

A.Ü. Veteriner Fakültesi Genel ve Deneysel Patoloji Kürsüsü
Prof. Dr. Cemalettin Köküslu

A.Ü. Veteriner Fakültesi Bakteriyoloji ve Salgınlar Kürsüsü
Prof. Dr. Mustafa Arda

TAVUKLARIN DENEYSEL VE SPONTAN İNFEKSİYÖZ LAR- YNGOTRACHEİTİS OLAYLARININ ERKEN TEŞHİSİNDE HİSTOPATOLOJİK VE SEROLOJİK YÖNTEMLERLE KAR- ŞILAŞTIRMALI ARAŞTIRMALAR*

Cemalettin Köküslu**

İ. Ayhan Özkul***

Ömer Akay****

**The Studies on The Early Diagnosis of Infectious Laryngot-
racheitis in Chickens by The Histopathological and Serolo-
gical Examinations.**

Summary: *The purpose of this study was to investigate the histolo-
gical findings and their importance in the early diagnosis of ILT. Seventy fi-
ve chicken were intratracheally infected by ILT virus.*

ILT in chicken was produced experimentally.

The laryngitis in 72 and tracheitis in 69 of 75 chicken were seen.

*The intranuclear inclusion bodies in the epithelial cells of trachea were
detected in 12 cases.*

ILT virus was isolated in 50 of 75 cases.

* Bu Araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından destek-
lenmiştir (Proje No: VHAG-455).

** Prof. Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi Genel ve Deneysel Patoloji Kürsüsü, Anka-
ra-Türkiye.

*** Dr. med. vet. A.Ü. Veteriner Fakültesi Genel ve Deneysel Patoloji Kürsüsü,
Ankara-Türkiye.

**** Dr. med. vet. A.Ü. Veteriner Fakültesi Bakteriyoloji ve Salgınlar Kürsüsü,
Ankara-Türkiye.

Özet: *Bu çalışmada piliçlerde ILT'in erken teşhisinde histolojik bulguların önemi üzerinde durulmuştur. Yetmiş beş adet piliç ILT virusu ile intratracheal yolla enfekte edilmiştir.*

Alınan Sonuçlara Göre:

- 1- *Hastalık deneysel olarak meydana getirilmiştir.*
- 2- *Yetmiş beş piliçten 72 sinde laryngitis ve 69 unda da tracheitis şekillenmiştir.*
- 3- *On iki olayda trachea epitellerinde intranükleer inklüzyon cisimciği saptanmıştır.*
- 4- *Yetmiş beş olaydan 50'inde virus izolesi başarılmıştır.*

Giriş

İnfeksiyöz laryngotracheitis, solunum güçlüğü, öksürük ve kanlı bir eksuda çıkarma ile karakteristik piliçlerin akut bir hastalığıdır. Bu hastalıkta trachea mukozasını döşeyen hücreler şişerler ve mukozada erozyon ve hemoraji ile sonuçlanan ödemli bir durum meydana gelir. Hastalığın erken devirlerinde örtücü epitel hücrelerinde intranükleer inklüzyonlar şekillenmektedir.

Hastalık, laryngotracheitis, infeksiyöz laryngotracheitis ve kanatlı difterisi olarak bilinmektedir. Birçok yayımlar hastalığı infeksiyöz laryngotracheitis diye bildiriyorlar. Ancak laryngotracheitis terimi ilk defa 1930 tarihinde kullanılmıştır. Önceleri bazı araştırmacılar hastalığı infeksiyöz bronşitis olarak ta bildirmişlerdir (3).

Laryngotracheitis; Amerika, Avrupa ve Avustralyadaki büyük tavukçuluk merkezlerinin önemli bir tavuk hastalığı olmuştur. Yurdumuzda da büyük salgınlar şeklinde olmasa bile, bazı ILT olaylarına rastlanmaktadır. Hastalık daha çok 3-4 aylık genç piliçlerde görülmekte ve normal seyrini iki haftada tamamlamaktadır. Bu hastalık tavukların yumurta üretimini engellemekte ve ölümle sonuçlanan kayıplara sebep olmaktadır. Hastalığın şiddetli seyrettiği durumlarda % 25-85 oranında ölümlere neden olabileceği bildirilmektedir. ILT; infeksiyöz bronşitis, Newcastle ve mycoplasma enfeksiyonları ile karıştırılabilir (4).

İnfeksiyöz laryngotracheitis üzerinde yapılan histopatolojik çalışmalarda (1, 4, 5), hastalığın ilk günlerde piliçlerin solunum yollarında şekillenen yangıya ilgili bulguların yanı sıra hastalık için karakteristik olan ve trachea örtücü epitel hücrelerinin çekirdeklerin-

de oluşan asidofilik, yuvarlak veya oval, bazen de uzun ve sosis biçiminde inklüzyon cisimcikleri görülmüştür. Giemsa ile yapılan boyamalarda bu inklüzyon cisimciklerinin kesin sınırlı ve pembe rengi aldığı da dikkati çekmiştir.

Bu nedenlerle klinik semptomlarının yanısıra hastalığın 1-5. gününde öldürülen piliçlerin tracheasından yapılan histopatolojik incelemelerde ILT etkeni olan herpes virusun epitel hücreleri içerisinde şekillendirdiği tipik intranükleer inklüzyon cisimciklerinin saptanması, ayırıcı diağnoz yönünden en önemli yeri tutmaktadır (3, 4, 5).

Hastalık, yalnız tavuklarda salgınlar yaptığından halk sağlığı için önemli değildir (3).

Çalışmamızda, deneysel ILT olaylarında piliçlerin larynx ve trachealarında şekillenen histolojik bulguların yanısıra, hastalığın 1-5. gününde örtücü epitelde oluşan ve ayırıcı diağnoz için en önemli rolü taşıyan intranükleer inklüzyonların saptanmasına çalışılmıştır. Ayrıca hastalığın diağnozu için virolojik ve serolojik çalışmalar da yapılmıştır.

Materyal ve Metot

a) Virolojik ve serolojik çalışmalar:

ILT olaylarını deneysel olarak oluşturmak için denemelerimizde İngiltere'nin Surray, New Haw, Weybridge, the Central Veterinary Laboratory'den getirttiğimiz virulent ILT virusu kullanıldı. Liyofilize virus pH 7,2 buyyonda eritildi ve antibiyotik katılmasından sonra, virusun inoküle edildiği 9-11 günlük embriyolu tavuk yumurtaları, inokülasyondan 5 gün sonra açıldı ve bunların Korio allantoik membranları (CAM) tipik plâk formasyonu yönünden incelendi. Tipik plâk formasyonu gösteren membranlar steril koşullar altında toplandı ve daha sonra kullanılmak üzere -78°C de deep-freeze'de saklandı.

Veteriner hekim kontrolü altında yetiştirilen 3-4 aylık piliçler, kürsümüze getirildikten sonra kontrol ve deneme hayvanı grubu olarak ayrıldı. Deneme piliçlerine CAM'lı virüs emülsiyonu intratracheal yolla enfekte edildi ($\text{pfu} \cdot 10^{-3.83/0.2} \text{ ml}^{-1}$). Bu piliçlerin hergün klinik muayeneleri yapıldı. Bunlar arasında tipik ILT semptomları gösterenler otopsiye tabi tutuldu ve trachea kazıntuları ile akciğer-

* Plâk formasyon ünitesi

lerinden, bilinen yöntemlerle hazırlanan emülsiyonlar embriyolu tavuk yumurtalarının CAM'larına ekildi. Bütün piliçlerden hazırlanan emülsiyonlar embriyolu tavuk yumurtalarının CAM'larına ekildi. Bütün piliçlerden hazırlanan emülsiyonların CAM'lar üzerinde ILT yönünden tipik plâk formasyonları oluşturup oluşturmadığı gözlemlendi ve virus izolasyonuna çalışıldı. Bu deneme 4 defa tekrarlandı ve deneysel ILT çalışmalarında gruplara göre sırasıyla 5, 3, 2, 5 adet piliç kontrol, 20, 20, 15, 20 adet piliçte intratracheal yolla ILT virus infeksiyonu için ayrıldığından, çalışmamızda toplam olarak 15 kontrol, 75 deneme piliçi kullanıldı.

Ayrıca serolojik testlerde agar gel presipitasyon (AGP) tekniğinden yararlanıldı (2).

Bu yöntemle tavuk çiftliklerinden elde edilen solunum yolları hastalıklı 35 adet piliçten kan alınarak ILT yönünden serolojik yoklamalar yapıldı.

b) Histopatolojik Çalışmalar:

Yukarıda kontrol ve deneme gruplarına göre sayıları belirtilen ve ILT virusunun intratracheal inokülasyonundan sonra 1-5 gün içerisinde hastalığın klinik semptomlarını gösteren piliçlerden otopsileri yapılanların solunum yollarından alınan numuneler, patoloji laboratuvarında bilinen yöntemlerle takip edildi, H.E. ile boyandı ve histopatolojik olarak incelendi. Ancak ILT'nin diagnozunda spesifik bulgu olarak kabul edilen ve trachea epitel hücrelerinin çekirdeklerinde oluşacak hücre çekirdeğinin geniş bir kısmını dolduran homojen, uzun, sosis biçimindeki inklüzyonların saptanması içinde Giemsa boyası yapıldı. Bu incelemelerin yanısıra tavuk çiftliklerinden alınan, solunum yolları hastalıklı 3 adet piliç de histopatolojik olarak incelendi.

Bulgular

a) Virolojik ve Serolojik Bulgular:

Deney piliçlerinin yapılan otopsilerinden virolojik çalışmalar için alınan trachea kazıntıları ve akciğerlerden hazırlanan emülsiyonların embriyolu tavuk yumurtalarının CAM'lara ekilmesi sonucu deneme gruplarına göre sırasıyla, 20, 18, 6, 6 adet numunenin tipik plâk formasyonu gösterdiği, ikinci gruptan itibaren 2, 9, 14 adet numunenin ise tipik plâk formasyonu göstermediği saptandı. Bu du-

ruma göre toplam olarak 75 olaydan 50 sinde virus izolesi mümkün olmuş, 25 inde ise virus izolesi mümkün olmamıştır (cetvel 1).

Cetvel 1. İLT'de Deneysel İnfeksiyon ve Serolojik Yoklama Sonuçları

Gruplar	Deneysel İnfeksiyon			Serolojik Yoklama		
	Inokule Edilen Hayvan S.	CAM'da Lezyon		İşlenen Serum Sayısı	Pozitif	Negatif
		Var	Yok			
Gr. 1	20	20	—	35	—	35
Gr. 2	20	18	2			
Gr. 3	15	6	9			
Gr. 4	20	6	14			

Serolojik çalışmalar sonucu solunum yolları hastalığı semptomları gösteren 35 piliçten alınan kan serumlarının İLT'ye özgü spesifik bant oluşturmadığı görüldü.

b) Histopatolojik Bulgular:

Deneysel İLT olaylarında piliçlerin solunum yollarında şekillenen histolojik bulgular, larynx ve tracheada şekillenen histolojik bulgular olarak iki kısımda incelendi. Cetvel 2. ve cetvel 3. de de göz-

Cetvel 2. Deneysel İLT Olaylarında Piliçlerin Larynxlerinde Şekillenen Histolojik Bulguların Gruplara Göre Saptandıkları Olay Sayıları

Gruplar	Örtücü Epitelde Deskuamasyon	Lenf Folliküllerinde Hiperplazi	Lökosit + Lenfosit İnfiltrasyonunda Artma	Örtücü Epitelde İntranükleer İnklüzyon Cis.	Laryngitis
Gr. 1	19	5	17	—	19
Gr. 2	19	7	19	2	19
Gr. 3	15	11	15	1	15
Gr. 4	19	5	19	1	19
Toplam	72	28	70	4	72

leneceği gibi *larynx bulguları*: Örtücü epitelde deskuamasyon, lenf folliküllerinde hiperplazi, lökosit lenfosit infiltrasyonunda artma, örtücü epitelde intranükleer inklüzyon cisimciği ve laryngitis; *trachea bulguları*: Örtücü epitelde deskuamasyon, submukozada lökosit ve lenfosit infiltrasyonu, lenf follikülü oluşumu, mukozada kanama alanları, örtücü epitelde intranükleer inklüzyon cisimciği ve tracheitis olarak özetlendi. Bu duruma göre, toplam olarak 75 deney pi-

Cetvel 3. Deneysel ILT Olaylarında Piliçlerin Trachealarında Şekillenen Histolojik Bulguların Gruplara Göre Saptandıkları Olay Sayıları

Gruplar	Örtücü Epitelde Deskuamasyon	Submukozada Lökosit + Lenfosit infiltrasyonu	Lenf Follikülü Oluşumu	Mukoza-da Kanama Alanları	Örtücü Epitelde İntranükleer İnklüzyon Cisimciği	Tracheitis
Gr. 1	19	18	7	16	5	19
Gr. 2	19	19	3	6	2	19
Gr. 3	15	13	1	4	2	13
Gr. 4	20	18	-	14	3	18
Toplam	73	68	11	40	12	69

licinden 72 laryngitis ve 69 tracheitis olayı saptandı. Yukarıda belirtilen diğer bulguların görüldüğü olay sayıları cetvel 2. ve 3. de gösterilmiştir. Tracheitis olayları içerisinde ancak 12 olayda intranükleer inklüzyon cisimciğine rastlanmış olup, ayrıca laryngitis olayları içerisinde 4 olayda intranükleer inklüzyon cisimciğine rastlanması da dikkati çekmiştir (Resim 2, 3, 4).

Ayrıca saha çalışmalarından elde edilen solunum yolları hastalıkli 3 adet piliçin, yapılan otopsilerinin histolojik incelenmesi sonucu trachea örtücü epitellerinde intranükleer inklüzyon cisimciklerine rastlanılmadığından, bu olayların diğer solunum yolları infeksiyonlarına ait olabileceği kanısına varılmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Piliçlerde ILT'yi deneysel olarak meydana getirmek amacıyla, intratracheal yolla inokülasyonların yapılmasından sonra, 1-5. günler arasında otopsileri yapılan piliçlerin histolojik olarak saptanan larynx ve trachea bulguları; solunum yollarında yangısal bir olayın oluştuğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca bu olaylar arasında bütün deney gruplarında örtücü epitel hücrelerinde intranükleer asidofilik inklüzyon cisimciklerine rastlanması da incelediğimiz literatür bilgilerine göre (3, 4, 5) bu olayların ILT olabileceğini göstermektedir. Ancak bütün deney piliçlerinin trachea örtücü epitellerinde inklüzyon cisimciklerine rastlanılmaması ise, inklüzyon cisimciklerinin önce epitel hücrelerinde dejenerasyon ve nekroz meydana getirmesi, sonra da örtücü epitel hücrelerinin dökülmesi sonucu olarak epitel hücreleriyle birlikte ortadan kaybolması nedenine bağlanabilir. Çünkü çalışmamızda, deney piliçlerinin otopsilerinin ya-

pılabilmesi için ILT'nin bilinen semptomlarının şekillenmesi için beklenmektedir (Resim 1). Bu semptomlar oluşuncaya kadar geçen zaman ise, inklüzyon cisimciklerinin şekillenmesinden sonra, epitel hücreleriyle birlikte deskuamasyon sonucu ortadan kaybolmasına olanak sağlamaktadır. Bu nedenle deney grupları içerisinde sırasıyla 5, 2, 2, 3 olayda trachealarda intranükleer inklüzyonlara rastlanması, olaylarımızın deneysel olarak meydana getirilmiş ILT olayları olduğunu kabul etmeye yeterli görülmüştür. Cetvel 3. de belirtildiği gibi toplam olarak 69 tracheitis olayı arasında 12 olayda inklüzyon cisimcikleri saptanmıştır. Bu durum yaklaşık olarak tracheitis olayları arasında 1/6 oranında intranükleer inklüzyonlara rastlanabileceğini ortaya koymaktadır.

Ayrıca 72 laryngitis olayı arasında 4 olayda larynx örtücü epitellerinde inklüzyonlara rastlanması da incelediğimiz literatürler arasında göremediğimiz için çalışmamızın dikkati çeken bir diğer bulgusu olarak kabul edilebilir (Cetvel 2).

Deney piliçlerinde antikor oluşması için ILT virusu enfeksiyonundan sonra en az 10 gün geçmesi gerektiğinden bunlara ait serolojik çalışmalar yapılamamıştır. Şöyleki, ILT de mikroskobik bulgular ve özellikle inklüzyon cisimcikleri, solunum yollarında virusun verilmesinden 2-4 gün sonra belirgin bir biçimde oluşmaktadır. Ancak daha sonraki günlerde bu bulgular yavaş yavaş kaybolduğundan antikor şekillenmesi için gerekli en az 10 günlük sürenin beklenmesi halinde histolojik bulgular kaybolacağından bu piliçlerde histolojik incelemelerin yanısıra serolojik çalışmalar da uygulanamamıştır.

Bu nedenle ILT olaylarının teşhisinde histolojik bulgular ve özellikle intranükleer inklüzyon cisimciklerinin saptanması erken teşhis için yeterli sayılmalı ve serolojik çalışmalarla teşhis yöntemine tercih edilmelidir. Çünkü serolojik bulgular yukarıda açıklandığı gibi histolojik bulgulardan ancak bir hafta sonra saptanabilmektedir. Bu durum ise, çok sayıda ILT'li piliçin kaybına neden olabilir.

Deney piliçlerinin solunum yollarından hazırlanan emülsiyonların CAM'lara ekilmesi sonucu, deney gruplarında sırasıyla 20, 18, 6, 6 adet olayda ILT'ye özgü tipik plâk formasyonunun saptanması, 1. ve 2. gruplarda enfeksiyonun daha başarılı olduğunu göstermektedir. 3. ve 4. gruplarda ILT'ye özgü tipik plâk formasyonunun her iki grupta da yalnız 6 olayda saptanması ise bu deney grupları çalışmalarında virusun titresinin düşüklüğü ve deney piliçlerinin rezistansı ile de ilgili olabilir.

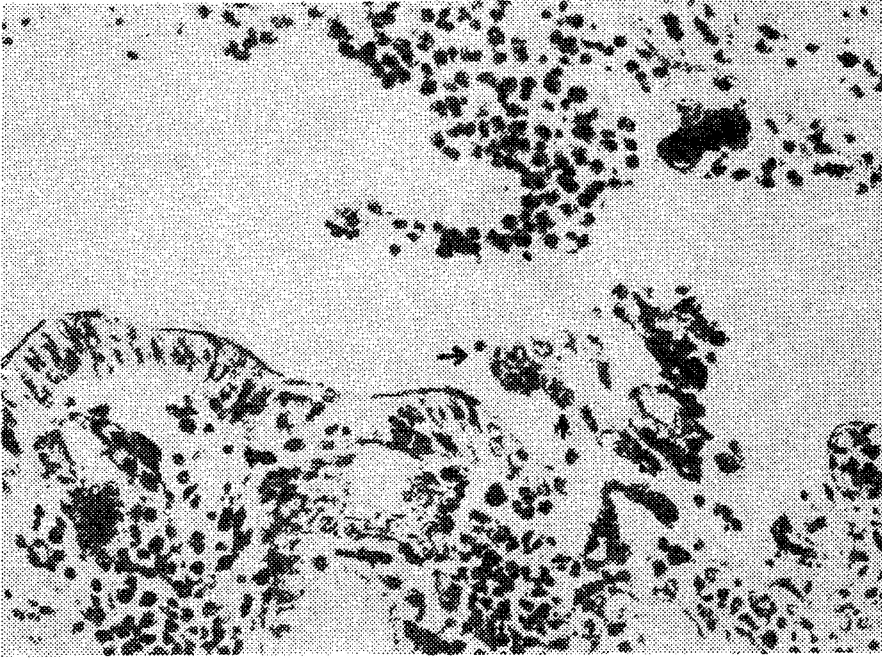
Literatür

- 1- **Cover, M. S., and W. J. Bente**n. (1958): *The Biological Variation of Infectious Laryngotracheitis Virus*. Avian Diseases. 2: 375-83.
- 2- **Fuhr, R., Sipahioğlu, A., Ergün, A., Yalçın, Şengül**. (1976): *Önemli ve Bulaşıcı Bazı Tavuk Hastalıklarının Teşhisinde Agar-Gel-Diffüzyon Testinin Uygulanması*. Etlik Vet. Bakt. Enst. Derg. 4,5-10, 131-138.
- 3- **Hofstad, M. S. ve ark.** (1972): *Diseases of Poultry*, The Iowa State University Press, Ames, 607-618.
- 4- **Pirozok, R. P., C. F. Helmboldt, and E. L. Jungherr**. (1957): *A. Rapid Histological Technique for the Diagnosis of Infectious Avian Laryngotracheitis*. J. Am. Vet. Med. Ass. 130:406-8.
- 5- **Seifried, O.** (1931): *Histopathology of Infectious Laryngotracheitis in Chickens*. J. Exp. Med. 56: 817-26.



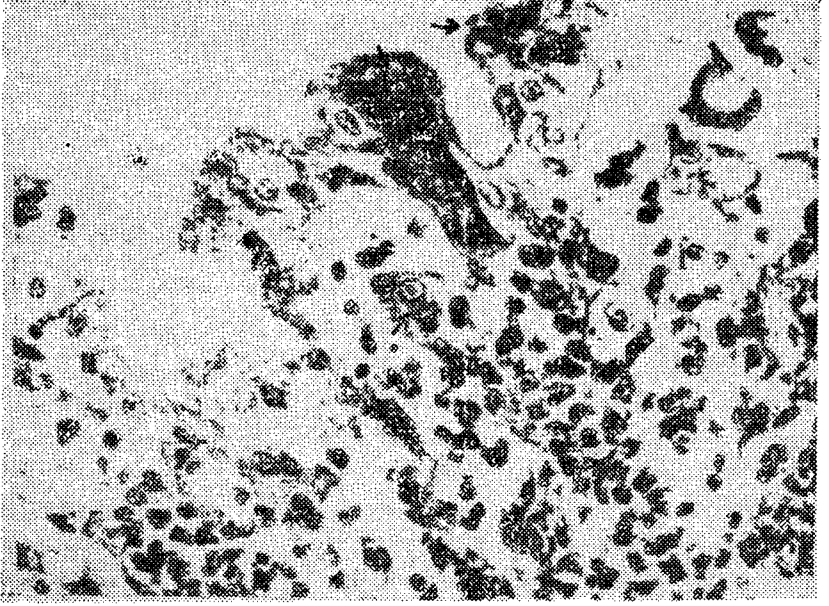
Resim 1. Deneysel ILT'e yakalanmış, solunum güçlüğü ve yem alma isteksizliği gösteren deney piliçeri. Oklar.

The chicken experimentally infected by ILT virus.
They show difficulty in inspiration and losing the appetite. Arrows.



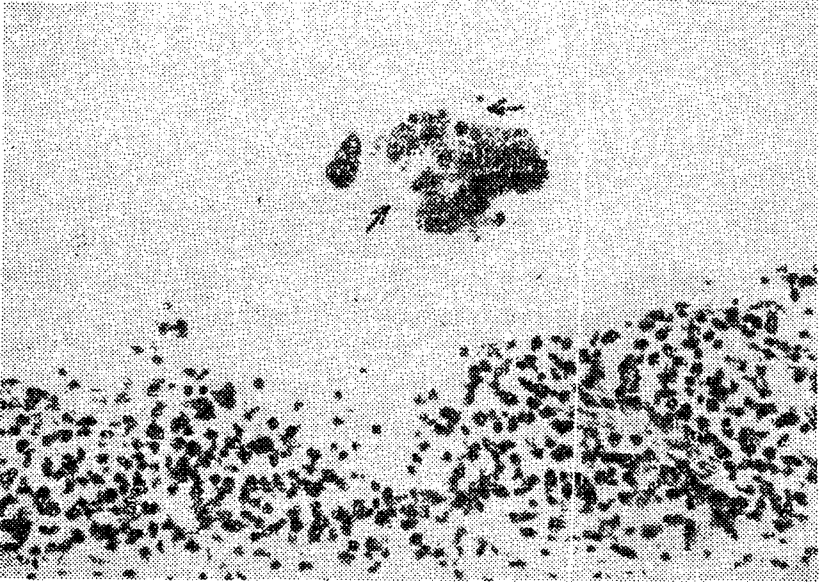
Resim 2. Deneysel ILT'li bir piliçte trachea örtücü epitellerinde şekillenen intranükleer inklüzyon cisimcikler (Oklar), örtücü epitel altında lökosit ve lenfosit infiltrasyonu ile örtücü epitelde deskuamasyon görülüyor. H.E. x 190.

The intranuclear inclusion bodies in the tracheal epithelial cells of a chicken experimentally infected by ILT virus. (Arrows)
The infiltration of leucocytes and lymphocytes and desquamation in the epithelium.



Resim 3. Başka bir deneysel ILT olayında piliç tracheası örtücü epitel hücrelerinde enfeksiyondan 3 gün sonra oluşan intranükleer inklüzyon cisimcikleri daha büyük büyültme ile görülüyor. (Oklar), H.E. x 300.

Intranuclear inclusion bodies in the tracheal epithelial cells of a chicken in the another case infected by ILT virus (Arrows). Third day after inoculation.



Resim 4. Piliç tracheasında intranükleer inklüzyon cisimciklerini içeren küme halinde dökülmüş örtücü epitel hücreleri (Oklar). Enfeksiyondan 4 gün sonra. H.E. x 190.

Desquamated epithel cells in the trachea of a chicken. They include intranuclear inclusion bodies. (Arrows). Fourth day after inoculation.