

EMBRİYOLU TAVUK YUMURTALARINDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN İNFEKSİYÖZ BRONCHİTİS VIRUS (IBV) ENFEKSİYONUNUN HİSTOPATOLOJİK YÖNDEN İNCELENMESİ

Fethi YILMAZ¹ Gülçin ÖZTÜRK² Harun ÖZER³ Adile MUZ³

¹Fırat Üniversitesi Sıvrice Meslek Yüksekokulu, Elazığ-TÜRKİYE

²Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Elazığ-TÜRKİYE

³Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 16.06.1998

Histopathological Examination of Experimentally Induced Infectious Bronchitis Virus (IBV) Infection in Embryonic Chicken Eggs

SUMMARY

Aim of this study is introduction of macroscopic and microscopic findings of Infectious Bronchitis Virus (IBV) Infection in embryonated chicken eggs. In this study, 0.1 ml IBV type 274, diluted in 1/100, with a titre of EID₅₀ 10⁴ was given to 60 SPF embryonated 10-day old eggs by chorio allantoic fluid. Fifteen embryonated eggs were kept as control group. During the study , a total number of 27 embryos died and there were not any remarkable macroscopic differences between the infected and control group embryos. In the microscopic examination, lesions were determined to occur from the 14th hatching day, particularly in lungs, liver and kidneys.

Key words: IBV, Experimental Infection, Embryo, Histopathology.

ÖZET

Bu çalışma IBV enfeksiyonunun embriyolarda oluşturduğu makroskopik ve mikroskopik değişimlerin daha detaylı bir şekilde ortaya konulabilmesi amacıyla planlanmıştır. Çalışmada, 60 adet embriyolu SPF tavuk yumurtalarına titresi EID₅₀ 10⁴ olan İnfeksiyöz Bronchitis Virüsü (IBV) 274 suyu 1/100 oranında sulandırılarak 0,1 cc dozda 10 günlük embriyolara Koryo Allantoik Sıvı (KAS) yoluyla verildi. Kontrol grubu olarak 15 adet embriyolu yumurta kullanıldı. Çalışma süresince toplam 27 adet embriyonun öldüğü, enfekte ve kontrol grubu embriyolar arasında makroskopik olarak dikkati çekici bir farkın oluşmadığı görüldü. Mikroskopik muayenede ise 14.kuluçka gününden itibaren lezyonların şekillenmeye başladığı, akciğer, karaciğer ve böbreklerin infeksiyondan etkilenen belli başlı organlar olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler: IBV, Deneysel Enfeksiyon, Embriyo, Histopatoloji.

GİRİŞ

İnfeksiyoz Bronşitis (IB) tavukçuluk sektöründe önemli ekonomik kayıplara sebep olan viral bir enfeksiyondur. Enfeksiyonun ekonomik önemi, damızlık ve ticari yumurtacı tavıklarda yumurta veriminde düşme, yumurtanın iç ve dış kalitesinde bozulma, broilerlerde ise kilo kaybı gibi nedenlerden kaynaklanmaktadır. Hastalığa doğal olarak tavuklar duyarlı olup, her yaşta hayvanlarda görülebilir. Ancak hastalık civcivlerde çok daha şiddetli seyretmektedir (2,8,22).

Farklı yaş gruplarındaki hayvanlarda enfeksiyona bağlı olarak farklı klinik semptomlar gözlenmektedir. Enfeksiyona oldukça duyarlı olan civcivlerde solunum yolu semptomları dikkat çekicidir

(2,8,10,15,18). İnfeksiyoz Bronşitis'te ortaya çıkan patolojik lezyonlar virus susuna, alınış yollarına ve duyarlı hayvanların yaşlarına bağlı olarak farklılık göstermektedir (8,11,15,18,20).

Enfekte civciv ve piliçlerin nekropsisinde trakea, nasal bölge ve sinuslarda seröz, kataral veya kazeöz eksudat görülmektedir. Bazı durumlarda hava keselerinin bulanık görünümde olduğu veya sarımsı kazeöz eksudat içerdiği bildirilmektedir (8). Virusun bir çok patojenik suyu vardır. Bunlardan nefropatojenik olan virus susları ile enfekte tavıklarda gözlenen başlıca lezyonlar, böbreklerin renklerinin açılması ve yumuşaması ile üreterlerin ürat kristalleri ile dolu olmasıdır (5,7,8).

Hastalıkla ilgili olarak meydana gelen histopatolojik değişimler, trakea, bronş, akciğerler ve ductus alveolarisde hücre infiltrasyonları, mukoza ve submukozada ödem, konjesyon, epitelde vakuolizasyon, hiperplazi, silya kaybı ve submukozada hemoraji şeklindedir (8,12,15). Üriner sisteme, üreterlerde metaplazi, epitelial hücre proliferasyonu, ürolitiasis ve renal tubuler nekroz gözlenmektedir (2,5,21).

Böbreklerde korteks ve medullada tubulus epitelinde dökülmeye ve yanığı hücreleri ihtiiva eden kistik tubuller ve intersitisiyel yanığı hücreleri infiltrasyonlarının görüldüğü bildirilmektedir (17,20).

IB virusu en iyi 9-11 günlük embriyolu tavuk yumurtalarında ürer. Embriyolarda kuluçka günlerine göre değişiklik gösteren karakteristik lezyonlar meydana gelir. Bu lezyonların, embriyolarda hareketsizlik, cücelik ve kaslarda deformasyon; amniotik sıvı miktarında artış, amnionda kalınlaşma ve mezofezozda ürat birikimlerinden ibaret olduğu ve genellikle inokulasyondan 3 gün sonra şekillendiği bildirilmektedir. Yine embriyolardaki mikroskopik değişimlerin akciğer, karaciğer ve böbreklerde lokalize olduğu ifade edilmektedir (8,14). Ayrıca IB virusunun reproduktif sistem üzerine de etki ettiği bildirilmektedir (8,9).

IBV infeksiyonu ile ilgili yapılan çalışmalar daha ziyade civciv ve tavuklar üzerine olup, embriyoda yapılan çalışmalar azınlıktadır. Bu çalışma IBV infeksiyonunun embriyolarda oluşturduğu makroskopik ve mikroskopik değişimlerin daha detaylı bir şekilde ortaya konulabilmesi ve bu sahada yapılacak olan çalışmalara yardımcı olunması amacıyla planlanmıştır.

MATERIAL VE METOT

Çalışmada kullanılan virus ve SPF yumurtalar Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edildi.

Çalışmada 75 adet embriyolu tavuk yumurtası kullanıldı. Bu yumurtalar inkubasyonun 10. gününde 60 adedi enfekte, 15 adedi de kontrol grubu olarak bırakılmak üzere ikiye ayrıldı. Enfekte gruba titresi EID₅₀ 10⁻⁴ olarak belirlenen IBV 274 suyu 1/100 oranında Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) ile sulandırılarak 0,1 cc dozunda koryo allantoik sıvıya (KAS) inokülé edildi. Yumurtalar her gün düzenli olarak aynı saatlerde olmak üzere günde 2 defa kontrol edildi. Inkubasyondan sonraki ilk iki günde meydana gelen embriyo ölümleri spesifik olmayan etkilere bağlanarak değerlendirilmeye alınmadı. Embriyoların açılmaya başladığı 12. kuluçka gündünden itibaren her gün düzenli olarak enfekte grup embriyolardan ölenler ile canlı embriyolardan üçer adet, kontrol grubu embriyo-

lardan da birer adet yumurta açıldı. Embriyo ağırlıkları ile, but uzunlukları ve but genişlikleri ölçüldü.

Nekropsileri yapılan embriyolardan öncelikle akciğer, karaciğer, böbrek, dalak, beyin, kalp ve iskelet kasları olmak üzere doku örnekleri alınarak tamponlu nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Bilinen yöntemlerle hazırlanan parafin bloklar 5 µm' ye ayarlı nikrotomda kesilerek Hematoxylin-Eosin (H&E) ile boyandı (13). İşik mikroskobunda incelendi.

Bakteriyolojik olarak KAS ve iç organlardan ekimler yapıldı.

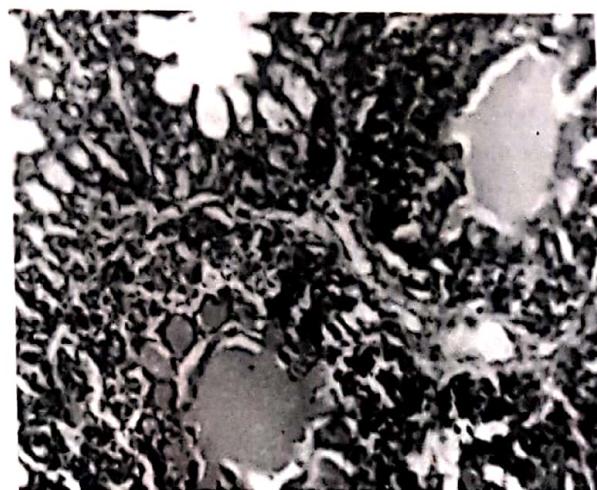
BULGULAR

Makroskopik Bulgular

Çalışma süresince toplam 27 adet embriyoda ölüm görüldü. Meydana gelen embriyo ölümlerinin 5' i nonspesifik kabul edilerek değerlendirilmeye alınmadı. Kuluçka süresinin 12. gündünde 5, 13. gündede 5, 14. gündede 11 ve 15. gündede 1 adet embriyo ölümü tespit edildi. Ölümlerin özellikle 15. kuluçka gününe kadar devam ettiği, canlı kalanlarda ise yetersiz tuylenme ve hareketsizlik şekillendiği gözlandı. Enfekte grup embriyolardan ölen ve canlı kalan embriyolar ile kontrol grubu embriyolar arasında ölçüm ve tartım sonuçları itibarı ile ciddi bir farklılığın oluşmadığı, ancak 17. kuluçka gündünden itibaren enfekte grup embriyoların karaciğerlerinin yeşilimtrak sarı bir renk aldığı görüldü.

Mikroskopik Bulgular

Mikroskopik değişimlerin 14. kuluçka gündünden itibaren oluşmaya başladığı ve ilerleyen kuluçka günlerinde de giderek şiddetlendiği görüldü. Başlangıçta akciğerlerde hiperemi dikkat çekerken, 17. kuluçka gündünden itibaren bronşiolerde ve interseptal dokuda ödem (Şekil1) şekillenmeye başladığı ve gittikçe şiddetlendiği, kuluçka süresinin sonuna doğru bronşiol epitellerinde dejenerasyon, nekroz ve deskuamasyon (Şekil2), peribronşial hücre infiltrasyonlarının varlığı saptandı.



Şekil 1. Bronşioler ve interseptal dokuda ödem ve hiperemi H E. X 66.



Şekil 2. Akciğerlerde ödem, hiperemi, bronşiol epitellerinde dejenerasyon, nekroz ve deskuamasyon. H. E. X 66.

Karaciğerde sinüzoidlerde dilatasyon ve hemoraji, perivasküler hücre infiltrasyonları ve hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz şekillendiği, özellikle 15. kuluçka gününden itibaren bu lezyonların giderek şiddetlendiği görüldü.

Böbreklerde yine hiperemiyle başlayan mikroskopik değişimlerin 17. kuluçka gününden itibaren tubulus epitellerinde dejenerasyon, nekroz ve deskuamasyon şeklinde devam ettiği gözlandı.

İncelemeye alınan diğer organlarda dikkati çekici herhangi bir bulguya rastlanmadı. Kontrol grubu embriyolarda makroskopik ve mikroskopik olarak herhangi bir bulgu gözlenmedi. Bakteriyolojik ekimlerde herhangi bir üreme olmadı.

TARTIŞMA

İnfeksiyon bronşitis diğer birçok hastalıklla karışabilen bulgulara sahip olduğu için, klinik ve otopsi bulgularına göre teşhis edilmesi imkansızdır. Yumurtlama dönemindeki tavuklarda hastalıkla ilgili solunum sistemi bulguları gençlere oranla daha hafif şiddette olmasına karşın, yumurta kalitesinde ve veriminde önemli düşüşler görülmektedir. Mortalite oranı genç hayvanlarda yaşlılara oranla çok daha fazladır. Bu oran hayvanın yaşı, pasif bağımlılık ve çevre şartları gibi çeşitli faktörlere göre değişiklik gösterir (2,8,22).

Hastalığın Dünyada ve Türkiye' deki varlığı çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan araştırmalar sonucunda ortaya konulmuştur (3,4,5,19). IB'de görülen makroskopik ve mikroskopik değişimler hayvanın yaşına göre farklılık göstermektedir (2). IB'de makroskopik olarak embriyolarda cücelik, hareketsizlik, yetersiz tüylenme, yüzeysel konjesyon ve ölümleinin görüldüğü bildirilmiştir (8,14). Bu çalışmada da en

önemli makroskopik bulgular olarak yetersiz tüylenme, hareketsizlik ve 15.kuluçka gününe kadar devam eden ölümler dikkat çekmiştir.

Embriyoda yapılan deneysel bir çalışmada mikroskopik değişikliklerin özellikle akciğer ve böbreklerde şekillendiği ifade edilmiştir (14). Akciğerlerde konjesyon, hücre infiltrasyonu ve seröz eksudat ile karakterize pnöyomonik lezyonların bulunduğu, böbreklerde ödem ve proksimal konvolüt tubulus epitellerinin genişlemesiyle şekillenen intersitisyal nefritis ve karaciğerde konjesyon, perivasküler hücre infiltrasyonu ve nekrozun geliştiği kaydedilmiştir (8,14). Bu çalışmada başlıca mikroskopik değişikliklerin akciğer, karaciğer ve böbreklerde şekillendiği gözlandı. Akciğerlerde hiperemi ile başlayan lezyonların 17.kuluçka gününden itibaren ödem, epitelde dejenerasyon, nekroz ve yangı hücre infiltrasyonları şeklinde devam ettiği saptanmış olup, benzer bulguların cıcvılderde trakea, nasal boşluklar, sinuslar ve hava keselerinde seröz, kataral veya kazıcı bir eksudat ile karakterize pnöyomoni vakalarında da görüldüğü bildirilmektedir (8,12,15).

Bu çalışmada böbreklerde görülen; tubulus epitellerinde dejenerasyon, nekroz ve deskuamasyon gibi bulguların gerek embriyolarda (8,14) ve gerçek cıcvılderde (6,17,21) yapılan çalışmalar da varlığından söz edilmektedir. Ancak embriyolarda (8,14) yapılan çalışmalarda saptanan böbreklerde ödem, cıcvılderde (5,7,8) ise; böbreklerde büyümeye, renk değişimi, tubuller ve üreterlerde ürik asit kristallerinin birikimi gibi bulgulara bu çalışmada rastlanılmamıştır. Ayrıca yapılan deneysel bir çalışmada (6), intranasal IBV inokulasyonu sonucu böbreklerde intersitisyumda gözlenen heterofil ve makrofaj infiltrasyonu da bu çalışmada kaydedilmemiştir. Yine cıcvıllerin nefropatik IBV ile deneysel enfeksiyonunda böbreklerin toplayıcı kanal ve üreter epitellerinde dejenerasyon yanında hiperplazi ve hipertrofi saptanmıştır (21). Virusun nefrotropik "T" suşunun aerosol yol ile verilmesi sonucu böbreklerdeki dejeneratif lezyonların yanısıra polimorf nükleär lökosit ihtiiva eden kistik tubullerin varlığı bildirilmiştir (17).

Embriyolarda yapılan çalışmalar, karaciğerde konjesyon, perivasküler hücre infiltrasyonu ve nekroz gibi bulguların (8,14) bu çalışmada da dikkati çektiği ve özellikle 15.kuluçka gününden itibaren lezyonların giderek daha belirgin hale geldiği dikkati çekmiştir.

Hastalığın patojenezine yönelik olarak yapılan bir çalışmada (16), virusun göze damlatılmasıyla hastalık oluşturulmuş, inokulasyon takiben 3.günde trakeada, 5.günde böbreklerde viral antijen saptanmışlardır. Enterotropik virus suşları ile yapılan bir çalışmada (1) ise bir kısım cıcvı'nın nefritis sonucu olduğu, trakea böbrek ve yeyunum hariç tüm enterik dokularda viral antijenlerin varlığına işaret etmişlerdir

Bu çalışmada IBV 274 suşu ile embriyoların deneyel enfeksiyonu sonucu ölüm görülmüş olup, ölen ve canlı kalan embriyolarda şeiklenen makroskopik

KAYNAKLAR

1. Ambali AG and Jones RC. Early pathogenesis in chicks of infection with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 1990; 34 (4): 809-817.
2. Arda M, Minbay A, Aydin N, Akay Ö ve İzgür M. Kanatlı Hayvan Hastalıkları, Medisan Yayınevi, Ankara, 1994, 135-140.
3. Babila A, Ası Y, Akçadağ B ve Gürel A. İstanbul ve Trakya Bölgesi kümese hayvanlarında infectious bronchitis (IB), infeksiyöz laryngotracheitis (ILT), infeksiyöz bursal disease (IBD), egg drop syndrome 76 (EDS 76), avian encephalomyelitis (AE) ve adenovirus enfeksiyonlarının epizootiyolojik araştırılması ve izolasyon çalışmaları. *Pendik Hay. Hast. Arşt. Enst. Derg.* 1988; 19(1-2): 66-77.
4. Baysal T ve Bozkır M. Konya Bölgesi kümese hayvanlarında infeksiyöz bronchitis (IB), infeksiyöz laryngotracheitis (ILT), infeksiyöz bursal disease (IBD), egg drop syndrome 76 (EDS 76), avian encephalomyelitis (AE) ve adenovirus enfeksiyonlarının epizootiyolojik araştırılması ve izolasyon çalışmaları. *Etilik Vet. Mikrobiyol. Enst. Derg.* 1988; 2: 83-94.
5. Brown TP, Glisson JR, Rosales G, Villegas P and Davis RB. Studies of avian urolithiasis associated with an infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 1987; 31(3): 629-636.
6. Chen BY, Hosi S, Nunoya T and Itakura C. Histopathology and immunohistochemistry of renal lesion due to infectious bronchitis virus in chicks. *Avian Pathol.* 1996; 25: 269-283.
7. Condon RJ and Marshall AT. Pathogenesis of infectious bronchitis nephritis. I. Morphometric analysis of kidney proximal tubular epithelium in chickens. *J. Comp. Pathol.* 1986; 96(1): 47-61.
8. Hofstadt M S. Avian Infectious Bronchitis., Diseases of Poultry.. The Iowa State Univ. Press., 1984, 429-443.
9. Ibragimov AA and Romakhova MA. Pathology of the urinary tract of fowls with infectious bronchitis. Veterinariya, Moscow, USSR. 1983; 9: 35-38.
10. Jordan FTW and Nassar TJ. The effect of infectious bronchitis (IB) virus on day-old chicks previously infected as 17 day old embryos with an avian adenovirus. *Res. Vet. Sci.* 1974; 16(1): 47-53.
11. Klieve AV and Cumming RB. Respiratory diseases and immunity to challenge produced by australian strains of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 1990; 19(2): 305-312.
12. Malo A and Speck J. Scanning electron microscopic studies of epithelial changes in the upper respiratory tract during the course of infectious bronchitis virus infection in chicks. *Deutsche Tierarzt. Wochenschrift.* 1988; 95(7): 296-300.
13. Mc Manus J FA and Mowry R W. Staining Methods, Histologic and Histochemical. Paul B. Hoeber Inc. 1960.
14. Munee M A, Sasipreeyanjan J, Newman JA and Sivanandan V. Pathology of chicken embryos infected with Arkansas strain of Infectious Bronchitis Virus. *Pakistan Vet. J.* 1989; 9(2): 57-63.
15. Nakamura K, Cook J K A, Otsuki K, Huggins MB and Frazier J A. Comparative study of respiratory lesions in two chicken lines of different susceptibility infected with Infectious Bronchitis Virus: Histology, ultrastructure and immunohistochemistry. *Avian Pathol.* 1991; 20(2): 241-257.
16. Owen RL, Cowen BS, Hattel A L, Nagi SA and Wilson RA. Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland 52 strain of Infectious Bronchitis Virus. *Avian Pathol.* 1991; 20(4): 663-673.
17. Purcell DA, Tham VL and Surman PG. The Histopathology of infectious bronchitis in fowls infected with a nephrotropic "T" strain of virus. *Aust. Vet. J.* 1976; 52(2): 85-91.
18. Ratanasethakul C and Cumming RB. The effect route infection and strain of virus on the pathology of Australian Infectious Bronchitis. *Aust. Vet. J.* 1983; 60 (7): 209-213.
19. Sayım Y, Akman A ve Girgin H. Ankara Bölgesi kümese hayvanlarında infeksiyöz bronchitis (IB), infeksiyöz laryngotracheitis (ILT), infeksiyöz bursal disease (IBD), egg drop syndrome 76 (EDS 76), avian encephalomyelitis (AE) ve adenovirus enfeksiyonlarının epizootiyolojik araştırılması ve izolasyon çalışmaları. *Etilik Vet. Mikrobiyol. Enst. Derg.* 1988; 2: 83-94.
20. Siller WG and Cumming RB. The histopathology of an interstitial nephritis in the fowl produced experimentally with Infectious Bronchitis Virus. *J. Pathol.* 1974; 114(3): 163-173.
21. Tsukamoto Y, Kotani T, Shiraishi Y, Kawamura H and Sakuma S. Epithelial cell proliferation of collecting ducts and ureters in the regenerating process of interstitial nephritis caused by Infectious Bronchitis Virus. *Avian. Pathol.* 1996; 25(1): 95-102.
22. Wahi SK, Singh B and Oberoi M S. Pathogenicity trials with Infectious Bronchitis (IB) and Chicken Embryo Lethal Orphan (CELO) viruses in birds. *Indian Vet. J.* 1991; 4: 304-3.

ve mikroskopik değişikliklerin hastalığa özgü lezyonları olduğu ortaya konulmuştur.