (2020). Advances in molecular diagnostics and treatment of feline infectious peritonitis. *Advances in Small Animal Care, 1*, 161-188. https://doi.org/10.1016/j.yasa.2020.07.011

Bayton, W. A., Westgarth, C., Scase, T., Price, D. J., & Bexfield, N. H. (2018). Histopathological frequency of feline hepatobiliary disease in the UK. *Journal of Small Animal Practice, 59*(7), 404-410. https://doi.org/10.1111/jsap.12810

Beatty, J. A., & Tu, T. (2026). Cat viruses as windows into human oncogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 1-3. https://doi.org/10.1038/s41568-026-00909-z

Caballero-Gómez, J., Rivero-Juarez, A., Jurado-Tarifa, E., Jiménez-Martín, D., Jiménez-Ruiz, E., Castro-Scholten, S., ... García-Bocanegra, I. (2022). Serological and molecular survey of hepatitis E virus in cats and dogs in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases, 69*(2), 240-248. https://doi.org/10.1111/tbed.14437

Cagirgan, A. A., Yildirim, Y., & Okulmus, C. (2022). The first evidence of zoonotic hepatitis E virus (HEV) exposure in domestic cats in Türkiye. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 86*, 101820. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101820

Capozza, P., Carrai, M., Choi, Y. R., Tu, T., Nekouei, O., Lanave, G., ... Barrs, V. R. (2023a). Domestic cat hepadnavirus: Molecular epidemiology and phylogeny in cats in Hong Kong. *Viruses, 15*(1), 150. https://doi.org/10.3390/v15010150

Capozza, P., Decaro, N., Beikpour, F., Buonavoglia, C., & Martella, V. (2021a). Emerging hepatotropic viruses in cats: A brief review. *Viruses, 13*(6), 1162. https://doi.org/10.3390/v13061162

Capozza, P., Martella, V., Lanave, G., Beikpour, F., Di Profio, F., Palombieri, A., ... Di Martino, B. (2021b). A surveillance study of hepatitis E virus infection in household cats. *Research in Veterinary Science, 137*, 40-43. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.04.022

Capozza, P., Pellegrini, F., Camero, M., Diakoudi, G., Omar, A. H., Salvaggiulo, A., ... Lanave, G. (2023b). Hepadnavirus infection in a cat with chronic liver disease: a multi-disciplinary diagnostic approach. *Veterinary Sciences, 10*(12), 668. https://doi.org/10.3390/vetsci10120668

Caringella, F., Elia, G., Decaro, N., Martella, V., Lanave, G., Varello, K., ... Buonavoglia, C. (2019). Feline calicivirus infection in cats with virulent systemic disease, Italy. *Research in Veterinary Science, 124*, 46-51. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.02.008

Cavasin, J. P., Chen, M. C., Ajoyan, H., Dobromylskyj, M. J., Huang, W. H., Jager, M., ... Beatty, J. A. (2025). Recurrent integration of domestic cat hepatitis B virus DNA near feline CCNE1 supports an oncogenic role in hepatocellular carcinoma in cats. *Tumour Virus Research*, 200324. https://doi.org/10.1016/j.tvr.2025.200324

Chang, H., Egberink, H. F., Halpin, R., Spiro, D. J., & Rottier, P. (2012). Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence. *Emerging Infectious Diseases, 18*(7), 1089-1095. https://doi.org/10.3201/eid1807.120143

Chappuis, G., & Duret, C. (1978). Feline infectious peritonitis: Present knowledge. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 1*(1-2), 115-120. https://doi.org/10.1016/0147-9571(78)90018-8

Chen, M. C., Cavasin, J. P., Tu, T., Van Brussel, K., Nekouei, O., Cullen, J. M., ... Beatty, J. A. (2025). Domestic cat hepadnavirus is detected infrequently in feline blood and liver samples submitted for diagnostic testing in Texas, USA. *Virology, 607*, 110506. https://doi.org/10.1016/j.virol.2025.110506

Chuang, Y. C., Tsai, K. N., & Ou, J. H. J. (2022). Pathogenicity and virulence of Hepatitis B virus. *Virulence, 13*(1), 258-296. https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2028483

Churin, Y., Roderfeld, M., & Roeb, E. (2015). Hepatitis B virus large surface protein: function and fame. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition, 4*(1), 1.

Clark, T. M., Coggins, S. J., Korman, R., King, J., & Malik, R. (2025). Treatment of feline infectious peritonitis in cats with molnupiravir: Clinical observations and outcomes for 54 cases. *Australian Veterinary Journal, 103*(6), 339-353. https://doi.org/10.1111/avj.13433

Cony, F. G., Pereira, V. C., Slaviero, M., Lima, R. P., de Castro, L. T., de Moraes, J. T., ... & Pavarini, S. P. (2024). Anatomopathological characterization of hepatic lesions of feline infectious peritonitis in cats. *Journal of Comparative Pathology*, *215*, 59-65. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2024.10.003

Coyne, K. P., Jones, B. R. D., Kipar, A., Chantrey, J., Porter, C. J., Barber, P. J., ... Radford, A. D. (2006). Lethal outbreak of disease associated with feline calicivirus infection in cats. *Veterinary Record, 158*(16), 544-550. https://doi.org/10.1136/vr.158.16.544

Cristo, T. G., Biezus, G., Noronha, L. F., Gaspar, T., Dal Pont, T. P., Withoeft, J. A., ... Casagrande, R. A. (2019). Feline leukaemia virus associated with leukaemia in cats in Santa Catarina, Brazil. *Journal of Comparative Pathology, 170*, 10-21. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2019.05.002

Day, M. J., Horzinek, M. C., Schultz, R. D., & Squires, R. A. (2016). WSAVA guidelines for the vaccination of dogs and cats. *The Journal of Small Animal Practice, 57*(1), E1. https://doi.org/10.1111/jsap.2_12431

Delaplace, M., Huet, H., Gambino, A., & Le Poder, S. (2021). Feline coronavirus antivirals: A review. *Pathogens, 10*(9), 1150. https://doi.org/10.3390/pathogens10091150

Di Profio, F., Carnevale, M., Marsilio, F., Pellegrini, F., Martella, V., Di Martino, B., & Sarchese, V. (2025). Feline calicivirus infection: current understanding and implications for control strategies. *Animals, 15*(14), 2009. https://doi.org/10.3390/ani15142009

Esin, Ç., Kuruçay, H. N., Uzum, B., Özlek, M., Gümüş, N., & Güder, B. E. (2025). Hematological Ratios and Their Relationship Between Biochemical Parameters in Cats with Feline Infectious Peritonitis. *Kocatepe Veterinary Journal*, *18*(4), 478-486.

Felten, S., & Hartmann, K. (2019). Diagnosis of feline infectious peritonitis: a review of the current literature. *Viruses, 11*(11), 1068. https://doi.org/10.3390/v11111068

Frogley, S. (2013). The liver: role in health and disease in small animals. *VN Times, 13*(6), 18-20.

Gao, F., & Wen, G. (2025). Strategies for combating FIPV infection: Antiviral agents and vaccines. *Research in Veterinary Science, 192*, 105709. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2025.105709

Gokalsing, E., Ferrolho, J., Gibson, M. S., Vilhena, H., & Anastácio, S. (2025). Efficacy of GS-441524 for feline infectious peritonitis: A systematic review (2018-2024). *Pathogens, 14*(7), 717. https://doi.org/10.3390/pathogens14070717

Gómez-Moreno, A., & Ploss, A. (2024). Mechanisms of hepatitis B virus cccDNA and minichromosome formation and HBV gene transcription. *Viruses, 16*(4), 609. https://doi.org/10.3390/v16040609

Hartmann, K. (2005). Feline infectious peritonitis. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice, 35*(1), 39-vi. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2004.10.011

Hartmann, K. (2017). Feline infectious peritonitis-new developments in pathogenesis, diagnosis, and management.

Hofmann-Lehmann, R., Hosie, M. J., Hartmann, K., Egberink, H., Truyen, U., Tasker, S., ... Möstl, K. (2022). Calicivirus infection in cats. *Viruses, 14*(5), 937. https://doi.org/10.3390/v14050937

Holzworth, J. (1963). Some important disorders of cats. *The Cornell Veterinarian, 53*, 157-160.

Hu, T., Zhang, H., Zhang, X., Hong, X., & Zhang, T. (2024). Prevalence and risk factors associated with feline infectious peritonitis (FIP) in Mainland China between 2008 and 2023: A systematic review and meta-analysis. *Animals, 14*(8), 1220. https://doi.org/10.3390/ani14081220

Kamar, N., Dalton, H. R., Abravanel, F., & Izopet, J. (2014). Hepatitis E virus infection. *Clinical Microbiology Reviews, 27*(1), 116-138. https://doi.org/10.1128/cmr.00057-13

Kamar, N., Izopet, J., Pavio, N., Aggarwal, R., Labrique, A., Wedemeyer, H., & Dalton, H. R. (2017). Hepatitis E virus infection. *Nature Reviews Disease Primers, 3*(1), 17086. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.86

Karayiannis, P. (2017). Hepatitis B virus: virology, molecular biology, life cycle and intrahepatic spread. *Hepatology International, 11*(6), 500-508. https://doi.org/10.1007/s12072-017-9829-7

Keller, N. (2017). Chronic hepatitis. *Chronic Disease Management for Small Animals*, 233-237. https://doi.org/10.1002/9781119201076.ch23

Kim, G. W., & Siddiqui, A. (2021). The role of N6-methyladenosine modification in the life cycle and disease pathogenesis of hepatitis B

and C viruses. *Experimental & Molecular Medicine, 53*(3), 339-345. https://doi.org/10.1038/s12276-021-00581-3

Kipar, A., & Meli, M. L. (2014). Feline infectious peritonitis: still an enigma? *Veterinary Pathology, 51*(2), 505-526. https://doi.org/10.1177/0300985814522077

Koç, B. T., Adiguzel, E., & Oguzoglu, T. C. (2024). Molecular questioning of potential efficacy of epsilon targeted antiviral treatment option for Domestic Cat Hepadnavirus. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4249164/v1

Korkulu, E., Şenlik, E. İ., Adıgüzel, E., Artut, F. G., Çetinaslan, H. D., Erdem-Şahinkesen, E., & Oğuzoğlu, T. Ç. (2024). Status quo of feline leukaemia virus infection in Turkish cats and their antigenic prevalence. *Animals, 14*(3), 385. https://doi.org/10.3390/ani14030385

Kuno, A., Ido, K., Isoda, N., Satoh, Y., Ono, K., Satoh, S., ... Okamoto, H. (2003). Sporadic acute hepatitis E of a 47-year-old man whose pet cat was positive for antibody to hepatitis E virus. *Hepatology Research, 26*(3), 237-242. https://doi.org/10.1016/s1386-6346(03)00197-9

Lamontagne, R. J., Bagga, S., & Bouchard, M. J. (2016). Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. *Hepatoma Research, 2*, 163. https://doi.org/10.20517/2394-5079.2016.05

Lamuanpuii, R., Kiran, J., Sarma, K., Roychoudhury, P., Chethan, G. E., & Malsawmsangi, N. T. (2025). Assessment of macroscopic and microscopic lesions in feline panleukopenia virus infected organs of cats. *Exploratory Animal & Medical Research, 15*(1). https://doi.org/10.52635/eamr/15.1.133-139

Lanave, G., Capozza, P., Diakoudi, G., Catella, C., Catucci, L., Ghergo, P., ... Camero, M. (2019). Identification of hepadnavirus in

the sera of cats. *Scientific Reports, 9*(1), 10668. https://doi.org/10.1038/s41598-019-47175-8

Lauber, C., Seitz, S., Mattei, S., Suh, A., Beck, J., Herstein, J., ... Bartenschlager, R. (2017). Deciphering the origin and evolution of hepatitis B viruses by means of a family of non-enveloped fish viruses. *Cell Host & Microbe, 22*(3), 387-399. https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.019

Li, Y., Qu, C., Spee, B., Zhang, R., Penning, L. C., de Man, R. A., ... Pan, Q. (2020). Hepatitis E virus seroprevalence in pets in the Netherlands and the permissiveness of canine liver cells to the infection. *Irish Veterinary Journal, 73*(1), 6. https://doi.org/10.1186/s13620-020-00158-y

Liang, H., Chen, J., Xie, J., Sun, L., Ji, F., He, S., ... Li, S. (2014). Hepatitis E virus serosurvey among pet dogs and cats in several developed cities in China. *PLoS ONE, 9*(6), e98068. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098068

Lu, J., Chen, S. A., Khan, M. B., Brassard, R., Arutyunova, E., Lamer, T., ... Lemieux, M. J. (2022). Crystallization of feline coronavirus Mpro with GC376 reveals mechanism of inhibition. *Frontiers in Chemistry, 10*, 852210. https://doi.org/10.3389/fchem.2022.852210

Lutz, H., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., ... Horzinek, M. C. (2009). Feline leukaemia: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine & Surgery, 11*(7), 565-574. https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.05.005

MacLachlan, J. H., & Cowie, B. C. (2015). Hepatitis B virus epidemiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 5*(5), a021410. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021410

Magnius, L., Mason, W. S., Taylor, J., Kann, M., Glebe, D., Dény, P., ... ICTV Report Consortium. (2020). ICTV virus taxonomy profile: Hepadnaviridae. *The Journal of General Virology, 101*(6), 571-572. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001415

Mir, S., Peters, M., Penny, G., Agsaoa, A., & Mir, M. (2025). From challenge to cure: a look at feline infectious peritonitis and emerging treatment strategies and breakthroughs. *Veterinary sciences*, *12*(7), 650. https://doi.org/10.3390/vetsci12070650

Moon, J. S., Lee, W., Cho, Y. H., Kim, Y., & Kim, G. W. (2023). The significance of N6-methyladenosine RNA methylation in regulating the hepatitis B virus life cycle. *Journal of Microbiology and Biotechnology, 34*(2), 233. https://doi.org/10.4014/jmb.2309.09013

Moyadee, W., Sunpongsri, S., Choowongkomon, K., Roytrakul, S., Rattanasrisomporn, A., Tansakul, N., & Rattanasrisomporn, J. (2024). Feline infectious peritonitis: A comprehensive evaluation of clinical manifestations, laboratory diagnosis, and therapeutic approaches. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research, 11*(1), 19. https://doi.org/10.5455/javar.2024.k742

Müller, T. R., Penninck, D. G., Webster, C. R., & Conrado, F. O. (2023). Abdominal ultrasonographic findings of cats with feline infectious peritonitis: an update. *Journal of Feline Medicine and Surgery, 25*(12), 1098612X231216000. https://doi.org/10.1177/1098612x231216000

Murphy, B. G., Perron, M., Murakami, E., Bauer, K., Park, Y., Eckstrand, C., ... & Pedersen, N. C. (2018). The nucleoside analog GS-441524 strongly inhibits feline infectious peritonitis (FIP) virus in tissue culture and experimental cat infection studies. *Veterinary microbiology*, *219*, 226-233. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.026

Nassal, M. (2008). Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Research, 134*(1-2), 235-249. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.12.024

Negasee, K. A. (2021). Hepatic diseases in canine and feline: A review. *Veterinary Medicine*, 22-31. https://doi.org/10.17140/vmoj-6-155

Norris, J. M., Bosward, K. L., White, J. D., Baral, R. M., Catt, M. J., & Malik, R. (2005). Clinicopathological findings associated with feline infectious peritonitis in Sydney, Australia: 42 cases (1990-2002). *Australian Veterinary Journal, 83*(11), 666-673. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2005.tb13044.x

Pare, A., Ellis, A., & Juette, T. (2022). Clinicopathological findings of FeLV-positive cats at a secondary referral center in Florida, USA (2008-2019). *PLoS ONE, 17*(4), e0266621. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266621

Pedersen, N. C., Allen, C. E., & Lyons, L. A. (2008). Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery, 10*(6), 529-541. https://doi.org/10.1016/j.jfms.2008.02.006

Pedersen, N. C., Kim, Y., Liu, H., Galasiti Kankanamalage, A. C., Eckstrand, C., Groutas, W. C., ... Chang, K. O. (2018). Efficacy of a 3C-like protease inhibitor in treating various forms of acquired feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery, 20*(4), 378-392. https://doi.org/10.1177/1098612x17729626

Pedersen, N. C., Perron, M., Bannasch, M., Montgomery, E., Murakami, E., Liepnieks, M., & Liu, H. (2019). Efficacy and safety of the nucleoside analog GS-441524 for treatment of cats with naturally occurring feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery, 21*(4), 271-281. https://doi.org/10.1177/1098612x19825701

Pellegrini, F., Burgio, M., Cicirelli, V., Diakoudi, G., Elia, G., Salvaggiulo, A., ... Martella, V. (2026). Dynamics of domestic cat hepatitis B virus infection in juvenile cats. *Veterinary Microbiology*, 110956. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2026.110956

Pesavento, P. A., Jackson, K., Scase, T., Tse, T., Hampson, B., Munday, J. S., ... Beatty, J. A. (2019). A novel hepadnavirus is associated with chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma in cats. *Viruses, 11*(10), 969. https://doi.org/10.3390/v11100969

Pesavento, P. A., MacLachlan, N. J., Dillard-Telm, L., Grant, C. K., & Hurley, K. F. (2004). Pathologic, immunohistochemical, and electron microscopic findings in naturally occurring virulent systemic feline calicivirus infection in cats. *Veterinary Pathology, 41*(3), 257-263. https://doi.org/10.1354/vp.41-3-257

Piewbang, C., Dankaona, W., Poonsin, P., Yostawonkul, J., Lacharoje, S., Sirivisoot, S., ... Techangamsuwan, S. (2022). Domestic cat hepadnavirus associated with hepatopathy in cats: A retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine, 36*(5), 1648-1659. https://doi.org/10.1111/jvim.16525

Piewbang, C., Wardhani, S. W., Chaiyasak, S., Yostawonkul, J., Chai-In, P., Boonrungsiman, S., ... Techangamsuwan, S. (2020). Insights into the genetic diversity, recombination, and systemic infections with evidence of intracellular maturation of hepadnavirus in cats. *PLoS ONE, 15*(10), e0241212. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241212

Prpić, J., & Baymakova, M. (2023). Hepatitis E virus (HEV) infection among humans and animals: Epidemiology, clinical characteristics, treatment, and prevention. *Pathogens, 12*(7), 931. https://doi.org/10.3390/pathogens12070931

Purdy, M. A., Drexler, J. F., Meng, X. J., Norder, H., Okamoto, H., Van der Poel, W. H., ... Smith, D. B. (2022). ICTV virus taxonomy

profile: Hepeviridae 2022. *Journal of General Virology, 103*(9), 001778. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001778

Rehme, T., Hartmann, K., Truyen, U., Zablotski, Y., & Bergmann, M. (2022). Feline panleukopenia outbreaks and risk factors in cats in animal shelters. *Viruses, 14*(6), 1248. https://doi.org/10.3390/v14061248

Reinacher, M., & Theilen, G. (1987). Frequency and significance of feline leukemia virus infection in necropsied cats. *American Journal of Veterinary Research, 48*(6), 939-945. https://doi.org/10.2460/ajvr.1987.48.06.939

Rondeau, M. P. (2014). Hepatitis and cholangiohepatitis. *Small Animal Critical Care Medicine*, 610. https://doi.org/10.1016/b978-1-4557-0306-7.00115-x

Sase, O. (2023). Molnupiravir treatment of 18 cats with feline infectious peritonitis: A case series. *Journal of Veterinary Internal Medicine, 37*(5), 1876-1880. https://doi.org/10.1111/jvim.16832

Scavone, D., Lauzi, S., Stranieri, A., Tramontano, G., Ratti, G., & Paltrinieri, S. (2022). Evaluating the presence of domestic cat hepadnavirus viraemia in cats with biochemical alterations suggestive of liver disease. *Veterinary Record, 191*(4). https://doi.org/10.1002/vetr.1626

Sherding, R. G. (2009). Feline infectious peritonitis (feline coronavirus). *Saunders Manual of Small Animal Practice*, 132. https://doi.org/10.1016/b0-72-160422-6/50012-7

Shofa, M., Kaneko, Y., Takahashi, K., Okabayashi, T., & Saito, A. (2022). Global prevalence of domestic cat hepadnavirus: an emerging threat to cats' health? *Frontiers in Microbiology, 13*, 938154. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.938154

Shofa, M., Ohkawa, A., Kaneko, Y., & Saito, A. (2023). Conserved use of the sodium/bile acid cotransporter (NTCP) as an entry receptor by hepatitis B virus and domestic cat hepadnavirus. *Antiviral Research, 217*, 105695. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2023.105695

Smith, D. B., Simmonds, P., International Committee on the Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study Group, Jameel, S., Emerson, S. U., Harrison, T. J., ... Purdy, M. A. (2014). Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *Journal of General Virology, 95*(10), 2223-2232. https://doi.org/10.1099/vir.0.068429-0

Solikhah, T. I., Agustin, Q. A. D., Damaratri, R. A., Siwi, D. A. F., Rafi'uttaqi, G. N., Hartadi, V. A., & Solikhah, G. P. (2024). A review of feline infectious peritonitis virus infection. *Veterinary World, 17*(11), 2417. https://doi.org/10.14202/vetworld.2024.2417-2432

Sykes, J. E. (2013). Feline panleukopenia virus infection and other viral enteritides. *Canine and Feline Infectious Diseases*, 187. https://doi.org/10.1016/b978-1-4377-0795-3.00019-3

Sykes, J. E., & Hartmann, K. (2013). Feline leukemia virus infection. *Canine and Feline Infectious Diseases*, 224. https://doi.org/10.1016/b978-1-4377-0795-3.00022-3

Takahashi, K., Kaneko, Y., Shibanai, A., Yamamoto, S., Katagiri, A., Osuga, T., ... Saito, A. (2022). Identification of domestic cat hepadnavirus from a cat blood sample in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science, 84*(5), 648-652. https://doi.org/10.1292/jvms.22-0010

Tasker, S. (2018). Diagnosis of feline infectious peritonitis: Update on evidence supporting available tests. *Journal of Feline Medicine and Surgery, 20*(3), 228-243. https://doi.org/10.1177/1098612x18758592

Tasker, S., Addie, D. D., Egberink, H., Hofmann-Lehmann, R., Hosie, M. J., Truyen, U., ... Hartmann, K. (2023). Feline infectious peritonitis: European advisory board on cat diseases guidelines. *Viruses, 15*(9), 1847. https://doi.org/10.3390/v15091847

Tasker, S., Spiri, A. M., Hartmann, K., Addie, D. D., Belák, S., Bergmann, M., ... Hosie, M. J. (2026). Update on treatment of feline infectious peritonitis: European Advisory Board on Cat Diseases (ABCD) guidelines. *Viruses, 18*(4), 452. https://doi.org/10.3390/v18040452

Taylor, S. S., Coggins, S., Barker, E. N., Gunn-Moore, D., Jeevaratnam, K., Norris, J. M., ... Tasker, S. (2023). Retrospective study and outcome of 307 cats with feline infectious peritonitis treated with legally sourced veterinary compounded preparations of remdesivir and GS-441524 (2020-2022). *Journal of Feline Medicine and Surgery, 25*(9), 1098612X231194460. https://doi.org/10.1177/1098612x231194460

Tekes, G., & Thiel, H. J. (2016). Feline coronaviruses: pathogenesis of feline infectious peritonitis. *Advances in Virus Research, 96*, 193-218.

Tessmann, A., Sumienski, J., Sita, A., Mallmann, L., Birlem, G. E., da Silva Nunes, N. J., ... Weber, M. N. (2025). Domestic cat hepadnavirus genotype B is present in Southern Brazil. *Virus Genes, 61*(1), 81-86. https://doi.org/10.1007/s11262-024-02115-1

Thayer, V., Gogolski, S., Felten, S., Hartmann, K., Kennedy, M., & Olah, G. A. (2022). 2022 AAFP/EveryCat feline infectious peritonitis diagnosis guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery, 24*(9), 905-933. https://doi.org/10.1177/1098612x221118761

Truyen, U., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., ... Horzinek, M. C. (2009). Feline panleukopenia: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline*

Medicine & Surgery, 11(7), 538-546. https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.05.002

Velavan, T. P., Pallerla, S. R., Johne, R., Todt, D., Steinmann, E., Schemmerer, M., ... Bock, C. T. (2021). Hepatitis E: An update on One Health and clinical medicine. *Liver International, 41*(7), 1462-1473. https://doi.org/10.1111/liv.14912

Vennema, H. (1998). Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronavirus. *Virology, 243*, 308-319. https://doi.org/10.1006/viro.1998.9045

Wang, B., & Meng, X. J. (2021). Hepatitis E virus: Host tropism and zoonotic infection. *Current Opinion in Microbiology, 59*, 8-15.

World Health Organization. (2023). *Hepatitis E*. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e

World Health Organization. (2024). *Global hepatitis report 2024: Action for access in low- and middle-income countries*. https://iris.who.int/handle/10665/376461

Yuzbasioglu Ozturk, G., Kayar, A., Erdogan Bamac, O., Tali, H. E., Ozkan, I. E., Umar, S., ... Yilmaz, A. (2025). Phylogenetic, clinical, pathological and epidemiological characterization of feline coronavirus infections in cats, in Istanbul. *Frontiers in Veterinary Science, 12*, 1645884. https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1645884

Zeng, M. Y., Gao, H., Yan, X. X., Qu, W. J., Sun, Y. K., Fu, G. W., & Yan, Y. L. (2017). High hepatitis E virus antibody positive rates in dogs and humans exposed to dogs in the south-west of China. *Zoonoses and Public Health, 64*(8), 684-688. https://doi.org/10.1111/zph.12377

BÖLÜM 2

ENDOJEN RETROVİRUSLAR

T. EYLEM YAYGIN[1]
B. TAYLAN KOÇ[2]

Giriş

Endojen retroviruslar germ hücrelerini enfekte ederek genoma entegre olmuş nesilden nesile aktarılan viral kalıntılardır. Endojen retrovirusların keşfi 1960'ların sonu, 1970'lerin başında olmuştur. (Weiss, 2006)

Memeli genomlarında entegre halde bulunan endojen retrovirüslerin (ERV) büyük bir kısmı evrimsel süreçte biriken mutasyonlar nedeniyle inaktif hale gelmiş olsa da; koala, domuz ve fare gibi bazı türlerde replikasyon kapasitesini koruyan ERV elementleri tanımlanmıştır.

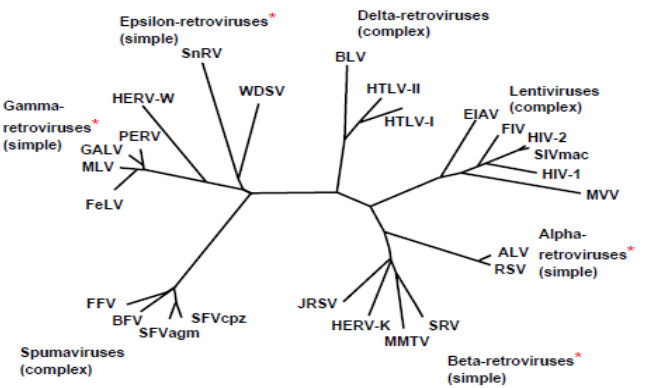
[1] Vet. Hekim T. Eylem YAYGIN, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi,Viroloji ABD, Orcid: 0009-0007-8324-1932
2 Doç Dr. B. Taylan KOÇ,Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi,Viroloji ABD, Orcid: 0000-0002-4279-6233

Bu elementler bağımsız bir viral replikasyon döngüsünü tamamlayamasalar dahi, hücresel düzeyde aktif kalarak konakçının evrimsel ve fizyolojik süreçlerine kritik katkılar sağlayabilmektedir. Nitekim, ERV kökenli olup memeli plasentasyonunda trofoblast füzyonuna aracılık eden sinsitin proteini, bu genetik adaptasyonun örneklerinden biridir. Bununla birlikte, domuz endojen retrovirüslerinin ksenotransplantasyon prosedürlerinde zoonotik enfeksiyon riski oluşturması ve bazı hücre kültürü kaynaklı aşılarda endojen retroviral elementlerin varlığının bildirilmiş olması, bu viral dizilimlerin yalnızca evrimsel açıdan değil, biyogüvenlik ve halk sağlığı açısından da önem taşıdığını göstermektedir (Denner, 2016; Kuse ve ark., 2016)

GENEL BİLGİLER

Retroviruslar basit genoma sahip olanlar alfa, beta, gama, epsilon retrovirusları ve kompleks genoma sahip olanlar lenti, delta, spumaviruslar olarak sınıflandırıldığında, yalnızca basit genom yapısına sahip olanların konakçısında endojen hale geldiği görülmektedir. Bunun sebebi belirsizliğini korumaktadır. (Weiss, 2006)

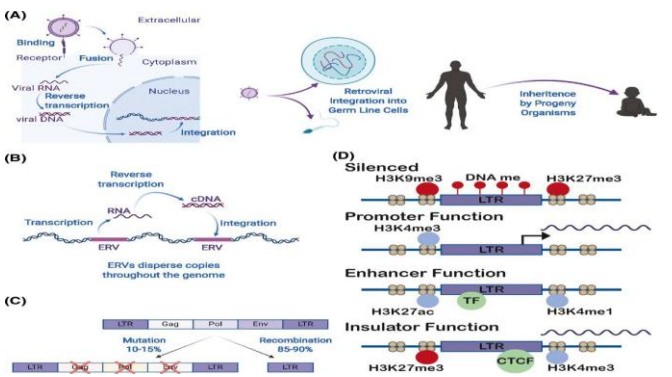
Şekil 1: Retroviridae Filogenetik Ağacı (Weiss, 2006)



Memeli genomunun yaklaşık %8'ini oluşturan endojen retroviruslar genetik driftler, insersiyonlar, delesyonlar ve nokta mutasyonları sonucu dejenerasyona uğramış; bunun sonucunda *env, pol ve gag* genleri bozularak işlevsiz hale gelmiştir. Bu sebeple birçok insan endojen retrovirus sekansı replikasyon kapasitesini ve fonksiyonel viral protein üretme yeteğini kaybeder (Belshaw ve ark., 2007; Weiss, 2006).

Retrovirüsler, konak hücre DNA'sına entegrasyonları sırasında germ hücrelerine de entegre olabilir. Bu proviral dizilerin yeni nesillere vertikal yolla aktarılması sonucunda ise endojen özellik kazanırlar. Konak genomu boyunca geniş bir yayılım gösteren Endojen Retrovirüs (ERV) aileleri, evrimsel süreç içerisinde yüzlerce hatta binlerce bağımsız insersiyon olayıyla çoğalabilmektedir. Entegrasyon sonrasında ise ERV'ler çoğunlukla mutasyonel yıkım ya da Uzun Terminal Tekrar (LTR) bölgeleri arasında gerçekleşen rekombinasyonlar sonucunda transpozisyon ve viral protein kodlama yeteneklerini kaybederler. Bununla birlikte, işlevsel bütünlüğünü kaybetmiş bu dizilerin konak hücre gen ekspresyonu üzerindeki düzenleyici etkileri devam edebilmektedir. (Buttler ve Chuong, 2022).

Şekil 2: Retrovirüslerin Endojenizasyonu ve Düzenleyici Fonksiyonları (Buttler ve Chuong, 2022)



Epigenetik açıdan değerlendirildiğinde, ERV'lerin büyük bölümü DNA metilasyonu ve baskılayıcı histon modifikasyonları aracılığıyla susturulmuş halde bulunur. Ancak bazı ERV dizilerinin aktif promotör olarak görev yaparak mRNA transkripsiyonunu başlattığı, bazılarının ise enhancer elementler şeklinde gen ekspresyonunu güçlendirdiği gösterilmiştir. Ayrıca belirli ERV elementlerinin, epigenetik olarak aktif ve baskılanmış kromatin bölgeleri arasındaki sınırların oluşumunda rol alan izolatör bölgeler gibi işlev görerek hücresel gen düzenlenmesine katkı sağladığı bildirilmektedir (Buttler ve Chuong, 2022).

Genellikle endojen retrovirüslerin (ERV) konakçıda hastalık yapma potansiyeli olmasa da patojenite gösterdikleri bazı istisnai durumlar mevcuttur. Örneğin; B ve T lenfositleri ile TLR3, TLR7 ve TLR9 reseptörlerinden yoksun RAG eksik farelerde, ERV'lerin replikasyon aktivitesinin yeniden canlandığı ortaya konmuştur. Bu durum, enfeksiyöz ERV'lerin konakçıda onkojenik etki yaratabileceğini göstermektedir. ERV'lerin enfeksiyöz potansiyelini doğrulayan bir diğer durum ise, patojenik özelliğe sahip GALV'nin (Şebek Maymunu Lösemi Virüsü) evrimsel olarak bir kemirgen ERV'sinden türediğinin düşünülmesidir (Yoshikawa ve ark., 2014).

İnsanda Endojen Retroviruslar

Endojen retroviruslar (ERV), zamanla konakçının fizyolojik fonksiyonlarına entegre olarak evrimsel avantajlar sağlamış; bu uyumun özellikle plasental gelişim, embriyogenez ve immün yanıtın düzenlenmesi gibi kritik süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca birçok çalışmada, ERV ekspresyonunun plasentada embriyoya kıyasla belirgin şekilde daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durumun, plasentanın geçici bir organ olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Plasental gelişim sürecinde, viral zarf (Env) geninden köken alan Syncytin-1 ve Syncytin-2 proteinlerinin

fizyolojik açıdan büyük öneme sahip olduğu bildirilmiştir. Bu proteinlerin özellikle trofoblast füzyonunu sağlayarak plasenta morfogenezini yönlendirdiği kanıtlanmıştır. Buna ek olarak, Syncytin-1'in trofoblastik olmayan hücrelerde apoptozu inhibe ettiği ve fetal dokularda bağışıklığın düzenlenmesinde temel bir rol oynadığı belirlenmiştir (Barzoki ve ark., 2023; Chuong, 2018; Wang ve ark., 2024)

Syncytin gibi endojen retroviral element türevli proteinlerin yanlış ekspresyonu preeklampsi gibi gebelik hastalıklarına sebep olduğu bilinmektedir. Kortikotropin salgılatıcı hormonun (CRH) insan genomuna yerleşmiş bir endojen retroviral element olan (THE1B) tarafından kontrol edilmesiyle hamilelik süresinin ve doğum zamanının belirlendiği kanıtlanmıştır (Chuong, 2018; Wang ve ark., 2024).

İnsan endojen retrovirüslerinin (HERV) karsinogenezde hücresel çoğalma, invazyon, hücresel yeniden programlanma gibi kritik süreçlerde önemli ve çok yönlü etkiler gösterdiği ve kök hücre benzeri özelliklerin kazanılması ve sürdürülmesine katkıda bulunmasıyla tümör biyolojisinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Kitsou ve ark., 2023; Wang-Johanning ve ark., 2008).

İnsan endojen retrovirüslerinin (HERV) nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklarla ilişkisi tam olarak aydınlatılamamış olsa da güncel çalışmalar; Multipl Skleroz (MS), Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Alzheimer, Parkinson ve miyastenia gravis gibi hastalıkların patogenezinde bu viral elementlerin rol oynadığını göstermektedir (Simula ve ark., 2025)

Latent proviral sekansların reaktivasyon mekanizmaları incelendiğinde, ekzojen viral enfeksiyonların tetikleyici rolü öne çıkmaktadır. MS patofizyolojisinde gerekli bir faktör olarak

tanımlanan Epstein-Barr virüsü (EBV) ile herpes simplex virüs tipi 1 (HSV-1) enfeksiyonlarının konakçı genomundaki latent HERV sekanslarını transaktive ettiği düşünülmektedir (Simula ve ark., 2025).

İnsan endojen retrovirüslerinin etkileri sadece dejeneratif bozuklarlarla ilişkili değildir. Aynı zamanda psikiyatrik ve nörogelişimsel bozukluklarla bağlantısı ortaya konulmuştur. Sağlıklı hastalarda HERV-W-env antijenemisi nadir tespit edilerken şizofreni, bipolar bozukluk hastaları arasında sıklıkla gözlenmiştir. HERV-W-env tespiti yüksek inflamatuar sitokin seviyesi ve yüksek çocukluk travması skorları ile bağlantılı bulunmuştur. Şizofrenide ise hastalar daha belirgin semptomlar sergilemiş; bipolar bozukluk hastalarında ise hastalık daha genç yaşta görülmüştür. Son olarak HERV'lerin otizm spektrum bozukluğuyla bağlantısı olduğu ortaya konmuştur. OSB tanısı alan çocuklarda yüksek düzeyde HERV-K ve HERV-H ekpresyonu rapor edilmiş olup çocukların annelerinde de HERV ailelerinin ve sitokinlerin anormal ekspresyonu gösterilmiştir (Bo ve ark., 2025; Tamouza ve ark., 2021).

Domuzlarda Endojen Retrovıruslar

Bir çok memelide görülen endojen retrovirüsler domuzlarda da görülmektedir ve insan ksenatransplantasyonunda risk oluşturması açısıyla önemlidir. PERV'ler bir gammaretrovirüstür. PERV-A ve PERV-B insan dahil birçok hücreyi enfekte eden politropik bir virüstür. PERV-C ise yalnızca domuzları enfekte eder. PERV-A ve PERV-C arasında rekombinasyonlar gözlemlenmiştir ve rekombinant PERV-A/C'nin farklı organların hücrelerine entegre olduğu, ancak hayvanların germ hattına entegre olmadığı bulunmuştur. Bu nedenle ksenatransplantasyonda kullanılan hayvanların ERV'den ari olmasına dikkat edilmelidir (Denner, 2016). Gen düzenleme teknolojileri, genomdaki PERV'leri inaktive

hale getirmek için uygun olarak görülse de genom stabilitesini bozarak hücre ölümüne yol açma riskini barındırır. Bir diğer gen düzenleme aracı olan CRISPR/Cas yöntemi ile yapılan PERV inaktivasyonu ise daha etkili sonuçlar vermiştir. Fakat PERV'ün doğal enfeksiyonla insana bulaştığına dair kesin bir kanıt olmaması, CRISPR/Cas uygulanmış transgenik hayvanların üretiminin zor olması ve öngörülemeyen hedef dışı genetik etkilerinin olabileceği göz önüne alındığında; bu stratejinin ksenotransplantasyon uygulamalarında rutin olarak kullanılıp kullanılamayacağı henüz belirsizliğini korumaktadır (Denner, 2022).

Tek Tırnaklı Hayvanlarda Endojen Retrovıruslar

Tek tırnaklı hayvanlarda yapılan çalışmalarda, germ hattına entegre olmuş dokuz farklı soya ait endojen retrovirüs varlığı gösterilmiştir. Gergedanlarda ise yalnızca beş farklı endojen retroviral hat saptanmıştır. Bu durum, atların gergedanlardan evrimsel olarak ayrılmasının ardından dört yeni eksojen retrovirüse maruz kaldığını ve bu virüslerin germ hattına entegre olarak endojenleştiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, yapılan çalışmalar bu endojenizasyon olaylarının Equidae üyelerinin at, eşek ve zebra şeklinde farklı kladlara ayrışmasından önce, yani yaklaşık 3 milyon yıldan daha erken bir dönemde, büyük ölçüde tamamlandığını ortaya koymuştur. Ayrıca EqERV ailelerinin genom entegrasyonlarının farklı zaman dilimlerinde gerçekleştiği ve bu nedenle at genomunda farklı evrimsel örüntülerin şekillendiği bildirilmektedir. Equidae familyasında gerçek gammaretroviruslara rastlanmamasına rağmen, Human Endogenous Retrovirus ile yakın akrabalık gösteren Klad I soyları ile çok daha antik bir retroviral hat olan ERV-L tanımlanmıştır. Bu bulgular, söz konusu endojen retrovirüslerin güncel enfeksiyon etkenlerinden ziyade, evrimsel

süreç boyunca genomda korunmuş genetik izler niteliğinde olduğunu göstermektedir (Gim ve Kim, 2017; Zhu ve ark., 2018).

Koyun Endojen Retrovırusları

Jaagsiekte koyun retrovirüsünün (JSRV) neden olduğu koyun akciğer adenokarsinomu (ovine pulmonary adenocarcinoma; OPA) ve enzootik nazal tümör virüsü (ENTV), endojen homologlara sahip betaretroviruslardır. OPA ve ENT ile enfekte koyunlarda JSRV veya ENTV'ye karşı belirgin bir antikor yanıtı gelişmemektedir. Bu durumun, fetal dönemde enJSRV ekspresyonunun immün tolerans oluşturmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Nitekim yapılan çalışmalarda, koyun fetüsünün ince bağırsağındaki lamina propriaya bağlı lenfoid hücrelerde ve timusta enJSRV ekspresyonu saptanmış, akciğer dokusunda ise düşük düzeyde ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca enJSRV'nin, JSRV ve ENTV ile ortak hücresel reseptör olan hyaluronidaz-2'yi (Hyal-2) kullanması nedeniyle, reseptör interferansı mekanizması aracılığıyla eksojen JSRV'nin hücreye girişini engelleyebileceği düşünülmektedir (Spencer ve ark., 2003).

Koala Endojen Retrovırusları

Endojenleşmesi daha tamamlanmadığı düşünülen koala retrovirüsleri bir gammaretrovirüstür. Şu an tanımlanmış on alt tip koala retrovirüsü vardır: KoRV (A-J). KoRV-A horizontal olarak bulaşan bir endojen retrovirüstür. KoRV-A'nın kendisini tanıyan lenfositleri silmesi sebebiyle self immun toleransa sebep olduğu gösterilmiştir. KoRV ile ilgili diğer bir mekanizma ise KoRV ile bağlantılı olarak tanımlanan Phascolarctos endojen retroelement, PIWI-interacting RNA'lar (piRNA) aracılığıyla transkripsiyon sonrası susturma mekanizmalarında rol oynayabilir. KoRV transkriptlerinden türeyen piRNA'lar ping-pong amplifikasyonu ile antisens piRNA üretimine katkı sağlar ve viral genomun giriş,

transpozisyon ve replikasyonunu baskılayabilir. Aynı zamanda KoRV'nin deneysel enfeksiyonlarda sıçanlarda fibrosarkoma sebep olduğu saptanmıştır (Denner, 2007; Fiebig ve ark., 2015; Yu ve ark., 2019).

Endojen Feline Leukemia Virus (enFeLV)

1. Etiyoloji

Evcil kedilerde bulunan enFeLV, diğer birçok endojen retroviral elementten farklı olarak eksojen FeLV ile biyolojik etkileşim kurabilmesi nedeniyle dikkat çeken bir ERV modelidir.

Feline Leukemia virüs, Retroviridae ailesinde, Orthoretrovirinae alt ailesinde, Gammaretrovirus genusunda bulunan evcil ve vahşi kedileri enfekte edebilen immun supresyon, lenfoma, kemik iliği supresyonuyla ilişkilendirilen viral bir virus ailesinde, Orthoretrovirinae, zarflı, tek iplikçikli, 8,3 kb pozitif ikosahedral simetriye sahip, pozitif polariteli bir RNA virüsüdür. Diğer bütün retroviruslar gibi viral RNA reverse transkriptaz enzimiyle DNA formuna çevrilir ve başka bir enzim olan integraz tarafından provirüs olarak genoma entegre edilir. FeLV A, B, C, D, ve T olmak üzere alt gruplara ayrılır (Chiu ve ark., 2018).

Felis catus dışında kedi türlerinde endojen retrovirüs bulunmamaktadır. Bunun sebebinin endojenizasyonun Felis cinsinin Felidae ailesinden ayrılmasından önce gerçekleştiği düşünülmektedir (Chiu ve VandeWoude, 2020).

Evcil kedilerde bulunan endojen bir gammaretrovirus olan ERV-DC, ERV-DC I, II ve III olmak üzere üç farklı genotipe ayrılmaktadır. genotip I (ERV-DC1, -DC2, -DC3, -DC4, -DC8, DC14, -DC17 ve -DC19), genotip II (ERV-DC7 ve -DC16) ve genotip III (ERV-DC6, -DC10 ve -DC18) Bazı ERV-DC varyantlarının gag, pol ve env genlerini kodlayan açık okuma

çerçevelerine sahip olması, bu elementlerin replikasyon yeteneği kazanarak enfeksiyöz özellik gösterebilmesine olanak tanımaktadır. Özellikle ERV-DC10 ve ERV-DC18 enfeksiyon ve replikasyon yeteneğini korur. ERV-DC18'in yalnız bir kedi ailesinde bulunması bu virusun ERV-DC10 ile bir reenfeksiyon sonucu olduğunu göstermektedir. ERV-DC14 varyantı in vitro koşullarda replikasyon yeteneğine sahip olmasına karşın, Uzun Terminal Tekrar (LTR) bölgesinde meydana gelen nokta mutasyonu sonucu düşük promotör aktivitesi sergilemekte ve bu transkripsiyonel zayıflık, virüsün hücre kültürlerinde persistent bir enfeksiyon kurmasını engellemektedir. (Kuse ve ark., 2016)

Bu bağlamda, ERV-DC'nin babun endojen retrovirüsü (BaEV) ile rekombinasyonu sonucunda kedi kökenli RD-114 retrovirüsünün oluştuğu bildirilmiştir. Nitekim insan rabdomyosarkom hücrelerinin fetal yavru kedilere nakledilmesiyle izole edilen RD-114 provirüsünün BaEV ile yüksek düzeyde genetik homoloji gösterdiği ortaya konmuştur. Ancak söz konusu provirüs bugüne kadar evcil kedi genomundan enfeksiyöz formda doğrudan izole edilememiştir (Kawasaki ve Nishigaki, 2018).

Feline leukemia virus'ün patogenezi, doku tropizmi ve oluşturduğu klinik tablonun şiddeti, büyük ölçüde viral zarf (Env) proteinlerinin hedef hücre yüzeyindeki özgül reseptörlerle kurduğu etkileşimlere bağlıdır. Gammaretrovirüslerde hücreye giriş genellikle Solute Carrier (SLC) ailesine ait çok geçişli transmembran taşıyıcı proteinler aracılığıyla gerçekleşmektedir. FeLV alt tiplerinin farklı hücresel reseptörleri kullanması, enfekte edebildikleri hücre tiplerini ve buna bağlı olarak hastalığın seyrini belirleyen temel faktörlerden biridir. Horizontal yolla bulaşabilen primer ajan FeLV-A, hücreye giriş için tiamin taşıyıcısı olan SLC19A2 (THTR1) reseptörünü kullanır ve çoğunlukla yavaş gelişen immünsupresyon ile lenfoma oluşumu ile ilişkilendirilir. Bununla birlikte, enfeksiyon

sürecinde FeLV'nin konak genomunda yerleşik bulunan endojen retroviral dizilerle rekombinasyona girmesi veya mutasyonlar biriktirmesi, yeni viral alt tiplerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Bu alt tiplerden FeLV-B, hücreye girişte sodyum bağımlı fosfat taşıyıcıları olan SLC20A1 (PiT1) ve PiT2 reseptörlerini kullanır ve FeLV-A'ya kıyasla daha yüksek patojenite ile ilişkilendirilmektedir. Benzer şekilde Koala retrovirus, Gibbon ape leukemia virus, Hervey pteropid gammaretrovirus ve bazı murin lösemi virüsleri gibi farklı gammaretrovirüslerin de fosfat taşıyıcılarını reseptör olarak kullanabilmesi, bu reseptör ailesinin retroviral enfeksiyonların yayılımı ve türler arası geçiş potansiyeli açısından önemli bir rol oynadığını göstermektedir. FeLV-C ise hücreye girişte heme eksporteri olarak görev yapan SLC49A1 (FLVCR1) reseptörünü kullanmakta ve farklı patojenik özellikler göstermektedir (Bolin ve Levy, 2011).

Çoğu retrovirüste env geni tarafından kodlanan yüzey birimi (SU), hücre yüzeyindeki reseptöre bağlanarak transmembran (TM) biriminin aracılığıyla hücreye giriş (füzyon) sürecini başlatmak için tek başına yeterli olurken, FeLV-T alt tipi FeLV-A'dan evrimleşme sürecinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda bu otonom giriş yeteneğini kaybetmiş ve hücreye giriş için ek bir kofaktöre bağımlı hâle gelmiştir. T hücre tropizmi gösteren FeLV-T, enfeksiyon oluşturabilmek için PiT1 (inorganik fosfat taşıyıcısı 1) reseptörüne ek olarak FeLIX adı verilen çözünür bir kofaktöre ihtiyaç duyar (Pramono ve ark., 2024). FeLIX, endojen FeLV kökenli kusurlu bir env geninden türeyen ve çözünür zarf proteini niteliği taşıyan bir molekül olup, FeLV-T'nin hücre yüzeyine bağlanmasını kolaylaştırarak viral giriş sürecinde kritik bir rol üstlenir. Ayrıca FeLV-B zarf proteinlerinin reseptör bağlanma bölgesi ile yüksek düzeyde sekans benzerliği göstermektedir. Bununla birlikte FeLIX tek başına enfeksiyon için yeterli değildir; FeLV-T'nin hücreye

girişinin gerçekleşebilmesi için PiT1 reseptörünün varlığı zorunludur ve enfeksiyon süreci FeLIX–PiT1 etkileşimi üzerinden ilerler. Ayrıca FELIX aktiviteleri yalnızca evcil kedilerde tespit edilmiş olup test edilmesine rağmen diğer kedilerde saptanamamıştır (Sakaguchi ve ark., 2015).

Doğal enfeksiyonlarda FeLV-T'ye nadiren rastlanmasına rağmen deneysel enfeksiyonlarda kedilerde ciddi immün yetmezliğe neden olduğu gösterilmiştir. Bu durum, endojen retroviral elemanlardan türeyen bazı proteinlerin yalnızca konak savunmasında değil, belirli viral alt tiplerin enfektivitesini artıran kofaktörler olarak da işlev görebileceğini göstermektedir (Lauring ve ark., 2001).

Bununla birlikte, endojen retroviral dizilerin etkisi enfeksiyonu kolaylaştırmakla sınırlı değildir. Felid evrimi boyunca konak genomuna entegre olmuş endojen retroviral lokuslar, bazı durumlarda eksojen retrovirüslere karşı intrinsik bir savunma mekanizması da oluşturmaktadır. Bu antiviral etki, endojen lokuslardan sentezlenen ve C-terminal transmembran bölgesinden yoksun çözünür karakterdeki kusurlu Env proteinleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Örneğin ERV-DC7 ve ERV-DC16 lokuslarından sentezlenen Refrex1 proteini, hücre yüzeyindeki CTR1 reseptörlerine kompetitif olarak bağlanarak reseptörü işgal etmekte ve böylece FeLV-D benzeri virüslerin hücreye girişini reseptör interferansı yoluyla güçlü şekilde baskılamaktadır. Benzer biçimde, endojen FeLV kaynaklı çözünür Env proteinlerinin PiT1 reseptörü üzerinden FeLV-B ve ilişkili gammaretrovirüslerin hücreye girişini sınırlandırabildiği de gösterilmiştir (Tury ve ark., 2022).

Evcil kedilerde çeşitli endojen retrovirüs (ERV) tipleri tanımlanmış olmasına rağmen, uzun süre boyunca doğada aktif ve enfeksiyöz bir ERV sınıfı gösterilememiştir. Bununla birlikte,

yapılan çalışmada (Anai ve ark., 2012) enfeksiyöz özellik gösteren ERV-DC10 provirüsünün yakın dönemde genom içinde farklı bir lokusa transloke olması veya yeniden entegre olması sonucunda ERV-DC18 formunun ortaya çıktığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, belirli ERV-DC lokuslarının evcil kedilerde tanımlanan rekombinant FeLV-D suşunun oluşumu için gerekli *env* genini donör olarak sağladığı da gösterilmiştir. Buna göre FeLV-D'nin, *env* bölgesinde genotip I ERV-DC dizileri ile gerçekleşen rekombinasyon sonucunda oluştuğu ve diğer FeLV alt gruplarından farklı bir hücresel tropizm sergilediği ifade edilmiştir (Ngo ve ark., 2024).

Endojen retrovirüslerle ilgili diğer bir tehlike ise bulaşıcı ERV ile kontamine hücre hatlarında üretilen aşılardır. Embriyolu tavuk hatlarında üretilen insan MMR aşısının ALV ve EAV ile kontamine olduğu bildirilmiştir. Bu ERVlerin insanları enfekte ettiğine dair kanıt yoktur. Hayvan aşılarında ise bulaşıcı ERV RD-114 ile kontamine aşıların üretildiği tespit edilmiştir (Miyazawa ve ark., 2010). RD-114 ERV'ünün reseptörü sodyum bağımlı nötr aminoasit taşıyıcısıdır (ASCT-1,2). Köpeklerde bu reseptörlerin dağılımı belirsizliğini korumaktadır. Deneysel olarak RD-114 ile enfekte edilmiş köpeklerde kemik iliğinde enfeksiyon saptanmış olup deri altı yolla RD-114 inokule edilmiş köpeklerle yapılan bir çalışmada periferik kanda proviral DNA saptanmamıştır. RD-114 ERV'ün köpeklerde kan hücreleri, mezenterik lenf düğümleri, dalak ve lenf düğümlerinde sınırlı kalması sebebiyle olabileceği düşünülmektedir. Yüksek doz RD-114 ERV inoküle edilen köpeklerde RD-114 antikorları ve nötralizan antikorlar tespit edilmiştir. RD-114 ile kontamine aşıların oluşturduğu riskler net olmamakla birlikte daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Yoshikawa ve ark., 2014).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada aşılı olduğu bilinen kedilerde %50 oranında enFeLV pozitifliği saptanmış olup, aşı

üretim sürecinde kullanılan kedi hücre kültürlerinin enFeLV başta olmak üzere ERVE açısından taranması gerekliliği vurgulanmıştır (Koç ve Oğuzoğlu, 2023).

Basit bir gammaretrovirüs olan FeLV genetik olarak hastalığı kodlayabileceği bir gen taşımaz. Doğal popülasyonda horizontal olarak yalnız FeLV-A bulaşma yeteneğine sahiptir. FeLV-A uğradığı mutasyonlar veya genomda var olan endojen FeLV ile rekombinasyonnu sonucu yeni formda virüsler ortaya çıkar (Lutz ve ark., 2009; Willett ve Hosie, 2013).

EnFeLV ve FeLV-A arasında %86 oranında nükleotid benzerliği saptanmıştır. EnFeLV ve ve FeLV-A arasındaki varyasyon LTR ve *env* bölgesidir ve aralarında birden çok rekombinasyon olduğu ortaya konmuştur. Bununla birlikte FeLV-B alt tipinin konakçıda de novo olarak üretildiği belirlenmiştir. Buna ek olarak FeLV-B'nin yalnız konakçıda de novo üretilmesinin yanısıra horizontal olarak bulaştığı da ortaya konmuştur. (Erbeck ve ark., 2021)

FeLV ile doğal olarak enfekte kedilerde endojen FeLV (enFeLV) kopya sayısının cinsiyete göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Erkek kedilerde enFeLV kopya sayısının daha yüksek olduğu ve bu artışın FeLV viral yükü ile ters orantılı olduğu belirlenirken, dişi kedilerde daha düşük enFeLV kopya sayısının progresif enfeksiyon gelişimi ve FeLV-B alt tipine yakalanma olasılığındaki artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada FeLV enfeksiyonunun Feline Foamy Virus (FFV), Feline Gammaherpesvirus-1 (FcaGHV-1) ve Feline Coronavirus (FCoV) ile olan etkileşimi de incelenmiş; özellikle başka bir retrovirüs olan FFV ile koinfeksiyon varlığında löseminin daha progresif bir seyir izlediği gözlenmiştir. Elde edilen bu bulgular, konak genomunda bulunan enFeLV kopya sayısının FeLV enfeksiyonunun patogenezi

ve hastalığın seyri üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca eşlik eden viral enfeksiyonların, özellikle retroviral koinfeksiyonların, hastalığın progresyonunu hızlandırarak klinik tabloyu ağırlaştırabileceği anlaşılmaktadır. Eksojen FeLV ile endojen FeLV arasındaki bu negatif korelasyonun reseptör interferansı mekanizması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu ilişkinin özellikle enFeLV'nin LTR bölgesine bağlı ekspresyon özellikleri ile bağlantılı olduğu öne sürülmektedir (Powers ve ark., 2018; Chiu ve VandeWoude, 2020).

McDougall ve ark. (1994) tarafından yapılan çalışmada, kedilerin lenfoid hücrelerinde eksprese edilen kusurlu enFeLV provirüslerinin envelope proteinleri sentezleyerek FeLV-B'nin kullandığı reseptörleri bloke ettiği ve bu sayede viral girişin engellenmesine bağlı doğal bir direnç mekanizması oluşturduğu ortaya konmuştur. Bununla birlikte, FeLV ile enfekte kedilerde endojen FeLV proviral yükünün FeLV-negatif kedilere kıyasla daha yüksek olduğunu bildirilmiştir(Tandon ve ark., 2008a). Bu bulgu, enFeLV sekanslarının yalnızca koruyucu bir rol üstlenmediğini, aynı zamanda enfeksiyonun erken döneminde viral replikasyonu geçici olarak artırarak FeLV enfeksiyon dinamiklerini etkileyebileceğini düşündürmektedir.

2. Epidemiyoloji

Feline leukemia virüsü (FeLV), enfekte kedilerin başta tükürüğü olmak üzere nasal sekresyon, süt, idrar, dışkı gibi çeşitli vücut sıvılarında bulunmakla birlikte, en yüksek viral yük genellikle tükürükte saptanmaktadır. (Gomes-Keller ve ark., 2006). Bu nedenle enfeksiyon; mama ve su kaplarının ortak kullanımı, karşılıklı temizlenme davranışı ve yakın temas içeren sosyal etkileşimler yoluyla horizontal olarak bulaşabilmektedir. Buna ek olarak enfeksiyonun vertikal yolla enfekte anneden yavruya bulaşabileceği

de gösterilmiştir. Enfeksiyon ırk, cinsiyet veya yaşa özgü olmasa da, gruplar halinde yaşayan yetişkin kedilerde karşılıklı tüy bakımı gibi sosyal davranışlar nedeniyle, erkeklerde bölgesel davranışlar nedeniyle ve sokak kedilerinde daha yüksek enfeksiyon oranları gözlemlenmiştir (Hofmann-Lehmann ve Hartmann, 2020).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda eksojen FeLV moleküler olarak tespit edilmemiş olup yapılan çalışmalar p27 antijen tespiti ve endojen FeLV tespiti üzerinedir.

Korkulu ve ark. (2024) tarafından yapılan çalışmada enFeLV pozitiflik oranı %20,36 olarak tespit edilmiş olup pozitif tespit edilen hayvanların %42,85'inin diğer hastalıklar (FPV, DCHV, FCoV, FIV) yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir.

FeLV'ün moleküler karakterizasyonu için yapılan diğer bir çalışmada klinik olarak sağlıklı kedilerde enFeLV pozitiflik oranı %6.8 olarak saptanırken klinik olarak hasta görünümlü kedilerde %43,6 olarak tespit edilmiştir. Bu veriler doğrultusunda ERV-DC 'in horizontal olarak bulaşarak enfeksiyöziteye sebep vermese de konakçıdaki varlığının klinik durumda etkili olduğu ortaya konmuştur (Koç ve Oğuzoğlu, 2023).

3. Patogenez

FeLV enfeksiyonu genellikle orofarinks bölgesinde başlar. Virüs, ilk olarak tonsillerde ve primer lenf nodlarında çoğalır; ardından lenfoid dokulardaki lenfositleri ve monositleri enfekte ederek dolaşım aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine yayılır. Bu erken yayılım dönemi primer viremi olarak adlandırılır. Virüsün kemik iliğine ulaşmasıyla birlikte burada nötrofil ve trombosit prekürsör hücrelerini enfekte etmesi sonucu sekonder viremi gelişir. Bu aşamada virüs sistemik dolaşıma daha yoğun şekilde yayılır ve

enfeksiyon tüm vücutta etkili hale gelir. (Hofmann-Lehmann ve Hartmann, 2020)

FeLV ile en çok ilişkilendirilen malign hastalık lenfomadır ve doğrudan tümör oluşumuna sebep olacak onkogen taşımaz. Lenfoma vakalarında enFeLV ekspresyonun azaldığı görülmüş olsa enFeLV ün patogenezdeki rolü belirsizliğini korumaktadır (Bolin ve Levy, 2011).

4. Klinik Bulgular

FeLV, immunsupresyon, lenfoma ve kemik iliği supresyonuyla karakterizedir. Fakat FeLV enfeksiyonu konakçının yaşına ve immun sisteminin durumuna bağlıdır.Yaygın görülen klinik belirtiler arasında kilo kaybı, tüy yapısının bozulması, lenfadenopati, mukoza zarlarının solması, tekrarlayan enfeksiyonlar, sürekli ateş ve göz hastalıkları yer alır (Urig ve ark., 2026).

EnFeLV'ler mutasyonlar sonucu kendi başlarına bulaşıcı virüs kodlayamamalarına rağmen exFeLV ile rekombinasyonları sonucu eksojen virusun genetik yapısını değiştirerek patojeniteyi önemli ölçüde etkiler (Polani ve ark., 2010)

5. Teşhis

Feline Leukemia Virus'un teşhisi gag gen bölgesi tarafından kodlanan p27 antijen tespitiyle, proviral DNA ve viral RNA'nın kanda tespitiyle yapılır. POC test yapılırken serum, plazma, tam kan, tükürük, konjunktival swap kullanılabilir. Genellikle enfeksiyon maruziyetinden sonra otuz gün içinde test pozitif sonuç verir. Asemptomatik kedilerde farklı bir ticari markanın POC testi, proviral DNA'nın PCR ile tespiti, p27 antijeninin tespiti için ELISA önerilir. Yapılan p27 antijen testinde serum, plazma veya tam kan kullanılması önerilir (Hofmann-Lehmann ve Hartmann, 2020).

FeLV tespiti için immunofloresans, virus izolasyonu gibi çeşitli yöntemler kullanılsa dahi gen hedef dizilerinin hızlı, spesifik ve daha hassas bir şekilde incelenmesi sebebiyle PCR güncelliğini koruyan bir tanı yöntemidir. Feline Leukemia Virüs enfeksiyonlarının moleküler tanısında karşılaşılan en büyük diagnostik zorluk, evcil kedilerin tamamının genomunda halihazırda endojen FeLV (enFeLV) sekanslarının proviral DNA formunda bulunmasıdır (Tandon ve ark., 2008b).

Teşhis amacıyla uygulanan standart polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testlerinde, retrovirüslerin evrimsel süreçte yüksek oranda korunmuş olan gag veya pol gibi iç gen bölgeleri hedef alındığında; kullanılan primerler, sonradan bulaşmış aktif eksojen FeLV (exFeLV) ile genomda doğuştan var olan enFeLV dizilimlerini her zaman spesifik olarak birbirinden ayırt edemeyebilmektedir (Chiu ve ark., 2018 ; Tandon ve ark., 2008b)

Bu durum, özellikle asemptomatik kedilerde yürütülen epidemiyolojik saha prevalans çalışmalarında, çapraz reaksiyonlara (cross-reaction) bağlı "yalancı pozitif" sonuçların ortaya çıkmasına zemin hazırlamaktadır (Hofmann-Lehmann ve Hartmann, 2020).

Sahadan elde edilmiş örneklerde saptanan PCR pozitifliğinin; aktif bir exFeLV enfeksiyonunu mu, yoksa nesilden nesile aktarılmış olan bir enFeLV kalıntısını mı işaret ettiğini belirlemek, prevalans dinamiklerinin doğru yorumlanması açısından önemlidir. exFeLV ve enFeLV arasında genetik varyasyonun en yüksek olduğu LTR bölgesinin U3 segmentinin hedeflendiği spesifik PCR primer tasarımları, eksojen varyantların endojen dizilerden ayırt edilmesini sağlar (Roca ve ark., 2005).

Sonuç

Endojen retrovirüsler (ERV), uzun yıllar boyunca konak genomunda işlevsiz viral kalıntılar olarak değerlendirilmiş olsa da, günümüzde yapılan çalışmalar bu elementlerin konak biyolojisi üzerinde çok yönlü etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. ERV'lerin plasental gelişim, immün yanıtın düzenlenmesi, hücresel farklılaşma ve gen ekspresyonunun kontrolü gibi fizyolojik süreçlerde rol alabildiği; bunun yanında onkogenez, nörodejeneratif hastalıklar ve otoimmün mekanizmalarla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Chuong, 2018; Kitsou ve ark., 2023; Simula ve ark., 2025).

Hayvanlarda tanımlanan endojen retrovirüs modelleri, retroviral endojenizasyon süreçlerinin anlaşılmasında önemli bilgiler sağlamaktadır. Özellikle domuz endojen retrovirüslerinin (PERV) ksenotransplantasyon açısından oluşturduğu potansiyel zoonotik riskler, koala retrovirüslerinin devam eden endojenizasyon süreci ve koyunlarda gözlenen reseptör interferansı mekanizmaları; ERV'lerin yalnızca evrimsel genomik kalıntılar olmadığını, aynı zamanda aktif biyolojik sonuçlar doğurabildiğini göstermektedir (Denner, 2016; Spencer ve ark., 2003; Yu ve ark., 2019).

Veteriner virolojisi açısından önemli modellerden biri olan endojen Feline Leukemia Virus (enFeLV), eksojen FeLV ile olan rekombinasyon ilişkisi nedeniyle dikkat çekmektedir. enFeLV sekanslarının yeni viral alt tiplerin oluşumunda genetik rezervuar görevi üstlenebilmesi; buna karşılık bazı endojen env proteinlerinin reseptör interferansı aracılığıyla antiviral etki gösterebilmesi, endojen retroviral elementlerin çift yönlü biyolojik etkilerini ortaya koymaktadır (Anai ve ark., 2012; Ngo ve ark., 2024; Tury ve ark., 2022). Ayrıca enFeLV ile FeLV arasındaki ilişkinin, viral tropizm, patogenez ve hastalığın klinik seyri üzerinde belirleyici olduğu düşünülmektedir (Chiu ve VandeWoude, 2020).

Bununla birlikte, endojen retrovirüslerin biyolojik etkileri ve hastalıklarla ilişkileri halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Özellikle latent ERV sekanslarının hangi koşullarda reaktive olduğu, konak immün sistemiyle olan etkileşimleri ve farklı türlerdeki patojenik potansiyelleri ileri araştırmalar gerektirmektedir. Ayrıca hücre kültürü kaynaklı aşı üretim süreçlerinde ERV kontaminasyonu riskinin dikkate alınması ve biyogüvenlik prosedürlerinin geliştirilmesi önem taşımaktadır (Miyazawa ve ark., 2010; Yoshikawa ve ark., 2014; Koç ve Oğuzoğlu, 2023).

Sonuç olarak endojen retrovirüsler; evrimsel biyoloji, immünoloji, onkoloji ve veteriner virolojisi alanlarının kesişiminde yer alan, yalnızca geçmiş viral enfeksiyonların izleri değil, aynı zamanda konak biyolojisini şekillendiren dinamik genetik elementler olarak değerlendirilmelidir. Bu nedenle ERV'lere yönelik yapılacak moleküler ve fonksiyonel çalışmaların, hem retroviral patogenezin anlaşılmasına hem de gelecekte geliştirilecek tanı, tedavi ve biyogüvenlik stratejilerine önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Kaynakça

Anai, Y., Ochi, H., Watanabe, S., Nakagawa, S., Kawamura, M., Gojobori, T., & Nishigaki, K. (2012). Infectious endogenous retroviruses in cats and emergence of recombinant viruses. *Journal of Virology*, *86*(16), 8634–8644. doi:10.1128/JVI.00280-12

Belshaw, R., Watson, J., Katzourakis, A., Howe, A., Woolven-Allen, J., Burt, A., & Tristem, M. (2007). Rate of recombinational deletion among human endogenous retroviruses. *Journal of Virology*, *81*(17), 9437–9442. doi:10.1128/JVI.02216-06

Bo, M., Carta, A., Cipriani, C., Cavassa, V., Simula, E. R., Huyen, N. T., … Sechi, L. A. (2025). HERVs endophenotype in autism spectrum disorder: Human endogenous retroviruses, specific immunoreactivity, and disease association in different family members. *Microorganisms*, *13*(1), 9. doi:10.3390/microorganisms13010009

Bolin, L. L., & Levy, L. S. (2011). Viral determinants of FeLV infection and pathogenesis: Lessons learned from analysis of a natural cohort. *Viruses*, *3*(9), 1681–1698. doi:10.3390/v3091681

Buttler, C. A., & Chuong, E. B. (2022). Emerging roles for endogenous retroviruses in immune epigenetic regulation. *Immunological Reviews*, *305*(1), 165–178. doi:10.1111/imr.13042

Chiu, E. S., Hoover, E. A., & VandeWoude, S. (2018). A retrospective examination of feline leukemia subgroup characterization: Viral interference assays to deep sequencing. *Viruses*, *10*(1), 29. doi:10.3390/v10010029

Chiu, E. S., & VandeWoude, S. (2020). Presence of endogenous viral elements negatively correlates with feline leukemia virus

susceptibility in puma and domestic cat cells. *Journal of Virology*, *94*(21), e01274-20. doi:10.1128/JVI.01274-20

Chuong, E. B. (2018). The placenta goes viral: Retroviruses control gene expression in pregnancy. *PLOS Biology*, *16*(10), 1–7. doi:10.1371/journal.pbio.3000028

Denner, J. (2007). Transspecies transmissions of retroviruses: New cases. *Virology*, *369*(2), 229–233. doi:10.1016/j.virol.2007.07.026

Denner, J. (2016). How active are porcine endogenous retroviruses (PERVs)? *Viruses*, *8*(8), 215. doi:10.3390/v8080215

Denner, J. (2022). Virus safety of xenotransplantation. *Viruses*, *14*(9), 1926. doi:10.3390/v14091926

Erbeck, K., Gagne, R. B., Kraberger, S., Chiu, E. S., Roelke-Parker, M., & VandeWoude, S. (2021). Feline leukemia virus (FeLV) endogenous and exogenous recombination events result in multiple FeLV-B subtypes during natural infection. *Journal of Virology*, *95*(18), e00353-21. doi:10.1128/JVI.00353-21

Fiebig, U., Keller, M., Möller, A., Timms, P., & Denner, J. (2015). Lack of antiviral antibody response in koalas infected with koala retroviruses (KoRV). *Virus Research*, *198*, 30–34. doi:10.1016/j.virusres.2015.01.002

Gholami Barzoki, M., Shatizadeh Malekshahi, S., Heydarifard, Z., Mahmodi, M. J., & Soltanghoraee, H. (2023). The important biological roles of Syncytin-1 of human endogenous retrovirus W (HERV-W) and Syncytin-2 of HERV-FRD in the human placenta development. *Molecular Biology Reports*, *50*(9), 7901–7907. doi:10.1007/s11033-023-08658-0

Gim, J.-A., & Kim, H.-S. (2017). Identification and expression analyses of equine endogenous retroviruses in horses. *Molecules and Cells*, *40*(10), 796–804. doi:10.14348/molcells.2017.0141

Gomes-Keller, M. A., Gönczi, E., Tandon, R., Riondato, F., Hofmann-Lehmann, R., Meli, M. L., & Lutz, H. (2006). Detection of feline leukemia virus RNA in saliva from naturally infected cats and correlation of PCR results with those of current diagnostic methods. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(3), 916–922. doi:10.1128/JCM.44.3.916-922.2006

Hofmann-Lehmann, R., & Hartmann, K. (2020). Feline leukaemia virus infection: A practical approach to diagnosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *22*(9), 831–846. doi:10.1177/1098612X20941785

Kawasaki, J., & Nishigaki, K. (2018). Tracking the continuous evolutionary processes of an endogenous retrovirus of the domestic cat: ERV-DC. *Viruses*, *10*(4), 179. doi:10.3390/v10040179

Kitsou, K., Lagiou, P., & Magiorkinis, G. (2023). Human endogenous retroviruses in cancer: Oncogenesis mechanisms and clinical implications. *Journal of Medical Virology*, *95*(1), e28350. doi:10.1002/jmv.28350

Koç, B. T., & Oğuzoğlu, T. Ç. (2023). Does endogenous feline leukemia virus occur as a risk factor?: A molecular characterization study from Türkiye: Molecular analysis of enFeLVs. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *74*(3), 6093–6098. doi:10.12681/jhvms.30837

Kuse, K., Ito, J., Miyake, A., Kawasaki, J., Watanabe, S., Makundi, I., … Nishigaki, K. (2016). Existence of two distinct infectious endogenous retroviruses in domestic cats and their different

strategies for adaptation to transcriptional regulation. *Journal of Virology*, *90*. doi:10.1128/jvi.00716-16

Lauring, A. S., Anderson, M. M., & Overbaugh, J. (2001). Specificity in receptor usage by T-cell-tropic feline leukemia viruses: Implications for the in vivo tropism of immunodeficiency-inducing variants. *Journal of Virology*, *75*(19), 8888–8898. doi:10.1128/JVI.75.19.8888-8898.2001

Lutz, H., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., … Horzinek, M. C. (2009). Feline leukaemia: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *11*(7), 565–574. doi:10.1016/j.jfms.2009.05.005

McDougall, A. S., Terry, A., Tzavaras, T., Cheney, C., Rojko, J., & Neil, J. C. (1994). Defective endogenous proviruses are expressed in feline lymphoid cells: Evidence for a role in natural resistance to subgroup B feline leukemia viruses. *Journal of Virology*, *68*(4), 2151–2160. doi:10.1128/jvi.68.4.2151-2160.1994

Miyazawa, T., Yoshikawa, R., Golder, M., Okada, M., Stewart, H., & Palmarini, M. (2010). Isolation of an infectious endogenous retrovirus in a proportion of live attenuated vaccines for pets. *Journal of Virology*, *84*(7), 3690–3694. doi:10.1128/JVI.02715-09

Ngo, M. H., AbuEed, L., Kawasaki, J., Oishi, N., Pramono, D., Kimura, T., … Nishigaki, K. (2024). Multiple recombination events between endogenous retroviral elements and feline leukemia virus. *Journal of Virology*, *98*(2), e01400-23. doi:10.1128/jvi.01400-23

Polani, S., Roca, A. L., Rosensteel, B. B., Kolokotronis, S. O., & Bar-Gal, G. K. (2010). Evolutionary dynamics of endogenous feline

leukemia virus proliferation among species of the domestic cat lineage. *Virology*, *405*(2), 397–407. doi:10.1016/j.virol.2010.06.010

Powers, J. A., Chiu, E. S., Kraberger, S. J., Roelke-Parker, M., Lowery, I., Erbeck, K., … VandeWoude, S. (2018). Feline leukemia virus (FeLV) disease outcomes in a domestic cat breeding colony: Relationship to endogenous FeLV and other chronic viral infections. *Journal of Virology*, *92*(18), e00649-18. doi:10.1128/JVI.00649-18

Pramono, D., Takeuchi, D., Katsuki, M., AbuEed, L., Abdillah, D., Kimura, T., … Nishigaki, K. (2024). FeLIX is a restriction factor for mammalian retrovirus infection. *Journal of Virology*, *98*(4), e01771-23. doi:10.1128/jvi.01771-23

Roca, A. L., Nash, W. G., Menninger, J. C., Murphy, W. J., & O'Brien, S. J. (2005). Insertional polymorphisms of endogenous feline leukemia viruses. *Journal of Virology*, *79*(7), 3979–3986. doi:10.1128/JVI.79.7.3979-3986.2005

Sakaguchi, S., Shojima, T., Fukui, D., & Miyazawa, T. (2015). A soluble envelope protein of endogenous retrovirus (FeLIX) present in serum of domestic cats mediates infection of a pathogenic variant of feline leukemia virus. *The Journal of General Virology*, *96*(Pt 3), 681–687. doi:10.1099/vir.0.071688-0

Simula, E. R., Jasemi, S., Cossu, D., Fais, M., Cossu, I., Chessa, V., … Sechi, L. A. (2025). Human endogenous retroviruses as novel therapeutic targets in neurodegenerative disorders. *Vaccines*, *13*(4), 415. doi:10.3390/vaccines13040415

Spencer, T. E., Mura, M., Gray, C. A., Griebel, P. J., & Palmarini, M. (2003). Receptor usage and fetal expression of ovine endogenous betaretroviruses: Implications for coevolution of endogenous and

exogenous retroviruses. *Journal of Virology, 77*(1), 749–753. doi:10.1128/JVI.77.1.749-753.2003

Tamouza, R., Meyer, U., Foiselle, M., Richard, J. R., Wu, C. L., Boukouaci, W., … Leboyer, M. (2021). Identification of inflammatory subgroups of schizophrenia and bipolar disorder patients with HERV-W ENVantigenemia by unsupervised cluster analysis. *Translational Psychiatry*, *11*(1), 377. doi:10.1038/s41398-021-01499-0

Tandon, R., Cattori, V., Pepin, A. C., Riond, B., Meli, M. L., McDonald, M., … Hofmann-Lehmann, R. (2008a). Association between endogenous feline leukemia virus loads and exogenous feline leukemia virus infection in domestic cats. *Virus Research*, *135*(1), 136–143. doi:10.1016/j.virusres.2008.02.016

Tandon, R., Cattori, V., Willi, B., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2008b). Quantification of endogenous and exogenous feline leukemia virus sequences by real-time PCR assays. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *123*(1-2), 129–133. doi:10.1016/j.vetimm.2008.01.027

Tury, S., Giovannini, D., Ivanova, S., Touhami, J., Courgnaud, V., & Battini, J.-L. (2022). Identification of copper transporter 1 as a receptor for feline endogenous retrovirus ERV-DC14. *Journal of Virology*, *96*(12), e00229-22. doi:10.1128/jvi.00229-22

Urig, H. E., Woodruff, K. A., Brookshire, W. C., & Smith, D. R. (2026). Feline leukemia virus point-of-care lateral flow tests have low positive predictive value in apparently healthy shelter cats. *Frontiers in Veterinary Science*, *13*, 1752228. doi:10.3389/fvets.2026.1752228

Wang, J., Lu, X., Zhang, W., & Liu, G.-H. (2024). Endogenous retroviruses in development and health. *Trends in Microbiology*, *32*(4), 342–354. doi:10.1016/j.tim.2023.09.006

Wang-Johanning, F., Radvanyi, L., Rycaj, K., Plummer, J. B., Yan, P., Sastry, K. J., … Johanning, G. L. (2008). Human endogenous retrovirus K triggers an antigen-specific immune response in breast cancer patients. *Cancer Research*, *68*(14), 5869–5877. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6838

Weiss, R. A. (2006). The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology*, *3*(1), 67. doi:10.1186/1742-4690-3-67

Willett, B. J., & Hosie, M. J. (2013). Feline leukaemia virus: Half a century since its discovery. *The Veterinary Journal*, *195*(1), 16–23. doi:10.1016/j.tvjl.2012.07.004

Yoshikawa, R., Shimode, S., Sakaguchi, S., & Miyazawa, T. (2014). Contamination of live attenuated vaccines with an infectious feline endogenous retrovirus (RD-114 virus). *Archives of Virology*, *159*(3), 399–404. doi:10.1007/s00705-013-1809-1

Yoshikawa, R., Shimode, S., Sakaguchi, S., & Miyazawa, T. (2014). Contamination of live attenuated vaccines with an infectious feline endogenous retrovirus (RD-114 virus). *Archives of Virology*, *159*(3), 399–404. doi:10.1007/s00705-013-1809-14

Yu, T., Koppetsch, B. S., Pagliarani, S., Johnston, S., Silverstein, N. J., Luban, J., … Theurkauf, W. E. (2019). The piRNA response to retroviral invasion of the koala genome. *Cell*, *179*(3), 632–643.e12. doi:10.1016/j.cell.2019.09.002

Zhu, H., Gifford, R. J., & Murcia, P. R. (2018). Distribution, diversity, and evolution of endogenous retroviruses in perissodactyl

genomes. *Journal of Virology*, *92*(23), e00927-18. doi:10.1128/JVI.00927-18

BÖLÜM 3

EMBRİYOLU TAVUK YUMURTASINA VİRUS İNOKÜLASYON YÖNTEMLERİ

Yunus ÇAKICI[1]
Irmak DİK[2]

Giriş

Tavuk yumurtası, embriyonik gelişimin sürdürülebilmesi için gerekli besin maddelerini, sıvıları ve koruyucu yapıları bünyesinde bulunduran özgün bir biyolojik sistemdir. Kanatlılarda embriyonik gelişimin büyük bölümü anne vücudunun dışında gerçekleştiğinden, yumurtanın yapısı gelişmekte olan embriyonun enerji, su, mineral ve protein gereksinimlerini karşılayacak şekilde özelleşmiştir. Bu özellik, tavuk yumurtasını yalnızca üreme açısından değil, embriyoloji, gelişim biyolojisi, immünoloji ve özellikle viroloji açısından da önemli bir araştırma materyali haline getirmiştir (Estienne ve ark., 2020).

Viruslar, diğer mikroorganizmalardan farklı olarak özgün biyolojik yapıları ve zorunlu hücre içi parazit olma özellikleri

[1] Veteriner Hekim, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Orcid: 0000-0003-3408-4858
[2] Doç. Dr., Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, Orcid: 0000-0003-2516-9489

nedeniyle replikasyonlarını yalnızca canlı ve metabolikolarak aktif konak hücrelerinde gerçekleştirebilmektedir. Bu bağlamda embriyolu tavuk yumurtası, bünyesinde barındırdığı farklı doku ve zarlar sayesinde virus üretimi için son derece elverişli bir in vivo model sunmakta ve 20. yüzyılın başından bu yana viroloji çalışmalarında temel bir sistem olarak kullanılmaktadır (Yazıcı ve ark., 2021; Yeşilbağ, 2017).

Embriyolu tavuk yumurtalarının virolojideki kullanımının temelinde, gelişmekte olan embriyonun farklı doku ve hücre tiplerine sahip olması ve bu yapıların farklı virusların çoğalmasını destekleyebilmesi yatmaktadır. Ayrıca yumurtanın nispeten kapalı ve aseptik bir biyolojik sistem oluşturması, kolay temin edilebilmesi, bakım gereksiniminin düşük olması ve bazı viruslarda yüksek titrelerde virus elde edilebilmesi önemli avantajlar sağlamaktadır. Özellikle belirli patojenlerden ari sürülerden elde edilen yumurtaların kullanılması, deneysel çalışmaların standardizasyonu açısından önem taşımaktadır. İn vitro yöntemlerin yaygınlaşmasıyla kullanım alanı azalmış olmakla birlikte, embriyolu tavuk yumurtaları özellikle influenza viruslarının izolasyonu, çoğaltılması ve aşı üretimi gibi alanlarda günümüzde de kullanılmaktadır (Condit, 2013; Fenner ve ark., 1987).

Embriyolu tavuk yumurtasında virusların başarılı şekilde çoğaltılabilmesi, virusun biyolojik özelliklerine ve doku tropizmine uygun inokülasyon bölgesinin seçilmesine bağlıdır. Allantoik boşluk, amniyotik boşluk, koryoallantoik membran ve vitellus kesesi başlıca inokülasyon bölgelerini oluştururken, seçilecek yol virusun hedeflediği doku, embriyonun gelişim dönemi ve çalışmanın amacına göre değişebilmektedir. Örneğin influenza viruslarının çoğaltılmasında allantoik yol yaygın olarak kullanılırken, bazı viruslarda amniyotik boşluğa inokülasyon veya koryoallantoik membran tercih edilmektedir. Bu nedenle embriyolu tavuk yumurtalarının virolojik amaçlarla etkin şekilde kullanılabilmesi

için öncelikle embriyolu yumurtanın anatomisinin ve fizyolojisin anlaşılması gerekmektedir (Akın, 1973; Morishita ve ark., 2021). Bu bölümde, tavuklarda yumurta kanalı ve yumurtanın oluşumu kısaca ele alındıktan sonra başlıca virus inokülasyon yöntemleri değerlendirilecektir.

EMBRİYOLU TAVUK YUMURTASI

Viroloji alanında yapılan çalışmalarda farklı kanatlı hayvanlara ait embriyolu yumurtalar kullanılmakla birlikte en çok tavuk yumurtası kullanılmaktadır. Bu nedenle bu kısımda embriyolu tavuk yumurtasının yapısı üzerinden bilgi verilecektir. Embriyonun gelişim aşamaları aynı olmasına karşın kuluçka süreleri (Tablo 1) değişmektedir (Morishita ve ark., 2021).

Tablo 1 Bazı kanatlı türlerinin kuluçka süreleri ile ısı ve nem ihtiyaçları

Kanatlı Cinsi	Kuluçka Süresi * (Gün)	Gelişim sıcaklığı (°C)	Çıkım Sıcaklığı (°C)	Gelişim Nemi (%RH)	Çıkım Nemi (%RH)
Tavuk	21	37,3	37,5	50-55	65-70
Hindi	28	37,5	37,2	50-55	65-70
Bıldırcın	17	37,7	37,5	50-55	65-70
Keklik	24	37,5	37,0	50-55	65-70
Sülün	24	37,7	37,5	55-60	70-75
Ördek	28	37,5	37,2	55-60	75-80
Kaz	30-32	37,7	37,5	55-60	75-80
Tavus Kuşu	28	37,5	37,2	55-60	75-80
Deve Kuşu	42	36,2	35,7	22-25	30-50

**Bir türün ırkları arasında kuluçka sürelerinde farklılıklar gözlenebilir. (Boga ve ark., 2024)*

Tavuk embriyosunun gelişiminin bir günü tavuğun oviduktunda, 21 günü ise dışarıda kuluçkada gerçekleşir. İlk olarak ovulasyonla infindubuluma alınan ovum spermatoozon tarafından döllenir ve ovipozisyona (yumurtlama) kadar geçen sürede zigot

şekillenerek embriyo gelişimi başlar. Embriyonik gelişim süreci, ovipozisyonla birlikte geçici olarak durur. Embriyo gelişimi için gerekli kuluçka koşulları oluştuğunda embriyonik gelişim kaldığı yerden devam eder (Morishita ve ark., 2021).

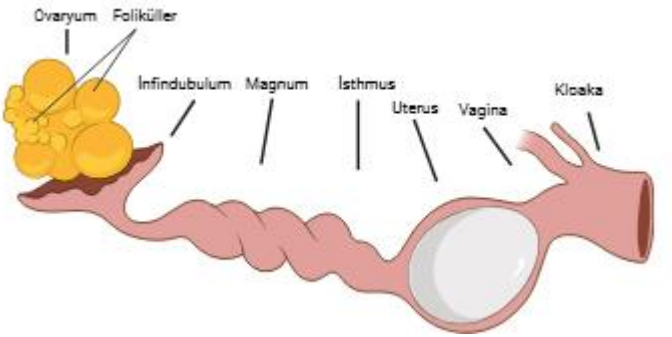
Tavuklarda Dişi Üreme Sistemi ve Yumurta Kanalı

Tavuklarda dişi üreme sistemi; ovaryum, ovidukt, uterus, vagina ve kloakadan oluşmaktadır (Şekil 1). Bazı kaynaklarda uterus ve vagina, memelilerdeki uterus ve vaginadan farklı anatomik ve fonksiyonel özelliklere sahip olmaları nedeniyle oviduktun devamı olarak değerlendirilmektedir. Tavuklarda ovidukt; infundibulum, magnum, isthmus, uterus ve vagina olmak üzere beş temel bölüme ayrılmaktadır (Dombre ve ark., 2017; Scanes & Christensen, 2020). Embriyonik gelişimin erken dönemlerinde sağ ve sol olmak üzere iki ovaryum ve iki ovidukt gelişmekle birlikte, sağ taraftaki yapılar atrofiye uğramakta ve erişkin dönemde yalnızca sol ovaryum ve ovidukt fonksiyonel olarak kalmaktadır (Kandil & Sur, 2017; Scanes & Christensen, 2020).

Tavuklarda yumurtanın oluşumu, ovaryumda olgunlaşan follikülün ovulasyonu ile başlamakta ve oviduktun farklı bölümlerinden geçişi sırasında tamamlanmaktadır. Ovulasyonla atılan ovum, infundibulum tarafından yakalanarak ovidukta alınmakta ve canlı spermatozoonların bulunması durumunda fertilizasyon bu bölgede gerçekleşmektedir. Daha sonra yumurta magnuma ulaşmakta ve burada başta ovalbümin olmak üzere yumurta akını oluşturan proteinler salgılanarak vitellusun çevresi albüminle sarılmaktadır. İsthmusta albümini çevreleyen iç ve dış kabuk zarları oluşmakta, uterus bölümünde ise albümin ve zarların oluşumun tamamlanmasıyla büyük ölçüde kalsiyum karbonattan oluşan yumurta kabuğu şekillenmektedir. Yumurtanın son olarak vagina ve kloakadan geçerek dışarı atılmasıyla ovipozisyon gerçekleşmekte ve yumurta oluşum süreci tamamlanmaktadır.

Yumurtanın ovidukt boyunca ilerlemesi sırasında geçirdiği bu aşamalar, yumurtanın yapısal bütünlüğünün oluşmasının yanı sıra embriyonik gelişim için gerekli besin, koruyucu membranlar ve gaz alışverişini sağlayan yapıların meydana gelmesini sağlamaktadır (Bellairs & Osmond, 2014; Scanes & Christensen, 2020)

Şekil 1. Tavukta reprodüktif sistem organları



(BioRender.com kullanılarak oluşturuldu)

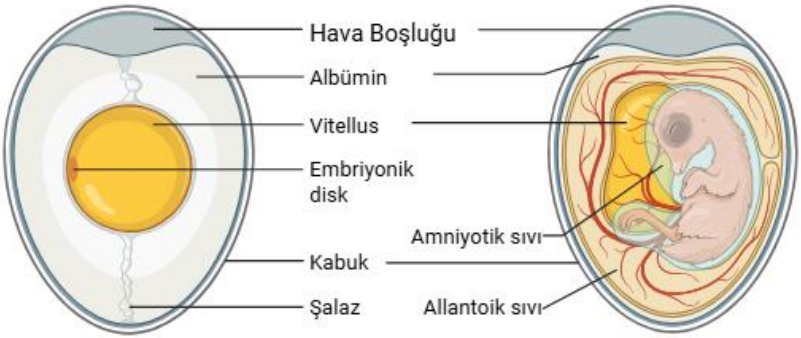
Embriyolu Tavuk Yumurtasının Yapısı

Tavuk yumurtası temel olarak vitellus (yumurta sarısı), albümin (yumurta akı), kabuk zarları ve kabuktan oluşmaktadır. Döllenmiş yumurtada embriyonik gelişimle birlikte vitellus kesesi, amniyon, allantois ve koryoallantoik membran (CAM) gibi ekstraembriyonik yapılar gelişmektedir (Şekil 2) (Bellairs & Osmond, 2014; Dombre ve ark., 2016; Morishita ve ark., 2021).

Vitellus: Embriyonun gelişimi için gerekli enerji ve besin maddelerinin temel kaynağıdır. Üzerinde yer alan germinal disk (blastodisk), döllenmiş yumurtada embriyonik gelişimin başladığı bölgeyi oluşturur. Germinal diski vitellusun merkezine bağlayan latebra ise embriyonik gelişim sırasında besin maddelerinin kullanımında rol oynar (Bellairs & Osmond, 2014; Scanes & Christensen, 2020).

Albümin: Yüksek oranda su ve protein içeren albümin, embriyoya besin sağlarken aynı zamanda mekanik ve kimyasal koruma sağlar. Vitellusu çevreleyen ve iki kutba doğru uzanan şalazlar, vitellusun yumurta içerisindeki konumunun korunmasına katkıda bulunur. Embriyonik gelişim ilerledikçe albüminin önemli bir kısmı embriyo tarafından kullanılır (Bellairs & Osmond, 2014; Scanes & Christensen, 2020).

Şekil 2. Yumurta ile embriyolu yumurta anatomisinin kesitsel karşılaştırması



(BioRender.com kullanılarak oluşturuldu)

Kabuk ve kabuk zarları: Kutikula, kabuk ve iç-dış kabuk zarları, yumurta içeriğini dış etkilere karşı korurken kabuktaki porlar embriyonik gelişim sırasında gaz ve su alışverişine olanak sağlar. Yumurtanın ovipozisyondan sonra soğuması sırasında geniş uçta iç ve dış kabuk zarlarının birbirinden ayrılmasıyla hava kesesi oluşur. Embriyonik gelişimin son dönemlerinde embriyonun başı hava kesesine yönelmekte ve çıkım öncesinde bu bölge ilk akciğer solunumunun gerçekleştiği alan haline gelmektedir (Dombre ve ark., 2017; Morishita ve ark., 2021).

Tavuk embriyosunun gelişimi yumurta içerisinde gerçekleştiğinden, oksijen dışındaki temel besin gereksinimleri yumurta içerisinde bulunan kaynaklardan karşılanmaktadır. Embriyonun beslenmesi, korunması, solunumu ve metabolik

atıkların uzaklaştırılması gibi yaşamsal süreçlerin sürdürülebilmesi için embriyonik gelişim sırasında amniyon, vitellus kesesi, allantois ve koryon olmak üzere çeşitli ekstraembriyonik zarlar gelişmektedir (Şekil 3) (Lee ve ark., 2025; Morishita ve ark., 2021).

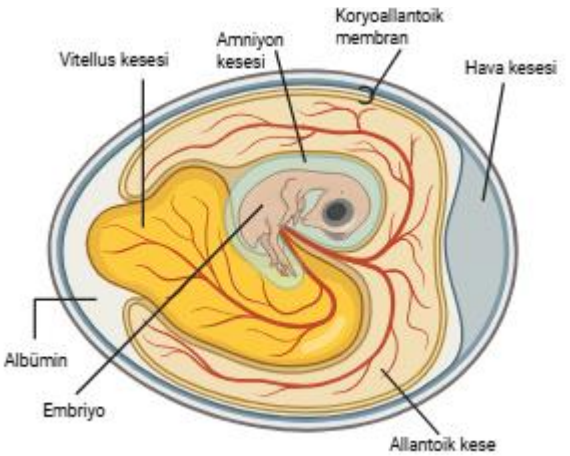
Amniyon: Ektoderm ve somatik mezodermden gelişen amniyon, embriyoyu doğrudan çevreleyen ve amniyotik sıvı içeren bir kesedir. Embriyonun etrafında koruyucu bir ortam oluşturarak mekanik etkilerden korunmasını ve gelişimi boyunca hareket edebilmesini sağlar. Amniyotik boşluk, embriyolu tavuk yumurtalarında bazı virusların inokülasyonu için kullanılan önemli anatomik bölgelerden biridir (Bellairs & Osmond, 2014; Ivancic ve ark., 2004; Morishita ve ark., 2021).

Vitellus kesesi: Endoderm ve splanknik mezodermden gelişen vitellus kesesi, embriyonun erken dönemlerde temel besin kaynağını oluşturan vitellusu çevreler. Vitellusta bulunan besin maddelerinin embriyonun kullanabileceği forma dönüştürülmesi ve gelişen damar ağı aracılığıyla embriyoya aktarılması temel görevlerindendir. Embriyonik gelişimin son dönemlerinde küçülen vitellus kesesi, yumurtadan çıkıma yakın dönemde embriyonun karın boşluğuna çekilerek çıkım sonrasında kullanılacak önemli bir besin rezervi haline gelir (Morishita ve ark., 2021; Scanes ve Christensen, 2020).

Allantois: Endoderm ve viseral mezodermden gelişen allantois, embriyonik gelişimin erken dönemlerinde ortaya çıkar ve hızla büyüyerek embriyonun çevresindeki alanı doldurur. Başlıca görevleri arasında metabolik atıkların biriktirilmesi ve embriyonun gaz alışverişine katkı sağlanması bulunmaktadır. İnkübasyonun yaklaşık 5–6. günlerinde koryonla birleşerek koryoallantoik membranı oluşturur. Allantoik boşlukta biriken sıvı, bazı virusların izolasyonu, çoğaltılması ve virus ürünlerinin elde edilmesinde kullanılan önemli bir materyaldir. Bu nedenle allantoik boşluk, embriyolu tavuk yumurtalarında virolojik amaçlarla yaygın olarak

kullanılan inokülasyon bölgelerinden biridir (Bellairs & Osmond, 2014; Dombre ve ark., 2017; Morishita ve ark., 2021).

Şekil 3. Embriyolu tavuk yumurtasının embriyonik kısımları



(BioRender.com kullanılarak oluşturuldu)

Koryon ve koryoallantoik membran: Koryon, ektoderm ve somatik mezodermden gelişen ve yumurtanın iç kabuk zarına komşu olarak bulunan en dış ekstraembriyonik zarlardan biridir. Allantoisin koryonla birleşmesi sonucunda oluşan koryoallantoik membran, yoğun damar ağı ve kabuk zarlarına geniş bir yüzey boyunca temas etmesi sayesinde embriyonun solunumunda önemli rol oynar. Ayrıca gelişen embriyo için kabuktan kalsiyumun mobilize edilmesine katkıda bulunur. Zengin vasküler yapısı nedeniyle CAM, bazı virusların çoğalması ve özellikle CAM üzerinde oluşturduğu lezyonların değerlendirilmesi amacıyla da kullanılmaktadır (Dombre ve ark., 2017; Morishita ve ark., 2021; Ribatti, 2014).

Yumurtada Embriyonun Gelişim Aşamaları

Tavuk embriyosunun gelişimi iki aşamada şekillenmektedir. İlk aşama tavuk vücudunda ortalama 24-26 saatlik sürede, ikinci aşama ise tavuk vücudu dışında kuluçka olarak adlandırılan 37,5

°C'de ortalama 21 günde oluşur (Bellairs & Osmond, 2014; (Fasenko, 2007).

Gelişimin ilk aşaması, ovulasyonla infundibuluma bırakılan oositin burada döllenmesiyle başlamakta ve ovipozisyon gerçekleşinceye kadar tavuk vücudu içerisinde devam etmektedir. Bu süreçte hücre bölünmeleri sürerken, oositin vitellus bakımından zengin yapısı nedeniyle bölünmeler animal kutuptaki germinal disk bölgesinde gerçekleşmektedir (Lee ve ark., 2025; Nájera & Weijer, 2020).

Ardışık hücre bölünmesi sonucunda blastomerler oluşmakta ve bu hücrelerin çoğalmasıyla disk şeklindeki hücresel yapı olan blastoderm şekillenmektedir. Blastodermin altında zamanla subgerminal boşluk oluşurken, blastoderm hücreleri üstte epiblast, altta ise hipoblast olmak üzere iki tabakalı bir organizasyon kazanmaktadır. Ovipozisyon gerçekleştiğinde embriyo henüz üç germ tabakasını tamamlamamış durumdadır. Ovipozisyon sonrasında uygun inkübasyon koşullarının sağlanmasıyla gelişim yeniden hızlanır ve gastrulasyon sürecinde epiblast hücrelerinin farklılaşması ve göçü sonucunda endoderm, mezoderm ve ektoderm olmak üzere üç temel germ tabakası oluşmaktadır. Bu tabakalardan daha sonra embriyonun tüm doku ve organları şekillenmektedir (Lee ve ark., 2025; Nájera ve Weijer, 2020).

Ovipozisyon sonrasında embriyonik gelişim, uygun inkübasyon koşulları sağlanıncaya kadar büyük ölçüde duraklamakta veya yavaşlamaktadır. Embriyolu yumurtaların saklama süresi ve sıcaklığı, embriyonun canlılığını ve gelişimin yeniden başlamasını doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle kuluçkalık yumurtaların 16–18 °C civarında, %70-80 bağıl nemde ve mümkün olduğunca kısa süre, tercihen 7 günü aşmayacak şekilde, saklanması önerilmektedir. Saklama süresinin uzaması embriyonik gelişimi ve kuluçka başarısını olumsuz etkileyebilmektedir (Adriansen ve ark., 2022; Boga ve ark., 2024; Fasenko, 2007).

Embriyonik gelişimin ikinci aşaması olan 21 günlük kuluçka evresinin, inkübasyonun, başlamasıyla blastodermde gastrulasyon gerçekleşmekte ve embriyonun temelini oluşturan ektoderm, mezoderm ve endoderm olmak üzere üç germ tabakası şekillenmektedir. Bu tabakalardan sırasıyla sinir sistemi, deri, tüy gaga ve göz gibi yapılar; kas, kemik, kan ve ürogenital sistem; sindirim, solunum ve endokrin sistemleri gibi farklı doku ve organlar gelişmektedir. Aynı dönemde embriyonun çevresinde amniyon, vitellus kesesi ve allantois gibi ekstraembriyonik yapılar gelişmeye başlamaktadır (Bellairs & Osmond, 2014; Nájera & Weijer, 2020; Scanes & Christensen, 2020).

İnkübasyonun 1–3. günlerinde embriyonun vücut ekseni belirginleşmekte, nöral yapıların yanı sıra kalp ve vasküler sistem gelişmeye başlamaktadır. İkinci günün sonlarına doğru kalp atımı belirginleşirken, vitellin damar sistemi gelişerek vitellustaki besin maddelerinin embriyoya taşınmasını sağlamaktadır. Üçüncü günde baş, göz, gaga, kanat ve bacak tomurcukları belirginleşmeye başlamakta; amniyon embriyoyu çevrelemekte ve allantois gelişmektedir. Böylece embriyonun beslenmesi ve ekstraembriyonik dolaşımının yanı sıra ilerleyen dönemde gaz alışverişi ve metabolik atıkların uzaklaştırılması için gerekli yapıların temeli oluşmaktadır (Bellairs & Osmond, 2014; Morishita ve ark., 2021; Nájera & Weijer, 2020).

İnkübasyonun 4–7. günlerinde embriyonun büyümesi hızlanmakta, baş ve gövde belirginleşerek embriyo karakteristik "C" şeklini almaktadır. Göz, gaga ve ekstremitelerin gelişimi ilerlerken iç organların farklılaşması devam etmektedir. Allantois hızla büyüyerek koryonla birleşmeye başlamakta ve koryoallantoik membranın oluşumu gerçekleşmektedir. Aynı dönemde vitellus kesesinin damar ağı gelişerek embriyonun beslenmesine katkı sağlamakta, CAM'ın vaskülarizasyonu belirginleşmektedir (Bellairs & Osmond, 2014; Scanes & Christensen, 2020).

İnkübasyonun 8–14. günlerinde embriyonun dış görünümü giderek civcive benzemekte; gözler, gaga, kanat ve bacaklar daha belirgin hale gelmekte, tüy bölgeleri ve ayak parmakları gelişmektedir. Bu dönemde organ sistemlerinin gelişimi devam ederken CAM genişlemekte ve yoğun bir damar ağı oluşturmaktadır. (Bellairs & Osmond, 2014; Ribatti, 2014; Scanes & Christensen, 2020).

İnkübasyonun 15–18. günlerinde embriyonun büyümesi hızlanmakta, albüminin kullanımı azalırken vitellus embriyonun temel besin kaynağı haline gelmektedir. Vitellus kesesi küçülerek karın boşluğuna çekilmeye hazırlanırken embriyo hava kesesine yönelmektedir. Yaklaşık 18. günde embriyonun gagası hava kesesine ulaşarak akciğer solunumuna geçiş süreci başlamaktadır (Bellairs & Osmond, 2014; Morishita ve ark., 2021; Scanes & Christensen, 2020).

İnkübasyonun 19–21. günlerinde vitellus kesesi büyük ölçüde karın boşluğuna çekilmekte, embriyo çıkım pozisyonunu almakta ve hava kesesinden solunum yapmaya başlamaktadır. Yaklaşık 21. günde ise embriyo, gagasında bulunan yumurta dişi (egg tooth) ve boyun kaslarının yardımıyla kabuğu kırarak yumurtadan çıkmaktadır (Bellairs & Osmond, 2014; Morishita ve ark., 2021; Scanes & Christensen, 2020).

Embriyonik gelişim boyunca meydana gelen bu değişiklikler, embriyolu tavuk yumurtalarının virolojik amaçlarla kullanımında önem taşımaktadır. Özellikle allantoik ve amniyotik boşlukların gelişimi ile CAM'ın oluşumu ve vaskülarizasyonu, farklı virusların inokülasyonu için uygun anatomik ortamların oluşmasını sağlamaktadır.

EMBRİYOLU TAVUK YUMURTASINA İNOKÜLASYON METOTLARI

Embriyolu tavuk yumurtası, embriyo ve ekstraembriyonik membranların farklı hücre ve dokular içermesi nedeniyle çok sayıda virusun izolasyonu ve çoğaltılması için uygun bir biyolojik sistem oluşturmaktadır. Virusun yumurtada inokülasyon bölgesinin seçimi; virusun doku tropizmi, hedeflenen replikasyon bölgesi, embriyonun gelişim dönemi ve çalışmanın amacı gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Bu kapsamda başlıca inokülasyon yolları koryoallantoik membran, allantoik boşluk, amniyotik boşluk ve vitellus kesesi olmakla birlikte, bazı deneysel çalışmalarda embriyo, hava kesesi, intravenöz ve intraserebral yollar da kullanılabilmektedir (Tablo 2) (Akın, 1973; Guy, 2015, Senne 2008).

Tablo 2. İnokülasyon yöntemleri örnekleri

İnokülasyon metodu	Embriyo yaşı (gün)	Kullanılan viruslar
Koryoallantoik membran	10-12	Canine distemper virus, Varicella zoster virus, Vesicular stomatitis virus, Infectious laryngotracheitis virus, Pseudorabies virus, Herpes simplex virus, Fowl pox virus, Vaccinia virus, Pigeon pox vius
Allantoik boşluk	9-12	Newcastle disease virus, Infectious influenza virus, Mumps virus, Equine encephalitis virus, Parainfluenza virus
Amniyotik boşluk	7-15	Influenza virus, Mumps virus
Vitellus kesesi	5-8	Mumps virus
İntravenöz	10-15	Bluetongue virus
İntraserebral	8-14	Herpes simplex virus, Rabies virus

(NDVSU, 2023)

Embriyolu tavuk yumurtasında virus üretilmesindeki başarı oranı; virus özellikleri, inokülasyon yeri, inokülasyon metodu, embriyonun yaşı, yumurtanın kalitesi, kuluçka sıcaklığı, inkübasyon

süresi, inoküle edilen virus miktarı ve yumurtaların elde edildiği sürünün bağışıklık durumu (antikor varlığı) gibi bazı faktörlere bağlıdır. Embriyolu tavuk yumurtalarında virus üretim koşullarını optimize etmek için bu parametrelerin her biri dikkate alınmalıdır. Özellikle virusun hedef hücreleri ile seçilen inokülasyon bölgesinin uyumlu olması, başarılı replikasyon açısından önemlidir. Bu nedenle inokülasyon yöntemi belirlenirken yalnızca anatomik erişilebilirlik değil, virusun doku tropizmi ve embriyonun gelişimsel durumu da gözönünde bulundurulmalıdır. Virus ekiminde genellikle 7-12 günlük embriyolu tavuk yumurtaları kullanılmaktadır (Ashraf ve ark., 2024; Manders ve ark., 2021; Senne, 2008).

Virus inokülasyonu öncesi kullanılacak yumurtaların sağlam ve embriyonun canlı olduğunun tespit edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla öncelikle yumurtaların görsel açıdan değerlendirilmesi yapılır. Çatlamış, kabuğu ince olan yumurtalar kullanılmamalıdır. Beyaz kabuklu yumurtaların kullanılması görünürlüğün daha kolay olması açısından tercih edilmelidir. Daha sonra embriyonun canlılığını, pozisyonunu, kan damarlarının ve zarların konumunun belirlenmesi için, yumurtaların karanlık bir ortamda bir ışık kaynağı altında incelenmesi gerekmektedir (OIE/FAO ,2020; Scanes & Christensen, 2020).

Yumurtaların ışık kaynağı altında incelenmesi, embriyonun gelişim durumu, canlılığı ve yumurtanın kullanılabilirliği hakkında bilgi sağlayan temel değerlendirme yöntemlerinden biridir (Grimes, 2002; NDVSU, 2023). İnceleme sırasında embriyo, ışık altında karanlık bir alan olarak görülür ve sağlıklı embriyolar ışık uyarısına hareket ederek yanıt verir. Hareketin çok yavaş olması (30–40 saniyeye kadar gecikmesi) embriyonun canlılığının azaldığını ve yumurtanın kullanım için uygun olmayabileceğini düşündürür. Ayrıca sağlıklı embriyolarda kan damarları belirgin ve bütünlüğünü korurken, embriyo ölümünü takiben damarlar önce belirginliğini yitirir, ardından yumurta çevresinde koyu renkli bir halka oluşturur.

Işık kaynağı altında dölsüz yumurtalar homojen ve daha şeffaf görünümleriyle kolaylıkla ayırt edilebilir. Bunun yanında, çıplak gözle fark edilmeyen kabuk çatlakları da ışık kaynağı altında belirlenebilir (Grimes, 2002; NDVSU, 2023).

Sağlam yumurtalarda uygulanacak ekim metoduna göre, ışık altında embriyo, zarlar, damarlar, inokülasyon yeri bir kalem yardımı ile işaretlenerek yumurta inokülasyona hazır hale getirilir. İnokülasyon yapılacağında ise inokülasyon bölgesindeki yumurta kabuğu %70'lik alkol veya tentürdiyot ile silinerek dezenfekte edilmeli, dezenfeksiyon işleminden sonra da bölgenin kuruması için biraz beklenmelidir. İnokülasyon yapılan yumurtaların inokülasyon yapılmayan yumurtalardan farklı bir inkübatöre kaldırılması gerekmektedir (Manders ve ark., 2021; Yazıcı ve ark., 2021).

Embriyolu yumurtalarda virus replikasyonunun değerlendirilmesinde embriyonun canlılığı ve gelişim durumu, embriyonik lezyonlar ve ekstraembriyonik membranlarda meydana gelen değişiklikler dikkate alınırken farklı yöntemler de kullanılmaktadır. Embriyonik ölüm, gelişme geriliği, gelişim anomalileri, kanama odakları, CAM'da plak oluşumu gibi lezyonlar, iç organlarda büyüme, nekrotik alanlar ve renk değişimi gibi bulgular virus üremesinin belirtileri olarak kabul edilmektedir. Bu bulguların diğer mikrobiyal etkenlerden kaynaklanabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle virus varlığının doğrulanmasında yalnızca embriyonun makroskobik görünümüne dayanılmaması, uygun antijenik, serolojik veya moleküler yöntemlerden yararlanılması gerekmektedir. Virusun özelliklerine ve çalışmanın amacına bağlı olarak hemaglutinasyon (HA) testi, nötralizasyon testi, ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ve PCR (Polymerase chain reaction) gibi tekniklerin kullanımı daha kesin ve doğru sonuçlar vermektedir (Ashraf ve ark., 2024; Azeem & Yoon, 2025; Senne, 2008; Woolcock, 2008).

Koryoallantoik Membrana Ekim (CAM)

Koryoallontoik membrana ekim, özellikle Herpesvirus ve Poxvirus gibi epiteliotrop karakterde olan virusların izolasyonunda kullanılan bir yöntemdir. CAM'ın geniş yüzey alanına sahip olması ve yoğun vasküler yapısı, çeşitli virusların burada çoğalmasına ve oluşturdukları karakteristik lezyonların makroskobik olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Ekim için 9-12 günlük embriyolu tavuk yumurtaları kullanılmakta olup hava kesesi tarafından ve yan taraftan olmak üzere iki şekilde uygulanabilmektedir (Ertürk, 1992, Yazıcı ve ark., 2021).

Hava kesesi tarafından ekim

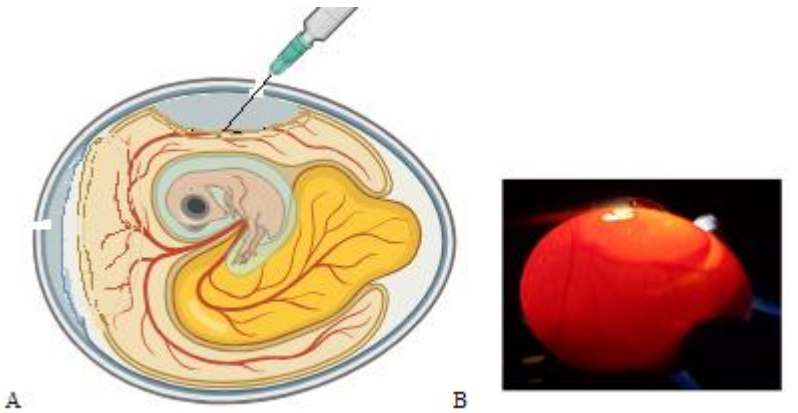
Öncelikle ışık kaynağı altında yumurtada embriyonun bulunduğu yer ve hava kesesi işaretlenir. Daha sonra hava kesesinin bulunduğu yer tentürdiyot ile dezenfekte edilir. Özel deliciler kullanılarak hava kesesinin üzerindeki kabuk delinir. Delik steril bir makas yardımı ile genişletilir. İnoküle edilecek virus süspansiyonundan 0,1 ml tüberkülin enjektörüne çekilerek CAM'ın yüzeyinin çeşitli yerlerine damlatılır. Daha sonra enjektörün ucu ile membranın üzeri çizilir. Açılan pencere balmumu, parafin, jelatin veya steril bir bant gibi uygun bir kapatıcı yardımı ile kapatılır. Ekim yapılan yumurtalar viyollere dik konumda yerleştirilerek inkübatöre kaldırılır. İnkübasyon süresi virusa bağlı olarak değişir (Akın,1973; Yazıcı ve ark., 2021).

Yan taraftan ekim

Işık kaynağı altında yumurtada embriyonun bulunduğu yer ve hava kesesi işaretlenir. Yan tarafta işaretleme embriyonun yan tarafına gelecek şekilde kan damarlarının bulunmadığı yerlere yapılır. Daha sonra hava kesesinin bulunduğu yer ile ekim yapılacak yan taraf tentürdiyot ile dezenfekte edilir. Özel deliciler kullanılarak hava kesesi ve ekimin yapılacağı noktadan kabuk delinir. Burada yan taraftan delerken CAM'a zarar vermemeye dikkat edilir. Bir lastik

puar yardımı ile hava kesesi tarafındaki delikten hava çekilerek oluşan negatif basınç sayesinde CAM kabuktan ayrılır. Aşağıya doğru çekilerek burada bir hava kesesi elde edilir (Şekil 4). Ekimin yapılacağı yere bir damla serum fizyolojik damlatılması CAM'ın kabuktan daha kolay ayrılmasını sağlar. Steril bir makas yardımı ile ekim yapılacak taraftaki delik genişletilir. Ekilecek virus süspansiyonundan 0.1 ml tüberkülin enjektörüne çekilerek CAM'ın yüzeyine damlatılır. Daha sonra enjektörün ucu ile membranın üzeri çizilir. Açılan delikler uygun bir kapatıcı yardımı ile kapatılarak inkübatöre kaldırılır. Günlük canlılık kontrolü yapılır. İlk 24 saat içerisinde meydana gelen embriyo ölümlerinin uygulama hatasından meydana geldiği varsayılarak değerlendirmeye alınmaz (Akın, 1973; Manders ve ark., 2021; Yazıcı ve ark., 2021).

Şekil 4. A Koryoallantoik membrana yan taraftan ekim metodu; B Işık kaynağı altında hava boşluğunun görünümü.



((A)-BioRender.com kullanılarak oluşturuldu)

Poxviruslar, CAM üzerinde virus üremesine bağlı olarak hücrelerin nekrozu ve proliferasyonundan kaynaklanan opak, kabarcık şeklinde (pok) görünen patolojik lezyonlara neden olur. Herpesvirusların bazılarında da benzer yapılar CAM'da gözlenir (Manders ve ark., 2021).

Allantoik Boşluğa Ekim

Allantoik boşluğa inokülasyon (Şekil 5), embriyolu tavuk yumurtasında özellikle influenza virusları ile bazı avian adenovirus, coronavirus ve paramyxovirusların izolasyonu ve çoğaltılması amacıyla yaygın olarak kullanılan inokülasyon yöntemlerden biridir. Allantoik boşluğun gelişmiş vasküler yapılarla ilişkili olması ve yeterli miktarda allantoik sıvı içermesi, virusların çoğalması ve elde edilen virusun sıvı ortamdan toplanabilmesine olanak sağlamaktadır. Allantoik boşluğa ekim, hava kesesi tarafından ve yan taraftan olmak üzere iki şekilde uygulanabilmektedir (Tang ve ark., 2014; Yazıcı ve ark., 2021).

Hava kesesi tarafından ekim

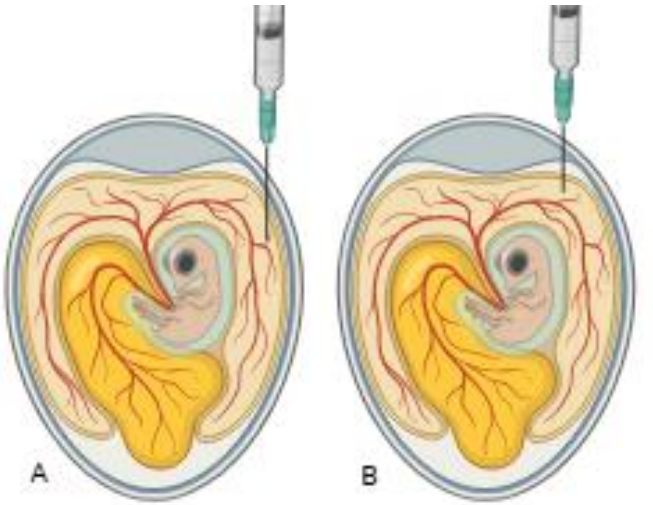
Yumurta üzerinde embriyonun bulunduğu yer ve hava kesesi ışık kaynağı altında işaretlenir. Hava kesesinin bulunduğu yer tentürdiyot ile dezenfekte edilir. Özel deliciler kullanılarak hava kesesinin üzerindeki kabuk delinir. Açılan bu delikten bir enjektör ile 45 derece açıyla girilir. Koryoallantoik membran iğne ile geçildikten sonra allontoik boşluğa girilerek 0,2 ml inokülüm inoküle edilir. Açılan delik uygun bir kapatıcı yardımı ile kapatılır. Yumurtalar dik konumda viyollere konarak inkübatöre kaldırılır (Brauer & Chen, 2015; Grimes, 2002; Yazıcı ve ark., 2021).

Yan tarafından ekim

Bu ekim yönteminde embriyonun bulunduğu yer ve hava kesesiyle birlikte hava kesesinin 3 mm kadar aşağısında damarların olmadığı bir yer işaretlenir. İşaretlerin bulunduğu yerler tentürdiyot ile dezenfekte edilir. Özel bir delici ile hava kesesinin üzerinden ve hava kesesi çizgisinin altında işaretlenen yer delinerek, alt delikten kısa uçlu bir iğne yavaş bir şekilde 0,5 cm kadar ilerletilerek allantoik boşluğa 0,2 ml inokülüm inoküle edilir. Açılan delikler uygun bir kapatıcı yardımı ile kapatılır. Yumurtalar dik konumda viyollere konularak inkübatöre kaldırılır. Hava kesesinin üzerinde

açılan delik, inokülümün yumurtanın yan tarafındaki delikten geri kaçmasını önlemek için gerekli bir havalandırma boşluğudur (OIE/FAO, 2020, Yazıcı ve ark., 2021).

Şekil 5. Allantoik boşluğa ekim, A) Yan taraftan ekim, B) Hava kesesinden ekim



(BioRender.com kullanılarak oluşturuldu)

Allantoik boşluğa inokülasyon, virusa bağlı olmak üzere 2-7 günlük inkübasyondan sonra değerlendirilir (OIE/FAO, 2020; Tang ve ark., 2014).

Amniyotik Boşluğa Ekim

Amniyotik boşluğa ekim, özellikle influenza ve paramyxoviruslar başta olmak üzere, embriyonun belirli dokularını hedefleyen bazı virusların izolasyonu ve çoğaltılması amacıyla kullanılan yöntemlerden biridir. Amniyon kesesi, embriyoyu çevreleyen ve amniyotik sıvı içeren ekstraembriyonik bir yapı olup, inokülümün embriyo ile doğrudan temas etmesine olanak sağlaması bakımından diğer inokülasyon yollarından ayrılmaktadır. Bu nedenle amniyotik inokülasyonun tercih edilmesinde virusun doku

tropizmi ve hedef hücreleri önemli rol oynamaktadır (Ashraf ve ark., 2024; Guy, 2015; Ito ve ark., 1997; Samuel ve ark., 2010; Scanes & Christensen, 2020).

Paramyxoviruslar için 7-8 günlük, influenza virusları için ise 12-14 günlük embriyolu tavuk yumurtaları kullanılmaktadır. Amniyonik boşluğa ekim için hava kesesi tarafından ve yan taraftan olmak üzere iki yöntem kullanılmaktadır (Ertürk, 1992; Ivancic ve ark., 2004; Samuel ve ark., 2010; Tang ve ark., 2014; Yazıcı ve ark., 2021).

Hava kesesi tarafından ekim

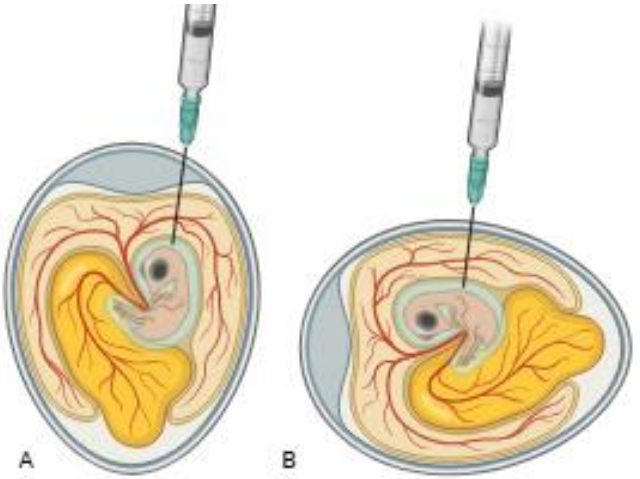
Yumurta üzerinde embriyonun bulunduğu yer ve hava kesesi ışık kaynağı altında işaretlenir. Hava kesesinin bulunduğu yer tentürdiyot ile dezenfekte edilir. Hava kesesi üzerindeki kabuk uygun bir delici yardımı ile delinir. Embriyoya doğru delikten iğne ilerletilerek CAM ve allantoik boşluk geçilir (Şekil 6). Amniyotik boşluğa ulaşılınca embriyoya iğne dokunulduğunda hareket hissedilir. İğne hafif geri çekilerek 0,2 ml inokülüm inoküle edilir. Bu yöntemde hava kesesi kapağı daire şeklinde açılır ve amniyon kesesi görülerek de işlem yapılabilir. Bu yöntemde CAM üzerine Phosphate buffered saline (PBS) damlatılarak görüntünün biraz daha netleşmesi sağlanabilir. Ekim sonrası delikler uygun bir kapatıcı yardımı ile kapatılır ve yumurtalar viyollere dik olarak yerleştirilerek inkübatöre kaldırılır (NDVSU, 2023; Yazıcı ve ark., 2021).

Yan tarafından ekim

Karanlık odada ışık kaynağı altındaki yumurtada embriyonun bulunduğu yer ve hava kesesi işaretlenmelidir. Yan taraftan embriyo kısmından ekim yapılacak yer kan damarlarının olmadığı bir alandan işaretlenir. Daha sonra işaretlenen yer tentürdiyot ile dezenfekte edilir. İşaretlenen kısım uygun bir delici yardımı ile CAM'a zarar vermeden delinir. Kısa uçlu bir iğne ile delikten dik olarak girilir ve embriyoya doğru yavaşça ilerletilir.

Embriyonun hareketi hissedilince iğne biraz geri çekilir ve 0,2 ml inokülüm amniyotik boşluğa inoküle edilir. Delikler uygun bir kapatıcı yardımı ile kapatılır. Ekim yapılan yumurtalar viyollere dik olarak yerleştirilerek inkübatöre kaldırılır (Yazıcı ve ark., 2021).

Şekil 6. Amniyotik boşluğa ekim, A)Hava kesesinden ekim, B)Yan taraftan ekim



(BioRender.com kullanılarak oluşturuldu)

Amniyotik boşluğa yapılan ekim sonrası virusa bağlı olmak üzere 2-7 gün arası inkübasyonda beklendikten sonra değerlendirme yapılır. Paramyxoviruslar için 5-7 gün, influenza viruslar için 2-4 günlük bir inkübasyon süresi yeterlidir (Woolcock, 2008; Yazıcı ve ark., 2021).

Amniyotik boşluğun temel avantajı, inokülümün embriyoya ve özellikle embriyonik epitel dokularına doğrudan ulaşabilmesidir. Bu özellik, virusun belirli dokularda replike olmasının amaçlandığı çalışmalarda önem kazanmaktadır. Nitekim embriyolu yumurtada, inokülasyon yolu ile virusun hedeflediği hücre ve dokular arasındaki ilişkinin, izolasyon başarısında belirleyici olduğu bildirilmektedir (Guy, 2015; Ito ve ark., 1997; Samuel ve ark., 2010).

Vitellus Kesesine Ekim

Vitellus kesesi, embriyonik gelişimin erken dönemlerinde geniş bir ekstraembriyonik yapı olması ve embriyonun beslenmesinde önemli rol üstlenmesi nedeniyle bazı virusların izolasyonu ve çoğaltılmasında, özellikle inkübasyonun 5-8 günlerinde, kullanılmaktadır. Reovirus, Chicken anemia virus, Avian metapneumovirus gibi birçok kanatlı viruslarının yanı sıra Bluetongue virus (BTV), Equine herpesvirus, Rabies virus, Mumps virus (kabakulak) gibi bazı memeli viruslarının da deneysel olarak vitellus kesesinde ekim ile izole edilebildiği bildirilmiştir. Vitellus kesesine ekim (Şekil 7) için hava kesesi tarafından ve yan taraftan olmak üzere iki yol kullanılmaktadır (Al- Baroodi, 2020; Ambagala ve ark., 2020; Ardıçlı ve ark., 2022; Yazıcı ve ark., 2021).

Hava kesesi tarafından ekim

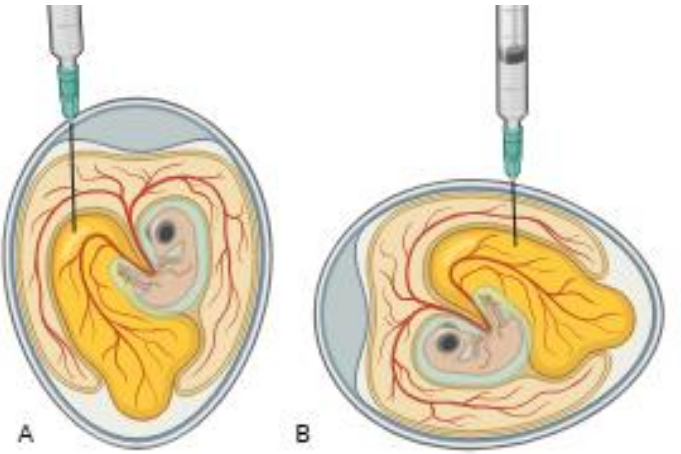
Yumurta üzerinde embriyonun bulunduğu yer ve hava kesesi ışık kaynağı altında işaretlenir. Hava kesesinin bulunduğu yer tentürdiyot ile dezenfekte edilir. Hava kesesi üzerindeki kabuk bir delici yardımı ile delinir. Uzun iğneli bir enjektör yardımı ile açılan delikten vitellüs kesesi hedef alınarak ilerlenir. Keseye ulaşıldığında enjektörü sağa sola oynatmadan inokülasyon yapılır. İğne dik olarak geri çekilir. Böylece vitellusun dağılması önlenmiş olur. Kabuk üzerindeki delik uygun bir kapatıcı yardımı ile kapatılır. Ekim yapılan yumurtalar viyollere dik olarak yerleştirilerek inkübatöre kaldırılır (Yazıcı ve ark., 2021).

Yan tarafından ekim

Yumurta üzerinde embriyonun bulunduğu yer ve karşısı ışık kaynağı altında işaretlenir. Daha sonra embriyonun karşısında ekim yapmak için işaretlenen bölge alkol veya tentürdiyot ile dezenfekte edilir. Kabuk ekim için işaretlenen yerden bir delici ile delinir. Kısa uçlu bir iğne ile delikten dik olarak içeri girilir ve vitellüs kesesine ulaşıldığında 0,2 ml inokülüm inoküle edilir. Enjektör dik olarak

oynatmadan geri çekilir. Ekim yapılan yumurtalar viyollere dik olarak yerleştirilerek inkübatöre kaldırılır (Yazıcı ve ark., 2021).

Şekil 7. Vitellus kesesine ekim, A) Hava kesesinden ekim, B) Yan taraftan ekim



(BioRender.com kullanılarak oluşturuldu)

Ekimden sonra virusa bağlı olarak 2-3 günlük inkübasyondan sonra değerlendirme yapılır. Günde bir veya iki defa canlılık kontrolü yapılır ve ilk 24 saat içinde meydana gelen embriyo ölümleri uygulama hatasından kaynaklandığı varsayılarak değerlendirmeye alınmaz. Değerlendirme için ekim yapılan yumurtalar inkübasyon sonuna kadar ölmezlerse buzdolabında 1 gece bekletilerek ölmesi sağlanır. Daha sonra yumurta kabuğu hava kesesi üzerinden açılır. Kabuk zarı ile CAM, steril bir makasla kesilerek uzaklaştırılır. Vitellus bir enjektör ile çekilir (Senne, 2008; Yazıcı ve ark., 2021).

İntravenöz Ekim

İntravenöz ekim yöntemi, sistemik enfeksiyon oluşturmak, virusların embriyo içerisindeki sistemik yayılımını incelemek, bazı virusların patogenezini ve doku tropizmini incelemek amacıyla daha

çok deneysel çalışmalarda kullanılan bir yöntemdir (Clavijo ve ark., 2000; Gaffar Elamin & Spradbrow, 1978; Hosseini ve ark., 1998).

İntravenöz inokülasyon genellikle 11 günlük yaştaki embriyolu tavuk yumurtalarında koryoallantoik membran üzerindeki damarlara yapılır. Işık kaynağı altında hava kesesine yakın bir bölgede, belirgin ve düz bir damar seçilerek kurşun kalemle damarın doğrultusu çizilir. İnokülümün kanla birlikte akabilmesi için kan akışının yönü de kabuk üzerinde belirtilmelidir. Kan, ana kan damarına doğru birleşecek şekilde akar. Damarın olduğu yerde bir köşesi damarı gösteren bir üçgen çizilir. Kabuk zarına zarar vermeden çizilen üçgen çizgi boyunca kabuk delinir ve sonrasında steril bir bistüri veya pens yardımı ile üçgen kabuk kaldırılır. Damarın görülmesini kolaylaştırmak için kabuk zarı üzerine bir damla steril vazelin likit veya steril mineral yağ damlatılarak görüş kolaylaştırılır. Kanın akış yönünde ince bir iğne ile damara girilip, 0,05- 0,1 ml inokülüm inoküle edilir. Kabukta açılan pencere uygun bir kapatıcı ile kapatılarak, yumurta inkübasyona kaldırılır (Akın, 1973; Clavijo ve ark., 2000).

Yumurtalara günde iki kez canlılık kontrolü yapılır ve 24 saat içinde ölen yumurtalar uygulama hatasından varsayılarak değerlendirilmeye alınmaz. İnkübasyon sonunda yumurta kabuğu dezenfekte edilir. Hava kesesinin üzerindeki kabuk makasla çıkarılır ve embriyonun tamamı yumurtadan alınarak steril bir petri kabına alınır (Clavijo ve ark., 2000; Hosseini ve ark., 1998).

Bu metot 10-15 günlük embriyolu tavuk yumurtalarında uygulanır. Bu inokülasyon şekli daha çok hematolojik çalışmalarda tercih edilmekle birlikte Bluetongue virus'un izolasyonu içinde kullanılmaktadır. Bluetongue virus şüpheli örneklerden hazırlanan inokülümler ilk olarak embriyolu tavuk yumurtasında pasajlanır ve ardından hücre kültüründe pasajlamaya devam edilir. Hücre kültüründe sitopatojen etki görülmesi, immunoperoksidaz testi ve PCR testi ile virus varlığı belirlenir (Clavijo ve ark., 2000).

Gaffar Elamin & Spradbrow (1978), viremi dönemindeki bovine ephemeral fever virus (BEFV) ile enfekte sığırlardan elde ettikleri kan örneklerinden hazırlanan inokülümleri, 9–11 günlük embriyolu tavuk yumurtalarına intravenöz yolla inoküle etmişlerdir. İnokülasyondan 1–4 gün sonra embriyolardan alınan beyin, kalp, karaciğer ve akciğer dokularında virus varlığı floresan antikor tekniği ve nötralizasyon testi kullanılarak gösterilmiştir. Virusun özellikle karaciğer, akciğer ve kalp dokularında saptanmasını, bu dokulardaki damar endotel hücrelerinde gerçekleşen virus replikasyonu ile ilişkilendirmişlerdir.

İntraserebral Ekim

Bu metot beyinde patolojik değişikliklere neden olan viruslarla ilgili çalışmalarda (Herpes simpleks virus veya lyssaviruslar gibi) tercih edilir. Bu yöntem 12 günlük embriyolu tavuk yumurtalarına uygulanır (Ertürk, 1992).

Yumurta üzerinde embriyonun bulunduğu yer ve hava kesesi ışık kaynağı altında işaretlenir. Hava kesesinin bulunduğu yer tentürdiyot ile dezenfekte edilir. Hava kesesi üzerindeki kabuk bir delici yardımı ile delinir ve bir makas yardımı ile çizgi boyunca kesilerek kabuk kapak şeklinde açılır. Bir pens ile embriyoya temas edilerek, başın yeri belirlenir. Aynı pens ile gagadan tutularak iğne ile kafatasına girilir (Akın, 1973).

Koryoallantoik memran, allantoik boşluk, amniyonik boşluk ve vitellüs kesesine ekim dışında kalan hava kesesi, intravenöz ve intraserebral metotlar sadece deneysel çalışmalar için kullanılır (Ertürk, 1992)

Ekimden sonra yumurtaların pozisyonu ve çevrilme durumu inokülasyon yöntemine göre belirlenmeli ve inkübatöre konulmalıdır. Embriyoların canlılığı ve gelişim durumu düzenli olarak, günlük veya günde iki kez, kontrol edilmelidir. Yumurtalar embriyo ölünceye kadar veya optimal bir virus çoğalması

oluşuncaya kadar inkübasyona bırakılmalıdır. Bazı virusların düşük ısıda ürediği (Bluetongue virus gibi) göz önüne alınmalı ve inkübasyon ısısı buna göre ayarlanmalıdır (Ertürk, 1992; Manders ve ark., 2021).

İnokülasyon sonrası embriyonik ölüm virus türüne göre değişebilmektedir. Bazı viruslar embriyonun ölümüne 24 saat içinde, bazıları daha geç neden olurlar. İnkübasyon sırasında embriyo ölümü; yapılan muayene sırasında embriyonun hareketsiz ve bir kütle şeklinde durmasından, damarların dolgun olmamasından anlaşılır. İlk 24 saat içerisinde ölen embriyoların hatadan kaynaklı mı yoksa virusa bağlı mı olduğunu anlamak için, öncelikle virusun embriyoya etkisini iyi bilmek gerekmektedir. Bunun için önceki çalışmalardan yararlanılabilir. Bununla birlikte inokülasyon sonrası ilk canlılık muayenesi 24 saatten daha kısa sürede yapılmalıdır (OIE/FAO, 2020; NDVSU, 2023; Senne, 2008). Bazı viruslar da ilk inokülasyonda embriyonun ölümüne yol açmaz. Bu nedenle yalnızca embriyonik ölümün varlığı veya zamanlaması virus replikasyonunun değerlendirilmesi için yeterli değildir. Özellikle ilk 24 saat içerisinde meydana gelen ölümlerde inokülasyona bağlı travma, kontaminasyon ve diğer non-spesifik nedenler de göz önünde bulundurulmalıdır. Virus izolasyonunda gerekli görüldüğünde seri pasajlar uygulanabilmekte ve her pasaj sonrasında virus varlığı uygun virolojik veya moleküler yöntemlerle doğrulanabilmektedir (OIE/FAO, 2020; NDVSU, 2023; Senne, 2008).

Virus üremesi sonucunda embriyolarda farklı makroskobik ve mikroskobik değişiklikler ortaya çıkabilmektedir. Bunlar arasında embriyonik ölüm, gelişme geriliği ve cüceleşme, embriyonun büzüşmesi, damarların belirginleşmesi veya konjesyonu, subkutan kanamalar, amniyotik ve allantoik sıvı miktarında değişiklikler, CAM'da kalınlaşma ve ödem ile pock lezyonlarının oluşumu sayılabilir. Bazı viruslarda ayrıca karakteristik mikroskobik

lezyonlar ve inklüzyon cisimcikleri görülebilmektedir. Bazı patolojik değişiklikler virusun varlığını ortaya konmasında patognomiktir. Bununla birlikte benzer makroskobik değişikliklerin farklı etkenler veya deneysel koşullar sonucunda da ortaya çıkabileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle embriyonun ölüm zamanı, gelişim özellikleri, membran lezyonları ve diğer patolojik değişiklikler birlikte değerlendirilerek virus varlığı uygun laboratuvar yöntemleriyle doğrulanması gerekmektedir (Akın, 1973; NDVSU, 2023).

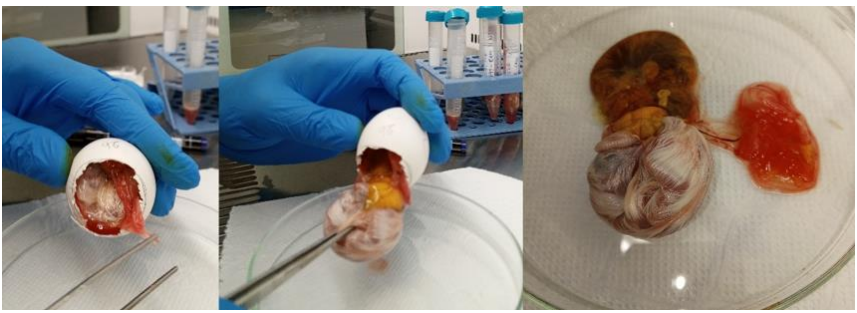
EMBRİYOLU TAVUK YUMURTASINDAN VİRUSUN TOPLANMASI

Embriyolu tavuk yumurtalarına virus ekiminin yansıra örneklerin toplanması da önem arz eder. Öncelikle yapılan her işlem için kayıt ve etiketleme (inokülasyon tarihi, pasaj tarihi, virus türü, soğutma tarihi gibi) düzgün bir şekilde yapılmalıdır. İnkübasyon sırasında öldüğü tespit edilen ve inkübasyon sonunda embriyosu ölmeyen yumurtalar +4 °C'de en az dört saat veya 1 gece boyunca embriyonun ölmesi ve kanın pıhtılaşması için bekletilmelidir. Materyal daha fazla geçiş veya aşı üretimi için saklanacaksa, bakteriyel kontaminasyonu önlemek için yumurtayı açmadan önce kabuğun alkol veya tentürdiyot ile dezenfekte edilmesi ve kurumasının beklenilmesi önemlidir (Brauer & Chen, 2015; OIE/FAO, 2020; Senne, 2008).

Örnekler temiz bir odada veya güvenlik kabini içerisinde toplanabilir. Odada toplanacağında kontaminasyonu engellemek için bir bek alevi yanında çalışılmalıdır. Elbette ki çalışma alanının ve kullanılan malzemelerin seçimi elde edilecek örneklerin ne amaçla kullanılacağı ile ilişkilidir. Virolojik çalışmalarda steril malzemeler (makas, şişe, enjektör, toplama kabı vb.), solüsyonlar (PBS, Fizyolojik tuzlu su (FTS) gibi) ve mikrobiyal kontaminasyonun olmayacağı şekilde alanların seçimi önemlidir (NDVSU, 2023).

Ekim yöntemine göre yumurtadan virusun ürediği kısım bir delik açılarak enjektör yardımı ile toplanabileceği gibi (embriyonik sıvılar ve vitellus) yumurtada kabuğun geniş bir şekilde açılarak tüm embriyo ve kısımları (zar, embriyonik dokular) steril bir petri kutusuna veya kaba alınarak gerekli sıvı ve doku örnekleri toplanabilir (Şekil 8). (NDVSU, 2023; Senne, 2008).

Şekil 8. Embriyonik yapıların petri kutusuna aktarılması



Toplanan materyal steril toplama kaplarına ve şişelerine alındıktan sonra üzerlerine bilgileri içeren etiketleme yapılmalı ve hemen kullanılmayacak ise örnekler -80 °C'de derin dondurucuda saklanmalıdır (Brauer & Chen, 2015; NDVSU, 2023).

Allantoik Sıvının Toplanması

Hava kesesi üzerindeki kabuk, uygun bir dezenfektan kullanılarak dezenfekte edilir ve zara yakın kısımdan kesilerek çıkarılır. Steril bir enjektör yardımı ile CAM'a geçilir ve allantoik sıvı aspire edilerek toplanır. Ayrıca uygulama sırasında kabukta açılan bir delikten enjektör yardımıyla da sıvı aspire edilebilir. Toplanan sıvı, diğer partikülerin uzaklaştırılması amacıyla 4°C'de 1000xg hızda 10 dakika santrifüj edildikten sonra porsiyonlanarak, virusun özelliklerine ve yapılacak analizlere göre uygun koşullarda saklanmalıdır. Uzun süreli saklamak için örnekler -80°C'de derin dondurucuda saklanmalıdır. Yumurta başına toplanan miktar, embriyonun gelişim dönemine ve inkübasyon koşullarına bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte ortalama olarak bir

yumurtadan 5-10 ml sıvı toplanabilmektedir (Brauer & Chen, 2015; Senne, 2008; Tang ve ark., 2014).

Embriyolu tavuk yumurtasından toplanan allantoik sıvıdaki virus varlığının belirlenmesinde kullanılacak yöntem virusun antijenik özelliklerine göre değişmektedir. Hemaglutinasyon özelliğine sahip influenza virusları ve bazı avian paramyxoviruslar için HA testi uygulanır (Woolcock, 2008). Eğer HA testi pozitif ise agar jel immunodifüzyon testi, nötralizasyon testi, PCR veya ELISA gibi diğer antijenik ve moleküler yöntemler kullanılarak virus varlığı doğrulanır (Brauer & Chen, 2015; Tang ve ark., 2014; Woolcock, 2008).

Amniyon Sıvısının Toplanması

Hava kesesi üzerindeki kabuk, uygun bir dezenfektan kullanılarak dezenfekte edilir ve zara yakın kısımdan kesilerek çıkarılır. Kabuk zarını şeffaf hale getirmek için birkaç damla FTS veya PBS damlatılır. Bununla birlikte kabuk zarı ve CAM hava kesesi tabanından yavaşça kaldırılarak amniyonun daha iyi görünmesi sağlanabilir (Şekil 9). Steril bir enjektör yardımı ile amniyon boşluğuna girilir ve amniyon sıvısı aspire edilerek toplanır. Örnekler -80 °C'de derin dondurucuda saklanmalıdır (Ivancic ve ark., 2004; Woolcock, 2008; Yazıcı ve ark., 2021).

Amniyotik boşluğa inokülasyon sonrasında virus replikasyonu, embriyonun canlılığındaki değişiklikler ve gelişimsel bulguların yanı sıra elde edilen örneklerde gerçekleştirilen serolojik veya moleküler testlerle değerlendirilebilmektedir. Özellikle influenza viruslarında HA, RT-PCR, ELISA, agar jel immunodifüzyon testi ve nötralizasyon testleri gibi serolojik veya moleküler analizler virus varlığının doğrulanmasında kullanılmaktadır. Embriyonik ölüm veya gelişim anomalilerinin tek başına virus replikasyonunun kesin göstergesi olmadığı ve sonuçların uygun laboratuvar yöntemleriyle doğrulanması gerektiği

dikkate alınmalıdır (Ashraf ve ark., 2024; Guy, 2015; Ivancic ve ark., 2004).

Şekil 9. Hava kesesi tarafından kabuğun kesilmesi



Vitellusun Toplanması

Hava kesesi üzerindeki kabuk, uygun bir dezenfektan kullanılarak dezenfekte edilir. Hava kesesi üzerinden açılan bir delikten enjektör yardımı ile vitellus aspire edilebileceği gibi hava kesesi üzerindeki kabuk, zar hizasında kesilir ve CAM kaldırılarak da yapılabilir. Toplanan örnekler yapılacak analizlere göre uygun koşullarda saklanmalıdır. Uzun süreli saklanacak örnekler -80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edilmelidir (Senne, 2008; Yazıcı ve ark., 2021).

Vitellus kesesine inoküle edilen virusların varlığı, moleküler, serolojik ve embriyolojik bulguların birlikte değerlendirilmesiyle ortaya konulabilmektedir. Ambagala ve ark. (2020), Zika virus inoküle edilen dört günlük SPF embriyolu tavuk yumurtalarından elde edilen vitellus örneklerinde virus varlığını RT-PCR ile göstermiştir. Benzer şekilde, Al-Baroodi (2020) avian reovirus izolasyonu amacıyla vitellus kesesine inokülasyon gerçekleştirmiş; ardışık pasajlarda virus varlığını nötralizasyon testi ile doğrularken, embriyolarda gelişme geriliği, deri altı kanamalar ve ölümler gibi replikasyonu destekleyen bulgular kaydetmiştir. Bu çalışmalar, vitellus kesesinin virusların deneysel çoğaltılması ve tespitinde

kullanılabileceğini ve makroskobik bulguların moleküler veya serolojik yöntemlerle desteklenmesinin önemini göstermektedir.

Koryoallantoik Membranın Toplanması

Hava kesesi üzerindeki kabuk, uygun bir dezenfektan kullanılarak dezenfekte edilir ve zara yakın kısımdan kesilerek çıkarılır. Forseps kullanılarak kabuk zarı koryoallantoik membran üst kısmından kurtarılır. Yumurta ters çevrilerek embriyo, vitellus kesesi, embriyonik sıvılar ve zarları bir petri kabına aktarılır. Ayrıca daha önce inokülasyon için açılan pencere genişletilerek de aynı işlem yapılabilir. Koryoallantoik membran, kabuktaki kabuk zarına yapışırsa, başka bir forseps ile sıyrılır. Forseps yardımı ile CAM diğer dokulardan kurtarılarak içerinde PBS bulunan başka bir kaba alınır (Şekil 10). Petri kutularına alınan enfekte CAM birkaç ml PBS solüsyonu ile yıkanır ve başka bir kaba aktarılır. Bu işlemler sırasında CAM'ın bütünlüğünün ve gözlenen lezyonların korunmasına dikkat edilmesi gerekmektedir. (NDVSU, 2023; Yazıcı ve ark., 2021).

Şekil 10. Koryoallantoik membranın toplanması



Virus replikasyonu sonucunda CAM'da kalınlaşma, ödem, opaklaşma ve özellikle poxvirus enfeksiyonlarında CAM üzerinde karakteristik pok adı verilen çiçek lezyonları meydana gelebilmektedir. Bu pok lezyonları çoğunlukla seri pasajlar ile elde

edilebilmektedir. Bu nedenle CAM'ın makroskobik olarak incelenmesi, virusun embriyolu yumurtadaki çoğalmasının ön değerlendirilmesinde önemli bir yer tutmaktadır (Kibenge ve ark., 2019, Manders ve ark., 2021; Yazıcı ve ark., 2021). Bunula birlikte CAM örneklerinde virus varlığının ortaya konulabilmesi için makroskobik bulguların PCR gibi moleküler yöntemler ve gerektiğinde histopatolojik incelemelerle birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir (Ardıçlı ve ark., 2022; Haligur ve ark., 2009).

Embriyo Doku Örneklerinin Toplanması

Hava kesesi üzerindeki kabuk, uygun bir dezenfektan kullanılarak dezenfekte edilir. Hava kesesinin üzerindeki kabuk, zara yakın kısımdan kesilerek çıkarılır. Zar yırtılır ve yumurta ters çevrilerek embriyo, embriyonik sıvılar ve zarları bir petri kabına aktarılır (Şekil 8). Bir forseps yardımı ile embriyo zarlardan kurtarılarak başka bir kaba alınır. Uygun nekropsi teknikleri kullanılarak gerekli dokular toplanır (Senne, 2008).

Avian coronaviruslar (Infectious bronchitis virus ve Turkey coronavirus vd.) embriyolu yumurtada inokülasyon yoluna bakılmaksızın embriyonik sıvılarda ve dokularda çoğalabilmektedir. Çoğunlukla embriyolu tavuk yumustasında allantoik sıvıya inokülasyonu yapılan avian coronavirusların embriyonik dokulardaki varlığı immunohistokimyasal ve RT-PCR analiziyle tespit edilmektedir (Guy, 2015). Bu nedenle yalnızca inokülasyon bölgesinden elde edilen sıvı veya membranların değil, gerektiğinde embriyonik dokuların da incelenmesi virusun embriyodaki dağılımının değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır.

Ayrıca bazı virusların embriyo üzerinde oluşturduğu makraskopik lezyonlarda virus varlığının göstergesi kabul edilebilmektedir. Örneğin IBV ile enfekte embriyolarda gelişme geriliği ve karakteristik kıvrılma/deformasyonlar bildirilirken, Avian reovirus enfeksiyonlarında gelişme geriliği ve deri altı kanama

odakları gözlenebilmektedir (Al-Baroodi, 2020; Legnardi ve ark., 2020; Sun ve Liu 2016).

SONUÇ

Sonuç olarak, embriyolu tavuk yumurtası; farklı doku, hücre ve membranları bir arada barındırması sayesinde çok sayıda virusun izolasyonu, çoğaltılması ve deneysel olarak incelenmesinde kullanılabilen önemli bir in vivo sistemdir. Başarılı bir virus izolasyonu ve üretimi için virusun biyolojik özellikleri ve doku tropizmi dikkate alınarak uygun inokülasyon yolunun seçilmesi; embriyonun yaşı, inkübasyon süresi ve örneklerin uygun zamanda toplanması önem taşımaktadır. Ayrıca embriyonun ölümü, gelişme geriliği ve embriyonik dokularda gözlenen patolojik bulgular virus replikasyonu hakkında bilgi sağlamakla birlikte, virus varlığının moleküler, serolojik veya virolojik yöntemlerle doğrulanması sonuçların güvenilirliği açısından gereklidir. Günümüzde in vitro sistemlerin yaygınlaşmasına rağmen, embriyolu tavuk yumurtası özellikle belirli virusların izolasyonu, üretimi ve aşı çalışmalarında kullanılmaya devam eden pratik ve çok yönlü bir in vivo modeldir.

Kaynakça

Adriansen, H., Parasote, V., Castilla, I., Bernardet, N., Halgrain, M., Lecompte, F., & Réhault-Godbert, S. (2022). How egg storage duration prior to incubation impairs egg quality and chicken embryonic development: contribution of imaging technologies. *Frontiers in Physiology, 13*, s. 902154. https://doi.org/10.3389/fphys.2022.902154

Akın, A. (1973). Viroloji'de embriyolu tavuk yumurtasına inokülasyon metodları. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 3*(1), s. 78-94.

Al-Baroodi, S. Y. (2020). Isolation and detection of reovirus from arthritis in chickens. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences, 34*(1), s. 59-63. https://doi.org/10.33899/ijvs.2019.125580.1093

Ambagala, A., T. T., Cottam-Birt, C., Berhane, Y., Gerdts, V., Karniychuk, U., Safronetz, D., & Babiuk, S. (2020). Susceptibility of chicken embryos, sheep, cattle, pigs, and chickens to Zika virus infection. *Frontiers in Veterinary Science, 7*, s. 23. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00023

Ardıçlı, Ö., Demirbilek, S. K., Çöven, F., & Çarlı, K. T. (2022). A surveillance for avian coronavirus infectious bronchitis virus, infectious laryngotracheitis virus, avian metapneumovirus, and avian reovirus in poultry flocks with respiratory signs in Türkiye. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 46*(5), s. 687-697. https://doi.org/10.55730/1300-0128.4243

Ashraf, M. A., Raza, M. A., Amjad, M. N., Ud Din, G., Yue, L., Shen, B., Chen, L., Dong, W., Xu, H., & Hu, Y. (2024). A comprehensive review of influenza B virus, its biological and clinical aspects. *Frontiers in Microbiology, 15*, s. 1467029. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1467029

Azeem, S., & Yoon, K. J. (2025). Diagnostic assays for avian influenza virus surveillance and monitoring in poultry. *Viruses, 17*(2), s. 228. https://doi.org/10.3390/v17020228

Bellairs, R., & Osmond, M. (2014). *Atlas of chick development* (Third edition). Academic Press. https://doi.org/10.1016/C2010-0-65149-2

Boga, Y. E., Çimen, Ö., & Kepezkaya, A. (2024). Kanatlılarda kuluçka randımanını etkileyen faktörler ve yeni uygulanan metotlar. *MAS Journal of Applied Sciences, 9*(3), s. 578-589. https://doi.org/10.5281/zenodo.13294051

Brauer, R., & Chen, P. (2015). Influenza virus propagation in embryonated chicken eggs. *Journal of Visualized Experiments, 87*(1-2), s. 52421. https://doi.org/10.3791/52421

Clavijo, A., Heckert, R. A., Dulac, G. C., & Afshar, A. (2000). Isolation and identification of bluetongue virus. *Journal of Virological Methods, 87*(1-2), s. 13-23. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00150-6

Condit, R. (2013). Principles of virology. D. Knipe, & P. Howley (Ed) içinde, *Fields Virology* (Sixth edition, s. 21-30). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

Dombre, C., Guyot, N., Moreau, T., Monget, P., Da Silva, M., Gautron, J., & Réhault-Godbert, S. (2017, February). Egg serpins: The chicken and/or the egg dilemma. *In Seminars in Cell and Developmental Biology, 62*, s. 120-132. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.019

Ertürk, A. (1992). Viral hastalıklarda teşhis metodları. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 7*(3), s. 51-64.

Estienne, A., Brossaud, A., Reverchon, M., Ramé, C., Froment, P., & Dupont, J. (2020). Adipokines expression and effects in oocyte

maturation, fertilization and early embryo development: Lessons from mammals and birds. *International Journal of Molecular Sciences, 21*(10), s. 3581. https://doi.org/10.3390/ijms21103581

Fasenko, G. M. (2007). Egg storage and the embryo. *Poultry Science, 86*(5), s. 1020-4. https://doi.org/10.1093/ps/86.5.1020

Fenner, F., Bachmann, P. A., Gibss, E. P., Murphy, F. A., Studdert, M. J., & & White, D. O. (1987). Cultivation and assay of viruses. *Veterinary Virology* (s. 39-53). içinde https://doi.org/10.1016/B978-0-12-253055-5.50007-4

Gaffar Elamin, M. A., & Spradbrow, P. B. (1978). solation and cultivation of bovine ephemeral fever virus in chickens and chicken embryos. *Journal of Hygiene, 81*(1), s. 1-7. https://doi.org/10.1017/S0022172400053705

Grimes, S. E. (2002). A basic laboratory manual for the small-scale production and testing of I-2 Newcastle disease vaccine. Rome: RAP publication.
https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/3b3f1f3b-6a5e-4af8-b46b-611835a64d32/content/ac802e.htm

Guy, J. S. (2015). solation and propagation of coronaviruses in embryonated eggs. H. Maier, E. Bickerton, & P. Britton (Ed) içinde, *Coronaviruses: Methods and Protocols* (Cilt 1282, s. 63-71). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_7

Haligur, M., Ozmen, O., Vural Atalay, S., & Berkin, S. (2009). Pathological, immunohistochemical and electron microscopical examinations on chorioallantoic membrane lesions in experimental fowl poxvirus infection. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 15*(3), s. 345-350. https://doi.org/10.9775/kvfd.2008.117-A

Hosseini, M., Hawkes, R. A., Kirkland, P. D., & Dixon, R. J. (1998). Rapid screening of embryonated chicken eggs for bluetongue virus

infection with an antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. *Journal of Virological Methods, 75*(1), s. 39-46. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(98)00096-2

Ito, T., Suzuki, Y., Takada, A., Kawamoto, A., Otsuki, K., Masuda, H., Yamada, M., Suzuki, T., Kida, H., & Kawaoka, Y. (1997). Differences in sialic acid-galactose linkages in the chicken egg amnion and allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection. *Journal of Virology, 71*(4), s. 3357-62. https://doi.org/10.1128/jvi.71.4.3357-3362.1997

Ivancic, J., Forcic, D., Gulija, T. K., Zgorelec, R., Repalust, L., Baricevic, M., Mesko-Prejac, M., & Mazuran, R. (2004). Genetic characterization of a mumps virus isolate during passaging in the amniotic cavity of embryonated chicken eggs. *Virus Research, 99*(2), s. 121-9. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.11.002

Kandil, B., & Sur, E. (2017). Kanatlılarda gonadların gelişimi ve testisin fonksiyonel histolojisi. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 10*(2), s. 144-153.

Kibenge, F. S., Wang, Y., Kibenge, M. J., Kalupahana, A., & McBurney, S. (2019). Avian reovirus. S. K. Samal (Ed) içinde, *Avian Virology: Current Research and Future Trends* (s. 179-210). Caister Academic Press. https://doi.org/10.21775/9781912530106

Lee, H. C., Fadaili, Y., & Stern, C. D. (2025). Development and functions of the area opaca of the chick embryo. *Developmental Biology, 519*, s. 13-20. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2024.12.002

Legnardi, M. T., Franzo, G., & Cecchinato, M. (2020). Infectious bronchitis virus evolution, diagnosis and control. *Veterinary Sciences, 7*(2), s. 79. https://doi.org/10.3390/vetsci7020079

Manders, T. T., Matthijs, M. G., Veraa, S., Van Eck, J. H., & Landman, W. J. (2021). Success rates of inoculation of the various

compartments of embryonated chicken eggs at different incubation days. *Avian Pathology, 50*(1), s. 61-77. https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1834503

Morishita, T. Y., Rutllant-Labeaga, J., & Karcher, D. (2021). Egg diagnostics. C. B. Greenacre, & T. Y. Morishita (Ed) içinde, *Backyard Poultry Medicine and Surgery: a Guide for Veterinary Practitioners* (2nd edition, s. 462-476). Wiley-Blackwell. https://doi.org/10.1002/9781119511816.ch24

Nájera, G. S., & Weijer, C. J. (2020). Cellular processes driving gastrulation in the avian embryo. *Mechanisms of Development, 163*, s. 103624. https://doi.org/10.1016/j.mod.2020.103624

NDVSU. (2023). *Isolation of virus by embryonated egg inoculation, Laboratory Manual of Virology*. Nisan 5, 2023 tarihinde https://ndvsu.org/index.php/study-material/244-veterinary-microbiology adresinden alındı

OIE/FAO. (2020). *Procedure for the isolation and detection of viruses from avian species using embryonated eggs. OIE/FAO international reference laboratory for AI. Standard Operating Procedure*. Nisan 15, 2023 tarihinde https://science.vla.gov.uk/fluglobalnet/docs/protocol_IsolationEmbryonatedEggs.pdf adresinden alındı

Ribatti, D. (2014). The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. *Experimental Cell Research, 328*(2), s. 314-324. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.06.010

Samuel, A. S., Paldurai, A., Kumar, S., Collins, P. L., & Samal, S. K. (2010). Complete genome sequence of avian paramyxovirus (APMV) serotype 5 completes the analysis of nine APMV serotypes and reveals the longest APMV genome. *PloS One, 5*(2), e9269. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009269

Scanes, C. G., & Christensen, K. D. (2020). *Poultry science* (5th edition). Waveland Press.

Senne, D. A. (2008). Virus propagation in embryonating eggs. L. Dufour-Zavala, D. E. Swayne, J. R. Glisson, J. E. Pearson, W. M. Reed, M. W. Jackwood, & P. R. Woolcock (Ed) içinde, *A Laboratory Manual for The Isolation and Identification of Avian Pathogens* (5th edition, s. 235-240). Madison, Wisconsin: OmniPress.

Sun, J., & Liu, S. (2016). An RT-PCR assay for detection of ınfectious bronchitis coronavirus serotypes. L. Wang (Ed) içinde, *Animal Coronaviruses. Springer Protocols Handbooks* (s. 121-130). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3414-0_11

Tang, S., Li, Y., Xia, H., Huang, J., Zhang, Z., Zhu, N., Zhao, J., & Li, T. (2014). Improved methods for isolation of avian influenza virus. *Journal of Virological Methods, 210*, s. 22-25. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.09.015

Woolcock, P. R. (2008). Avian influenza virus isolation and propagation in chicken eggs. E. Spackmann (Ed) içinde, *Animal Influenza Virus. Methods in Molecular Biology* (2nd ed, Cilt 436, s. 35-46). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-279-3_6

Yazıcı, Z., Gümüşova, S., Albayrak, H., & Tamer, C. (2021). *Genel Viroloji Uygulama Notları.* Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı.

Yeşilbağ, K. (2017). *Genel Viroloji* (2. baskı). Medyay Kitabevi.

BÖLÜM 4
ASSOCIATIONS BETWEEN SARS-CoV-2 INFECTION, COVID-19 VACCINATION, AND AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

Ayşen ALTINER[1]

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis is a progressive and usually fatal neurodegenerative disease in which degeneration of upper and lower motor neurons causes weakness, bulbar dysfunction, and respiratory failure; cognitive and behavioral involvement occurs in a substantial subset of patients. Contemporary disease models emphasize heterogeneous genetic susceptibility and convergent cellular pathways rather than a single initiating lesion. Altered RNA processing, impaired proteostasis, excitotoxicity, mitochondrial dysfunction, axonal transport abnormalities, oxidative stress, neuroinflammation, and non-cellautonomous toxicity from astrocytes and microglia all contribute to motor-neuron vulnerability (Brown & Al-Chalabi, 2017; De Boer et al., 2021; Masrori & Van Damme, 2020; Stacchiotti et al., 2025; Van Es et al., 2017). TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) is central to the pathobiology of most ALS. Cytoplasmic mislocalization and aggregation of TDP-43 are present in the great majority of ALS cases, with important molecular exceptions that include many SOD1- and FUS-associated forms. TDP-43 regulates transcription, splicing, RNA transport, stress-granule dynamics, and cellular homeostasis; nuclear loss of function and cytoplasmic toxic gain of function can both impair neuronal survival (De Boer et al., 2021; Masrori & Van Damme, 2020).

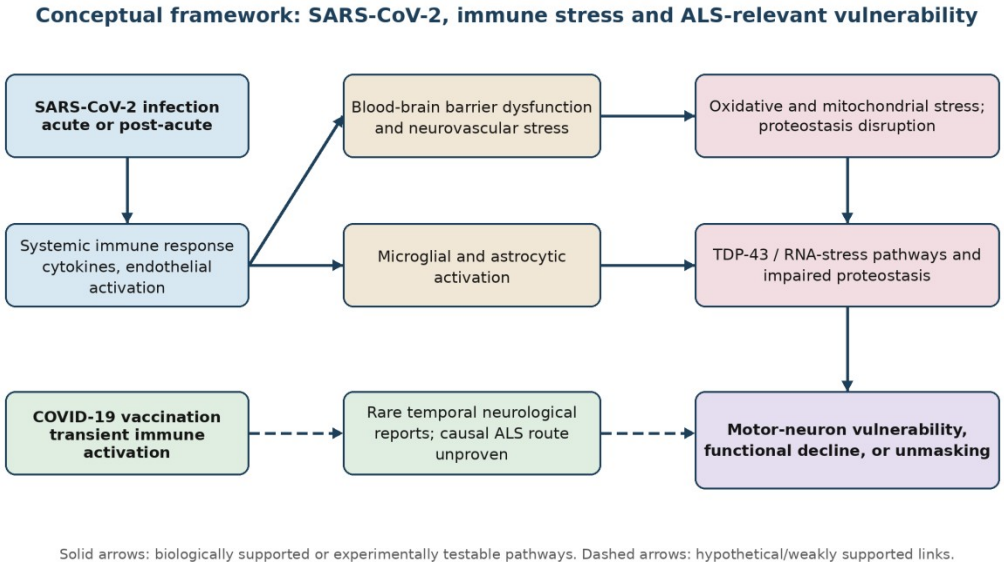
The COVID-19 pandemic created an unusual setting in which large populations experienced repeated exposure to a systemic respiratory virus, variable degrees of immune activation and hypoxemia, critical illness, mass vaccination, and major disruption of

[1]Prof. Dr., Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Istanbul University-Cerrahpaşa, Orcid: 0000-0003-4602-2953

neurological care. ALS poses a specific causal-inference problem because it is rare and because biological onset precedes diagnosis. When hundreds of millions of adults are infected or vaccinated, some ALS diagnoses will inevitably occur soon afterward by chance. The proportion of ALS cases reporting a prior exposure is uninterpretable without an age-, place-, and calendar-timematched exposure rate in the population at risk. Reliable inference therefore requires counterfactual comparisons rather than temporal sequence alone. Viral infection can intersect with these processes through cellular stress, altered host RNA metabolism, oxidative injury, mitochondrial dysfunction, proteostasis disturbance, and stress-granule formation. SARS-CoV-2 proteins and infection-related stress have been discussed in relation to TDP-43 cleavage, phase separation, mislocalization, and aggregation in experimental systems (Guan et al., 2026; Kim et al., 2025). These observations are mechanistically interesting, but they do not demonstrate that SARS-CoV-2 creates ALS pathology in motor neurons of patients who later receive an ALS diagnosis.

Neuroinflammation provides a second intersection. ALS progression is influenced by activated microglia, reactive astrocytes, complement signaling, infiltrating immune cells, and stage-dependent cytokine responses (Stacchiotti et al., 2025). SARS-CoV-2 can produce systemic inflammation, endothelial dysfunction, and blood-brain-barrier perturbation (Amruta et al., 2021). A peripheral infection could therefore amplify an already vulnerable central nervous system without requiring persistent viral invasion of motor neurons. A third pathway is physiological stress. Fever, hypoxemia, catabolism, sleep disruption, reduced oral intake, immobilization, and critical illness can transiently or persistently worsen strength and respiratory performance. In a person with subclinical ALS or limited ventilatory reserve, these factors may uncover deficits that had previously been compensated. Such an unmasking model is compatible with post-infectious deterioration while remaining distinct from *de novo* disease initiation (Figure 1).

Figure 1 Conceptual framework linking SARS-CoV-2 infection, host inflammatory responses, ALS-relevant molecular pathways, and motor-neuron vulnerability. Vaccine-related pathways are intentionally shown separately and with dashed links because an ALS-specific causal mechanism has not been demonstrated in humans.



SARS-CoV-2 Infection and Apparent New-Onset ALS

Abu-Abaa et al. (2023) reported an 84-year-old man who developed progressive bulbar symptoms after COVID-19 and was subsequently diagnosed with bulbar-onset ALS after evaluation for alternative causes. The report is useful because it defines a temporal phenotype, but it cannot determine whether infection initiated disease, accelerated a pre-existing process, or simply preceded clinical recognition. Subtle cramps, fasciculations, fatigability, voice change, weight loss, or focal weakness may be present before the patient or clinician recognizes a motor-neuron syndrome. A viral illness can intensify observation, impair compensatory function, and shorten the interval between biological disease and diagnosis. A credible initiation hypothesis would require more than short latency: one would seek a reproducible excess incidence, a coherent latency distribution, a disease-specific biological mediator, and replication across independent populations.

The published post-COVID cases also do not define a reproducible ALS subtype or pathological signature. No validated biomarker currently distinguishes 'post-COVID ALS' from ordinary sporadic ALS. Accordingly, case reports justify surveillance and mechanistic investigation but should not be used to state that SARS-CoV-2 is a sufficient cause of ALS. Li

& Bedlack (2021) described two patients with previously slow ALS trajectories who experienced marked functional deterioration after SARS-CoV-2 infection; in one patient, the ALS Functional Rating Scale-Revised (ALSFRS-R) fell by 16 points over four months after infection. Pandemic-era cohort comparisons also suggest that ALS outcomes can worsen under conditions created by the pandemic. De Marchi et al. (2021) compared patients diagnosed in 2020 with a pre-pandemic cohort and reported faster monthly ALSFRS-R decline during the pandemic.

Respiratory interactions are better documented. In the Valencia cohort, 263 ALS patients were alive during the pandemic and 62 had documented SARS-CoV-2 infection. Pre-existing non-invasive ventilation was strongly associated with COVID-19 hospitalization, whereas prior vaccination was associated with lower hospitalization odds; five infected patients died within 30 days, four of whom had been ventilated before infection. Overall ALS survival during the pandemic was similar to the pre-pandemic period in that cohort (Garcia-Casanova et al., 2024). Small reports of ALS patients receiving non-invasive ventilation also show that some patients can recover from COVID-19 to their previous respiratory baseline (Lee et al., 2021; Santos et al., 2022). Thus, infection is clinically important but is not an inevitable accelerator of neurodegeneration.

Incidence Before, During, and After the Pandemic

Population-level evidence is heterogeneous and does not show a consistent post-pandemic increase in ALS. A population-based study in the Marche region of Central Italy identified 425 incident ALS cases from 2014 to 2021, with a mean incidence of 3.5 per 100,000 person-years. No time trend was detected during 2014-2019; after 2020-2021 were included, incidence decreased by an average of 5.8%, which the authors considered compatible with delayed neurological assessment and diagnosis during the pandemic (Sopranzi et al., 2024).

A nationwide French study using administrative data identified 30,028 incident motor-neuron-disease (MND) cases from 2010 to 2023. Age- and sex-standardized incidence increased modestly before the pandemic, but from 2019 to 2023 the study reported an annual decrease of approximately 1.8%, with a particularly large deviation in 2022. Because the outcome was administrative MND rather than rigorously phenotyped ALS and because pandemic care disruption can alter case capture, these data should not be interpreted as

evidence that SARS-CoV-2 reduces ALS risk; they demonstrate that calendar-time incidence is strongly affected by ascertainment (Guinebretiere et al., 2025).

In contrast, a 2026 population-based study from Isfahan, Iran, reported 63 definite ALS cases and an incidence of 0.74 per 100,000 person-years during the post-COVID period, together with a reported increase relative to earlier regional estimates. Among cases, 45% reported probable prior COVID-19 and 95.3% reported at least one vaccine dose (Etemadifar et al., 2026) (Table 1). These percentages cannot establish exposure-related risk without matched background infection and vaccination rates. The apparently discordant Italian, French, and Iranian findings reinforce the need for standardized case definitions, stable denominators, and explicit modeling of diagnostic delay. A two-sample Mendelian-randomization analysis published in 2022 also did not support a simple strong model in which genetic liability to COVID-19 increases ALS risk; some analyses suggested an inverse association, while hospitalized or severe COVID-19 phenotypes were largely null for ALS (Zhang & Zhou, 2022).

Table 1 Representative evidence concerning SARS-CoV-2 infection, pandemic-era epidemiology, and ALS.

Study	**Design / population**	**Main observation**	**Interpretive limitation**
Li & Bedlack, 2021	2 established ALS cases	Marked post-COVID functional decline after slow disease	Temporal/within-patient signal; no control group
De Marchi et al., 2021	Pandemic vs pre-pandemic ALS cohorts	Faster ALSFRS-R decline during pandemic	Cannot isolate infection from care disruption
Garcia-Casanova et al., 2024	263 ALS patients; 62 infected	NIV predicted hospitalization; overall survival similar	Clinically informative; not an ALS-incidence study
Sopranzi et al., 2024	425 incident ALS cases, Central Italy	Incidence decreased when 2020-2021 included	Supports ascertainment/diagnostic-delay concerns
Guinebretiere et al., 2025	30,028 incident MND cases, France	Pandemic period deviated downward from prior trend	Administrative MND outcome; not exposure-specific
Etemadifar et al., 2026	63 definite ALS cases, Isfahan	Post-COVID regional incidence pattern reported	No matched exposure denominators; needs replication
Marzok et al., 2026	SOD1G93A mouse model	Acute respiratory viral infection worsened ALS-like disease	Mechanistic/ preclinical; not human incidence or causation

Mechanistic overlap between COVID-19 biology and ALS is broad but non-specific. Innate immune activation, cytokine signaling, endothelial dysfunction, altered blood-brain-barrier integrity, oxidative stress, mitochondrial injury, autophagy and proteostasis disturbance, and glial activation are all described in SARS-CoV-2-related neurological biology and also participate in ALS pathogenesis (Amruta et al., 2021; Guan et al., 2026; Kim et al., 2025; Stacchiotti et al., 2025). Shared pathways make interaction plausible; they do not make ALS a specific or expected consequence of infection. The TDP-43 axis is of particular interest because it links RNA metabolism, stress granules, proteostasis, and motor-neuron degeneration. Experimental and review literature has proposed that SARS-CoV-2-associated cellular stress or viral proteins may influence TDP-43 cleavage, localization, aggregation, or liquid-liquid phase separation (Guan et al., 2026; Kim et al., 2025). These observations have not been shown to create an ALS-defining TDP-43 proteinopathy in longitudinal human tissue or biomarker studies.

Marzok et al. (2026) materially strengthens the disease-modification hypothesis at the preclinical level. In SOD1G93A mice, a sublethal respiratory viral infection before overt ALS signs was associated with worse motor outcomes, lumbar-spinal-cord gliosis, and transcriptional changes involving inflammatory, metabolic, and muscle pathways; anti-inflammatory treatment or direct antiviral therapy improved selected clinical features. The study used influenza A virus and a mouse-adapted SARS-CoV-2 strain. The SARS-CoV-2 arm showed worse motor performance in infected SOD1G93A mice, while detailed results indicated that time to ALS endpoint was not shortened in the same manner as in the influenza arm. The experiment supports a general principle that acute respiratory infection can interact with an ALS substrate, but it does not establish that SARS-CoV-2 is uniquely capable of triggering or accelerating human ALS.

COVID-19 Vaccination and ALS

Evidence linking COVID-19 vaccination to ALS is substantially weaker than evidence supporting infection-related physiological or inflammatory stress as a potential disease modifier. Feghali et al. (2023) reported a 47-year-old man whose focal weakness began shortly after the Janssen adenoviral-vector vaccine and progressed to clinically diagnosed ALS; the patient also had a family history of ALS. In the Lebanese National Pharmacovigilance Database, Karam et al. (2024) described one 69-year-old man with rapid ALS deterioration after a second BNT162b2 dose who died from respiratory failure 93 days

later. The same study emphasized that adverse events following immunization are events occurring after vaccination and do not necessarily have a causal relationship; approximately half of serious reports in the database were classified as coincidental. A database analysis by Sodagari & Sodagari (2025) identified ALS-coded adverse-event reports after vaccination and found no significant difference in the distribution of reports between COVID-19 and pneumococcal vaccines across the neurodegenerative diseases studied.

The multicenter COVIVAX case-control study provides a stronger general neurological safety design. Among 265 newly diagnosed neurological cases and 265 matched controls, vaccination was not associated with an overall increase in incident neurological disease (Pupillo et al., 2025). Only three motor-neuron-disease cases were represented. A 2026 case series of ten patients with persistent fasciculations after COVID-19 vaccination adds useful differentialdiagnostic context. Nine were classified as probable benign fasciculation syndrome, whereas one met criteria for ALS; the authors treated an ALS-specific causal link as speculative rather than established (Breuer et al., 2026) (Table 2).

Table 2 Representative evidence concerning COVID-19 vaccination and ALS or motor-neuron presentations.

Study	**Evidence type**	**Finding**	**Key limitation**
Feghali et al., 2023	Case report	ALS symptoms recognized soon after Janssen vaccination	Single patient; family history; no denominator
Karam et al., 2024	National spontaneous pharmacovigilance	One rapid ALS deterioration report after BNT162b2	AEFI report; cannot estimate excess incidence
Sodagari & Sodagari, 2025	Adverse-event database analysis	No significant COVID-vs-pneumococcal reporting-rate difference across studied diseases	Data-mining design; reporting bias; not ALS incidence
Pupillo et al., 2025	Multicenter case-control	No overall increase in newly diagnosed neurological disease	Only 3 MND cases; ALS-specific power very low
Breuer et al., 2026	10 post-vaccination fasciculation cases	9 probable benign fasciculation syndrome; 1 ALS diagnosis	Case series; no risk denominator; causality speculative
Garcia-Casanova et al., 2024	ALS clinical cohort	Prior vaccination associated with lower COVID-19 hospitalization odds	Observational; addresses infection severity, not ALS causation

Causality Appraisal

A structured causal appraisal highlights the asymmetry between infection-related disease modification and vaccine-related ALS causation. Temporality is present in individual reports for both exposures, but temporality is necessary rather than sufficient. The strength and consistency of association are weak because no replicated large ALS-specific effect has been demonstrated across independent population datasets. Specificity is also low: COVID-19 produces many systemic and neurological consequences, and ALS is biologically heterogeneous. For infection-related acceleration, biological plausibility is moderate. Systemic inflammation, glial activation, endothelial injury, metabolic stress, and TDP-43-related stress pathways overlap with ALS biology, and the 2026 SOD1G93A experiments demonstrate that acute respiratory infection can worsen ALS-like disease in a susceptible model (Marzok et al., 2026) (Table 3). For *de novo* human ALS initiation, the evidence remains much weaker because the expected epidemiological pattern and ALS-specific mediator have not been established. For vaccination-induced ALS, experimental support is minimal: transient immune activation is biologically real, but no reproducible mechanism has been shown in which an approved COVID-19 vaccine produces ALS-defining motor-neuron degeneration in humans.

Alternative explanations remain substantial. These include coincidence, a long presymptomatic phase, ascertainment after an illness or vaccination encounter, delayed diagnosis, post-viral deconditioning, critical-illness neuropathy or myopathy, reduced rehabilitation, changes in multidisciplinary care, and secular variation in coding or referral. The current evidence therefore supports a research hypothesis of infection-related disease modification in susceptible individuals more strongly than it supports either infection or vaccination as a primary cause of ALS. ALS continues to arise at its background rate during any mass exposure campaign. Because the presymptomatic interval may extend for months or longer, an exposure can occur close to the first recognized symptom even when it played no causal role.

Table 3 Causal appraisal of the principal hypotheses.

Domain	**SARS-CoV-2 infection - > ALS onset/progression**	**COVID-19 vaccination - > ALS onset/progression**
Temporality	Present in case reports and post-infection progression reports	Present in isolated case/safety reports
Consistency	Low for *de novo* causation; low-to-moderate signal for acceleration	Low
Strength of association	Not established at population level	Not established
Biological plausibility	Moderate for disease modification: inflammation, glia, BBB, metabolic stress, TDP-43; preclinical support	Low-to-theoretical for ALS-specific causation
Experimental support	Yes for respiratory viral infection modifying ALS-like disease in SOD1G93A mice (Marzok et al., 2026)	No comparable ALS-specific causal model demonstrated
Epidemiology	Pandemic-era incidence results inconsistent and strongly influenced by ascertainment (Etemadifar et al., 2026; Guinebretiere et al., 2025; Sopranzi et al., 2024)	No ALS-specific excess risk demonstrated; available analytical study underpowered (Pupillo et al., 2025)
Most defensible current interpretation	Possible modifier/unmasking event in susceptible individuals; human causal initiation unproven	Temporal safety signals only; causal relationship unproven

Clinical Implications

New progressive focal weakness, bulbar dysfunction, fasciculations accompanied by weakness or atrophy, or uppermotor-neuron signs after COVID-19 or vaccination should be evaluated using the same rigorous diagnostic framework as any suspected ALS presentation. Temporal association should neither be dismissed nor treated as diagnostic proof. Depending on phenotype, differential diagnoses include inflammatory neuropathy, myopathy, cervical myelopathy, brainstem disease, neuromuscular-junction disorders, nutritional deficiencies, critical-illness neuromyopathy, and post-viral syndromes. In established ALS, the clearest immediate issue is respiratory reserve. Patients already using non-invasive ventilation can be particularly vulnerable to respiratory infection (Garcia-Casanova et al., 2024). During acute COVID-19, assessment of ventilation, secretion clearance, cough effectiveness, hydration, swallowing, and nutrition may be clinically important.

The most accurate formulation is that no causal link between COVID-19 vaccination and ALS has been established, and SARS-CoV-2 infection has not been established as a cause of sporadic ALS. Infection can plausibly stress an already vulnerable nervous system, and preclinical work supports disease-modifying interactions, but the size and frequency of such

an effect in humans remain unknown. The next generation of studies should link national ALS registries with laboratory-confirmed infection, vaccination records, hospitalization severity, longitudinal neurological assessments, mortality, and, where possible, genotype. Analyses should distinguish symptom onset from diagnostic date and should adjust for age, sex, comorbidity, health-care utilization, socioeconomic factors, and competing mortality.

Prospective ALS cohorts can test disease modification more directly. Serial neurofilament light chain, inflammatory cytokines, glial markers, respiratory measures, ALSFRS-R slope, weight, and TDP-43-related biomarkers before and after infection would allow investigators to distinguish transient deconditioning from sustained acceleration. Genetic stratification by C9orf72, SOD1, TARDBP, FUS, and polygenic risk could identify susceptible subgroups. Vaccine-safety analyses should move beyond spontaneous reports to self-controlled case-series or linked populationcohort designs with prespecified risk windows and background incidence. Because ALS is rare, multinational data will be needed to detect or exclude small relative risks with useful precision. Negative-control outcomes and negative-control exposure windows can help identify surveillance bias and residual confounding.

Conclusion

Human evidence does not establish SARS-CoV-2 infection or COVID-19 vaccination as a cause of ALS. Infection-related systemic and neuroimmune stress is biologically plausible as a modifier or unmasking event in susceptible individuals, and this concept now has preclinical support. Temporal sequence is not sufficient to infer ALS causation because clinical diagnosis may follow a prolonged presymptomatic phase. The most defensible infection-related hypothesis is disease modification or unmasking, not proven *de novo* initiation. Vaccine-related evidence remains limited to temporal reports and small safety datasets without an ALS-specific population signal. For vaccination, ALS-specific evidence is sparse and underpowered; available data do not establish an excess ALS risk.

Future progress requires linked registries, exposure-verified longitudinal cohorts, biomarker-rich follow-up, and preclinical models that distinguish general antiviral immune stress from SARS-CoV-2-specific biology. Until such evidence is available, causal statements should remain asymmetric and precise: infection is a plausible modifier in susceptible hosts, whereas neither infection nor vaccination has been shown to be a primary cause of human ALS.

References

Abu-Abaa, M., Mousa, A., Chadalawada, S. & Abdulsahib, A. (2023). Bulbar onset amyotrophic lateral sclerosis in a COVID-19 patient: a case report. *Cureus*, 15 (4), e37814. Doi: 10.7759/cureus.37814.

Amruta, N., Chastain, W. H., Paz, M., Solch, R. J., Murray-Brown, I. C., Befeler, J. B., Gressett, T. E., Longo, M. T., Engler-Chiurazzi, E. B. & Bix G. (2021). SARS-CoV-2 mediated neuroinflammation and the impact of COVID-19 in neurological disorders. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 58, 1-15. Doi: 10.1016/j.cytogfr.2021.02.002.

Breuer, A., Raeder, V., Pernice, H. F., Boesl, F., Prüss, H., Audebert, H., Hahn, K. & Franke, C. (2026). Fasciculations following COVID-19 vaccination-a case series of ten patients. *Vaccines (Basel)*, 14 (6), 541. Doi: 10.3390/vaccines14060541.

Brown, R. H. Jr. & Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 377 (2), 162-172. Doi: 10.1056/NEJMra1603471.

De Boer, E. M. J., Orie, V. K., Williams, T., Baker, M. R., de Oliveira, H. M., Polvikoski, T., Silsby, M., Menon, P., van den Bos, M., Halliday, G. M., van den Berg, L. H., van den Bosch, L., van Damme, P., Kiernan, M. C., van Es, M. A. & Vucic, S. (2021). TDP-43 proteinopathies: a new wave of neurodegenerative diseases. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 92 (1), 86-95. Doi: 10.1136/jnnp-2020-322983.

De Marchi, F., Gallo, C., Sarnelli, M. F., de Marchi, I., Saraceno, M., Cantello, R & Mazzini, L. (2021). Accelerated early progression of amyotrophic lateral sclerosis over the COVID-19 pandemic. *Brain Sciences*, 11 (10), 1291. Doi: 10.3390/brainsci11101291.

Etemadifar, M., Salari, M., Kashefi, M., Shams, Y., Sichani, M. H. & Hojjatipour, F. (2026). Incidence and clinical characteristics of amyotrophic lateral sclerosis during the post-COVID-19 period: a population-based study from Isfahan, Iran. *Neurodegenerative Disease Management*, Aug 14, 1-8. Doi: 10.1080/17582024.2026.2718409.

Feghali, E. J., Challa, A., Mahdi, M., Acosta, E. & Jackson, J. (2023). New-onset amyotrophic lateral sclerosis in a patient who received the J&J/Janssen COVID-19 vaccine. *Kansas Journal of Medicine*, 16 (1), 69-70. Doi: 10.17161/kjm.vol16.18969.

García-Casanova, P. H., Pérez-Martínez, P., Sevilla, T., Doménech, R., León, M. & Vázquez-Costa, J. F. (2024). Impact of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 pandemic on the morbidity and mortality of amyotrophic lateral sclerosis patients in Valencia, Spain. *European Journal of Neurology*, 31 (12), e16465. Doi: 10.1111/ene.16465.

Guan, T., Kong, J. & Lombard, J. (2026). Neurotropic viruses and the TDP-43 axis: reframing sporadic ALS through a viral-proteinopathy lens. *Cell Death*, 2 (3), 100018. Doi: 10.1016/j.celld.2026.100018.

Guinebretiere, O., Calonge, Q., Bruneteau, G., Amador, M. & Nedelec, T. (2025). Time trends in incidence of motor neuron diseases in France: a comprehensive 14-year nationwide study (2010-2023). *European Journal of Neurology*, 32 (4), e70156. Doi: 10.1111/ene.70156.

Karam, R., Iskandar, K., Watfa, M. & Zeitoun, A. (2024). Serious adverse events following immunization with COVID-19 vaccines in Lebanon: a retrospective analysis of the National Pharmacovigilance Database. *BMC Public Health*, 24, 2905. Doi: 10.1186/s12889-024-20297-z.

Kim, D. H., Kim, J. H., Jeon, M. T., Kim, K. S., Kim, D. G. & Choi, I. S. (2025). The role of TDP-43 in SARS-CoV-2-related neurodegenerative changes. *Viruses*. 17 (5), 724. Doi: 10.3390/v17050724.

Lee, S., Arcila-Londono, X., Steijlen, K., Newman, D. & Grover, K. (2021). Case report of ALS patient with COVID-19 infection. *Neurology*, 96 (15 Suppl), 5032. Doi: 10.1212/WNL.96.15_supplement.5032.

Li, X. & Bedlack, R. (2021). COVID-19-accelerated disease progression in two patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*, 64 (3), E13-E15. Doi: 10.1002/mus.27351.

Marzok, A., Mapletoft, J. P., Ahmed, I., Cowbrough, B., Celeste, D. B., D'Agostino, M. R., Ang, J. C., Chen, A. T., Surendran, V., Tugg, Y., Li, H., Wong, K., Dvorkin-Gheva, A., Zhang, A., Stacey, H. D., Lam, M., Kollar, Y., Milnes, K. R., Afkhami, S. & Miller, M. S. (2026). Acute viral infection accelerates neurodegeneration in a mouse model of ALS. *Nature Communications*, 17, 10335. Doi: 10.1038/s41467-026-77353-y.

Masrori, P. & Van Damme, P. (2020). Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review.

European Journal of Neurology, 27 (10), 1918-1929. Doi: 10.1111/ene.14393.

Santos, M. O., Domingues, S., Gromicho, M., Pinto, S. & de Carvalho, M. (2022). Impact of SARS-CoV-2 infection among non-invasive ventilated ALS patients. Journal of Neuromuscular Diseases, 9 (2), 257-259. Doi: 10.3233/JND-210733.

Pupillo, E., Bianchi, E., Beghi, E., Pedrazzini, F. A., Giglio, A., Schilke, E. D., Percetti, M., Colleoni, C. M., Mainini, G., Calabresi, P., Primiano, G., Frisullo, G., Padovani, A., Cristillo, V., Pilotto, A., Arici, D., Gipponi, S., Tedeschi, G., d'Ambrosio, A., Melisi, R. D., Gallo, A., Bisecco, A., Salmaggi, A., Basilico, B., Scaccabarozzi, C., Kiferle, L., Valenti, R., Avino, G., Borghi, A., Contardi, S., Zini, A., Ferrarese, C. & Beretta, S. (2025). Multicentre case-control study on the association between COVID-19 vaccines and neurological disorders (COVIVAX). *Scientific Reports*, 15, 4179. Doi: 10.1038/s41598-025-88837-0.

Sodagari, S. & Sodagari, N. (2025). Examining vaccination-related adverse events in frequent neurodegenerative diseases. *Brain, Behaviour, & Immunity-Health*. 43, 100902. Doi: 10.1016/j.bbih.2024.100902.

Sopranzi, F. M., Faragalli, A., Pompili, M., Carle, F., Gesuita, R. & Ceravolo, M. G. (2024). Incidence of amyotrophic lateral sclerosis before and during the COVID-19 pandemic: evidence from an 8-year population-based study in Central Italy based on healthcare utilization databases. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 25 (5-6), 554-562. Doi: 10.1080/21678421.2024.2336127.

Stacchiotti, C., di Regnella, S. M., Cinotti, M., Spalloni, A. & Volpe, E. (2025). Neuroinflammation and amyotrophic lateral sclerosis: recent advances in anti-inflammatory cytokines as therapeutic strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 26 (8), 3854. Doi: 10.3390/ijms26083854.

Van Es, M. A., Hardiman, O., Chio, A., Al-Chalabi, A., Pasterkamp, R. J., Veldink, J. H. & van den Berg, L. H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, 390 (10107), 2084-2098. Doi: 10.1016/S0140-6736(17)31287-4.

Zhang, H. & Zhou, Z. (2022). COVID-19 and the risk of Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and multiple sclerosis. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 9 (12), 1953-1961. Doi: 10.1002/acn3.51688.


BİDGE