

Tavuklarda deneysel *Salmonella gallinarum* enfeksiyonunda (Tavuk tifosu) patolojik ve immunohistokimyasal çalışmalar*

Latife BEYAZ¹, Osman KUTSAL²

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kayseri; ²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Ankara

Özet: Bu çalışmada Leghorn ırkı günlük, 2 haftalık, 1 aylık ve 2 aylık hayvanlara *S. gallinarum* 9 suşu $1,8 \times 10^9$ CFU/M dozda, oral olarak inokule edildi. Her bir gruba 0,05 ml, 0,1 ml ve 1 ml bakteriyel süspansiyon uygulandı. İnokulasyondan sonra hayvanlar kendiliğinden ölenler dışında 12. günde ötanazi yapıldı. Bulgular klinik, makroskobik, mikroskobik ve immunohistokimyasal yönden değerlendirildi. Morbidite ve mortalite oranları ile lezyonların ve antijenin organlara göre dağılımı yapıldı. Mortalite günlük ve 2 haftalık civcivlerde %95, 1 aylık piliçlerde %86, 2 aylık piliçlerde ise %43 olarak bulundu. Klinik olarak, günlük civcivlerde lateral deviasyon ve tortikollis, ishal, gözlerde kapanma, solunum güçlüğü, tüylerde karşıklıkla seyreden depresyon ve ayakta duramama gözlemlendi. Oluşan lezyonlar hayvanların yaşı ve etkenin dozuna göre çeşitlilik gösterdi. Makroskobik olarak, günlük civcivlerde akciğerde boz beyaz odaklar, karaciğer ve bağırsaklarda konjesyon gözlemlendi. İki haftalık ve 1 aylık hayvanlarda pektoral ve bacak kaslarında kanama ve bursa Fabricius'da involusyon dikkati çekti. İki aylık piliçlerde bezli mide, karaciğer ve akciğerde konjesyon belirgindi. Dalak bazı gruplarda siyahımsı, bazı hayvanlarda ise oldukça açık renkteydi. Karaciğerde boz beyaz milier odaklara rastlandı, bursa Fabricius'da şiddetli kanama mevcuttu. Mikroskobik olarak, civcivlerde pnömöni, karaciğerde yağlanma ve pasif konjesyon ile bağırsaklarda hemorajik enteritis görülürken erişkinlerde perikarditis, diffuz paranzimatöz hepatitis ve nekrotik enteritise rastlandı. İmmunoperoksidaz boyamada günlük civcivlerin özellikle akciğer ve bağırsaklarında diğer grupların ise bursa Fabricius, karaciğer ve dalaklarında güçlü pozitif reaksiyon gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: Civciv, immunohistokimya, kanatlı tifosu, piliç, *Salmonella gallinarum* 9

Pathological and immunohistochemical studies in experimental *Salmonella gallinarum* infection (Fowl typhoid) in chickens

Summary: In this study, *S. gallinarum* 9 strain was inoculated orally in $1,8 \times 10^9$ doses to one-day-old, 2-week-old, one-month-old and 2-month-old White Leghorn chickens. A bacterial suspension of 1 ml, 0,1 ml and 0,05 ml was used for each group. After the inoculation, the animals were euthanased on the twelfth day expect for the already dead ones. The animals were clinically, macroscopically, microscopically and immunohistochemically examined. The distribution of the morbidity and the mortality ratios with the lesions and the antigen were made according to the organs. Mortality rate figures for one-day-old and 2-week-old, one-month-old, 2-month-old groups were 95%, 86% and 43%, respectively. In one-day-old chicks lateral deviation and torticollis, diarrhea, depression, labored gasping were observed clinically. Lesions occurred showed variation depending on the age of affected birds and the dosage of agent. Macroscopically, it was observed gray white foci in the lungs and hemorrhages in the liver and the intestines of one-day-old chicks. It was also found hemorrhages in the thigh and pectoral muscles and involution of the bursa of Fabricius in chickens 2-week-old of age and one-month-old of age. Hemorrhages were usually present in the liver, lungs and the proventriculus of the 2-month-old chickens. The spleen was blackish in some groups while in some animals was light color. Gray white miliary foci were seen in the liver. Microscopically, pneumonia, lipidosis and passive congestion in the liver with haemorrhagic enteritis in the intestines and severe hemorrhages in the bursa of Fabricius were observed in chicks while pericarditis, diffuse parenchymatous-hepatitis; necrotic enteritis were observed in adults. With immunoperoxidase staining strongly positive reaction were observed in the lungs and the intestines of one-day-old, whereas were observed in the bursa of Fabricius, the liver and spleen of the other groups.

Key words : Chick, chicken, fowl typhoid, immunohistochemical, *Salmonella gallinarum* 9

Giriş

Salmonella mikroorganizmaları insan, memeli hayvan ve kanatlılarda özel hastalıklara neden olurlar ve yalnız bu türlerde enfeksiyon oluştururlar (5,16). Kanatlı tür-

leri için konakçı spesifitesine sahip olan serotipler hareket-siz *Salmonella gallinarum* ve *Salmonella pullorum*'dur. *Salmonella pullorum*'un neden olduğu "pullorum hastalığı" civciv ve palazların akut sistemik bir hastalığıdır. *Sal-*

* Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 99.50-3 proje numarası ile desteklenen aynı isimli doktora tezinin özeti'dir.

monella gallinarum'un neden olduğu "kanatlı tifosu" ise daha yaygın olarak erişkin kanatlıların akut ya da kronik septisemik bir hastalığıdır (7). Hastalık, uzun yıllar boyunca dünya çapında tavukçuluk sektörünün ana problemlerden biri olarak kalmıştır (7,24,27).

Kanatlı tifosu, (Fowl typhoid) tüm yaş grubundaki kanatlılarda şiddetli morbidite ve değişen derecelerde (%10-%90) mortaliteye sebep olmaktadır, ancak fetal enfeksiyona en fazla günlük civcivlerin duyarlı olduğu, özellikle deneysel koşullar altında günlük civcivlerde mortalitenin %100 oranında olabildiği bildirilmiştir (6,28,29). Artan yaşla birlikte enfeksiyona karşı duyarlılığın azaldığı düşünülmektedir (28).

Etken, Enterobacteriaceae familyasının genel özelliklerini taşır; Gram-negatif, kısa ve küçük çomaklar şeklinde olup 0,7-1,5 µm çapında 2,0-5,0 µm uzunluğundadır (5).

Hayvanların mikroorganizmayı genellikle sindirim sisteminden alarak enfekte olduğu ve mikroorganizmanın, gaita (28) ve yumurta yolu (10) ile dışarı atıldığı bildirilmiştir. *S. gallinarum*'un deneysel enfeksiyon şartları altında bir civcivden diğerine bulaşmadığı ve enfekte kanatlılardan uzun periyotlarda dışkı ile etkenin atılmadığı ortaya konmuştur. *S. gallinarum*'un sindirim kanalına lokalize olmadığı ve dışkıda etkenin görülmesinin doku enfeksiyonunun sonucu olduğu bildirilmiştir (29).

Enfekte hayvanlarda klinik olarak bir araya toplama eğilimi, gözlerde kapanma ve solunum güçlüğünün ortaya çıktığı tespit edilmiştir (19). Erişkin kanatlılarda ise ayrıca yeşilden yeşilimsi-sarıya kadar değişen renkte ishal gözlenmiş ve ölümlerin klinik belirtiler göstermeksizin de olduğu bildirilmiştir (5).

Makroskobik değişiklikler perakut olgularda gözlenememekte, buna karşın uzun süren olgularda ortaya çıkmaktadır. En yaygın görülen bulgular karaciğer, dalak ve böbreklerde kırmızılık ve şişkinliktir. Genellikle genç tavuklarda subakut ve kronik olgularda yeşilimsi-kahverengi ve bronz renkte şişkin bir karaciğer saptanır. Karaciğer ve kalpte milier tipte grimsi-beyaz odaklar, perikarditis, ovaryumun yırtılması sonucunda peritonitis, ovaryumda şekil bozukluğu ile hemoraji ve bağırsaklarda kataral bir yangı bulunur. Yeşilimsi-beyaz odaklara ayrıca genç civcivlerin akciğer, kalp ve kaslı midelerinde de rastlanmıştır (13,14, 26). Tavuk tifosu için elde edilebilir mikroskobik bulgular üzerinde çok sınırlı sayıda bilgi bulunmaktadır. Perakut olgularda, karaciğer, dalak ve böbrekte yalnızca şiddetli vasküler konjesyon ayırt edilebilir. Akut ve subakut olgularda karaciğerde heterofil infiltrasyonu ve fibrin birikimi ile birlikte hepatositlerin multifokal nekrozu görülür. En ka-

rakteristik mikroskobik lezyonlar, kalp ve kaslı midede bulunmaktadır. Kalpte akut olgularda kas teli nekrozu, kronik olgularda histiositik hücre infiltrasyonu gözlenmektedir. Bu infiltrasyon kaslı mide ve pankreasta da görülebilmektedir. Daha az yaygın olmakla birlikte diğer bulgular, kataral bronşitis, kataral enteritis ve böbreklerin intersitisyel yangısı olarak bildirilmiştir (18,27).

Bu çalışmada, 3 farklı dozda *Salmonella gallinarum* 9 serotipi inokule edilen civciv ve piliçlerde deneysel olarak oluşturulan kanatlı tifosunun makroskobik ve mikroskobik olarak değerlendirilmesi ve immunoperoksidaz tekniğinin bu hastalığın tanısında öneminin ortaya konması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Deneysel hayvanları

Bu çalışma SPF (specific pathogen free) erkek White Leghorn civciv ve piliçlerde yapıldı. Çalışmada Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma Enstitüsü'nden 30 adet günlük SPF embriyolu tavuk yumurtası, 26 adet 2 haftalık SPF civciv, 26 adet 1 aylık SPF piliç ve 26 adet 2 aylık SPF piliç temin edildi.

Günlük civciv elde etmek amacıyla, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Kuluçkahanesi kullanıldı. Yumurtalar kuluçka makinesine konulmadan önce fumigasyon işlemine tabi tutuldu. Makineden çıkan civcivlere, aynı gün $1-2 \times 10^{10}$ bakteri/ml miktarındaki *Salmonella gallinarum* 9 suşu (Compton Laboratory, UK), her birinde 6 adet civciv bulunan 3 gruba 0,05 ml, 0,1 ml ve 1 ml dozlarında oral yolla mikropipetle uygulandı. Beş adet civciv kontrol olarak tutuldu. Etken verilmiş olan civcivler ana makinesinde ayrı bölümlere konuldu. *Ad libitum* olarak yem ve su verildi, kontroller ise farklı bir yerde bulundurulmuş aynı şekilde yem ve suları verildi.

Sırasıyla 2 haftalık, 1 aylık ve 2 aylık hayvanlar Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma Enstitüsü'nden getirilerek aynı işlem uygulandı.

Suşun temin edilmesi

Tavuklarda deneysel enfeksiyon oluşturmak için kullanılan *S. gallinarum* 9 suşu İngiltere, Compton, Nr. Newbury, Berks'deki Institute for Animal Health Compton Laboratory'da görevli Dr. Paul A. Barrow'dan temin edildi.

İnokulumun hazırlanması

S. gallinarum 9 suşunun bir gecelik buyyon kültüründen nutrient agarlara ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkubasyona bırakıldı. Nutrien agar'da üreyen koloniler %85'lik NaCl'de ml'de $1-2 \times 10^{10}$ bakteri olacak şekilde süspanse edildi (12).

Deneysel enfeksiyonun oluşturulması

Günlük, 2 haftalık, 1 aylık ve 2 aylık olmak üzere 4 farklı yaş grubunda hayvan kullanıldı ve her yaş grubuna sırasıyla, 0,05 ml (A grubu), 0,1 ml (B grubu) ve 1 ml (C grubu) olmak üzere 3 farklı dozda etken verildi. Kontrol gruplarına ise sadece içme suyu verildi.

Deney düzeni

Farklı dozlarla enfekte edilen yaş grupları ve kontrolleri gözlem altına alındı. Günlük ve 2 haftalık civcivler için deney süresi 8 gün, 1 aylıklar için 9 ve 2 aylıklar için 12 günle sınırlandırıldı. Deney süresince ölmeyen hayvanların bu günlerde ötanazileri yapıldı ve ölen her hayvan için aynı gün 1 adet kontrol açıldı. Yaş grupları ve dozlara göre hayvan sayıları Tablo1'de verildi.

Tablo 1. Yaş grupları ve dozlara göre çalışmada kullanılan hayvan sayıları.

Table 1. The number of animals according to doses and groups of age.

Doz	Gruplar			
	Günlük	2 haftalık	1 aylık	2 aylık
0,05 ml	6	7	7	7
0,1 ml	6	7	7	7
1 ml	6	7	7	7
Kontrol	5	5	5	5
Toplam	23	26	26	26

Histopatolojik inceleme için doku kesitlerinin hazırlanması

Inokulasyon sonrasında belli zamanlarda nekropsileri yapılan civciv ve piliçlerden karaciğer, dalak, akciğer, kalp, böbrek, bursa Fabricius, duodenum, jejunum, sekum, pankreas, bezli mide, kashi mide, kloaka, testis, beyin ve beyincik doku örnekleri alındı. Örnekler %10'luk tamponlu formalinde tespit edildi. Rutin doku takibinden geçirilerek, parafinde bloklandı. Mikrotom ile 5-6 mikron kalınlığında beşer adet kesit alındı. Bu kesitlerin ikişer tanesine hematoksil-eosin (HE), ikişer tanesine immunoperoksidaz boyama (adhesivli lamlara) ve birer tanesine de Brown-Brenn Gram boyama yapıldı (22). Tüm preparatlar ışık mikroskobunda incelendi.

İmmunopatolojik incelemeler için doku kesitlerinin hazırlanması

Hiperimmün serum elde edilmesi: Antijenin hazırlanması ve hayvanın immunizasyonu (tavşan) yapıldı (12). *S. gallinarum* 9 olduğu tespit edilmiş olan standart suşa karşı antiserum tavşanda hazırlandı. Bu amaçla bakteri 37°C'de 24 saat nutrient buyyonda üretildi. Daha sonra nutrient buyyondaki kültürlerden nutrient agara yayma ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkubasyona kaldırıldı. Üreyen kolonilerin saflık kontrolü yapıldıktan sonra bu koloniler %0,85'lik NaCl'de 1-2x10¹⁰ bakteri/ml olacak şekilde süs-

panse edildi. Bir seri tüpte 10 katlı sulandırmalardan nutrient agarlara yayma tarzında ekimleri yapıp üreyen koloniler sayıldı. Bu süspansiyon 94°C'de 3 saat tutularak mikroorganizmalar inaktive edildi.

İmmunizasyon amacıyla 2 adet erişkin Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. İntravenöz olarak 5'er gün aralıklarla bu süspansiyon 0,25 ml, 0,5 ml ve 1 ml kulak venasından inokule edildi. Son inokulasyondan 4 gün sonra tavşanlardan kan alınıp serumları çıkarılarak, kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi. Tavşanda hazırlanmış hiperimmün serum titresi belirlendi (15). İmmunize edilen tavşanlardan alınan kan serumlarında yapılan tüp aglütinasyon testi ile titre 1/100 olarak belirlendi.

İmmunoperoksidaz boyama: Tavşandan elde edilen anti *S. gallinarum* 9 hiperimmün serumu Shandon'un anti-rabbit universal kitlerinden (katalog: 407300/Pittsburg) faydalanılarak avidin biotin peroksidaz (ABC) tekniği ile dokularda *S. gallinarum* antijeni saptanmaya çalışıldı (25).

Deparafinizasyondan sonra, dokuda endojen peroksidaz aktivitesini azaltmak için, kesitler %3'lük H₂O₂'de oda sıcaklığında bekletildikten sonra, normal keçi serumu ile inkubasyona bırakıldı. Primer antikor olarak 1/64 dilasyonunda anti *S. gallinarum* hiperimmün serumunda inkübe edildi. Normal keçi serumu dışında PBS ile yıkanan kesitler önce polivalent sekonder antikor, sonra da streptavidin-peroksidaz ile muamele edildi. Daha sonra kromojen solusyonunda (konsantre bufer solusyonu, %3'lük H₂O₂, konsantre AEC (3-amino-9-etil karbazol) bekletildi. Mayer'in hematoksil-eosin boyasıyla karşıt boyama yapıldı. Her bloktan hazırlanan kontrol kesitleri de aynı işleme tabi tutuldu, ancak primer serum damlatılmadı. Bu şekilde hazırlanan kesitler ışık mikroskobunda değerlendirildi.

Bulgular

Klinik bulgular

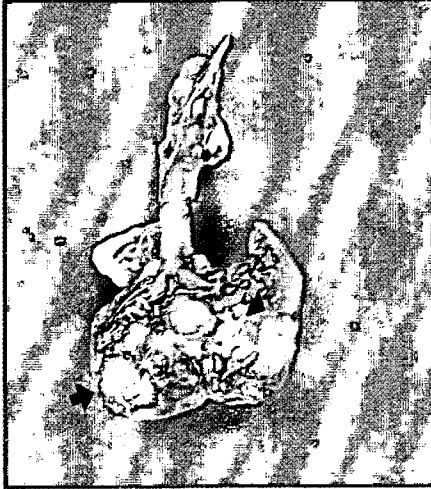
Tüm gruplarda inokulasyondan sonra 3. günde klinik belirtiler başladı. Yem yeme ve su içmede isteksizlik, kanat teleklerinde dökülme, belirgin bir uyku hali, gözlerde kapanma, başın öne eğik vaziyette tutulması, tüylerde kabarma ve ayakta duramama gözlemlendi. Günlük olgularda farklı bir bulgu olarak lateral deviasyon ve tortikollis dik-kati çekiciydi (Şekil 1). Ayrıca, dışkı kanlı ve yapışkandı. İki aylık deneme grubu dışındaki tüm gruplarda solunum güçlüğü gözlemlendi. İlk ölümler günlük, 2 haftalık ve 1 aylık piliçlerde 4. günde, 2 aylık piliçlerde ise 7. günde başladı. Mortalite oranları günlük ve 2 haftalık civcivlerde %95, 1 aylıklarda %86 ve 2 aylıklarda %43 olarak tespit edildi.

Makroskobik bulgular

Günlük civcivlerin A grubu (0,05 ml etken verilen) ve C grubunun (1 ml etken verilen) akciğerlerinin hemen ta-



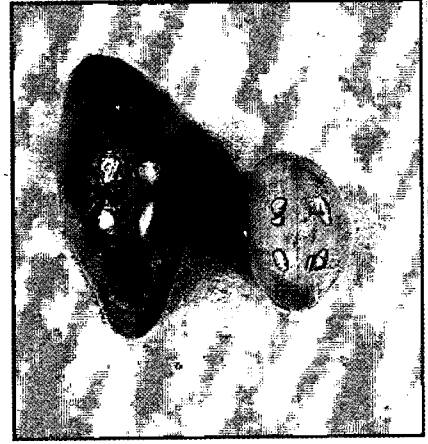
Şekil 1. Günlük civcivler. Tortikollis (sağ), ayakta duramama, yatar veya oturur pozisyonda bulunma (sol).
Figure 1. One-day-old chickens. A. Torticollis (right), weakness, lassitude and somnolence (left).



Şekil 2. Akciğerde nekroz, sarımsak renkte odaklar (oklar).
Figure 2. Lungs with yellowish white foci of necrosis (arrows).



Şekil 3. İki aylık piliç. Karaciğerde kanama alanları (oklar).
Figure 3. Two-month-old chickens. Enlarged liver showing hemorrhages (arrows)



Şekil 4. Dalakta diffüz nekroz odakları (sol). Kontrol (sağ).
Figure 4. Markedly enlarged and mottled spleen with *S. gallinarum* infection (left). Control spleen (right).



Şekil 5. Bezli midede fibrin ve kanamalar (oklar).
Figure 5. Hemorrhage, fibrinous exudate in the mucosa of the proventriculus (arrows).



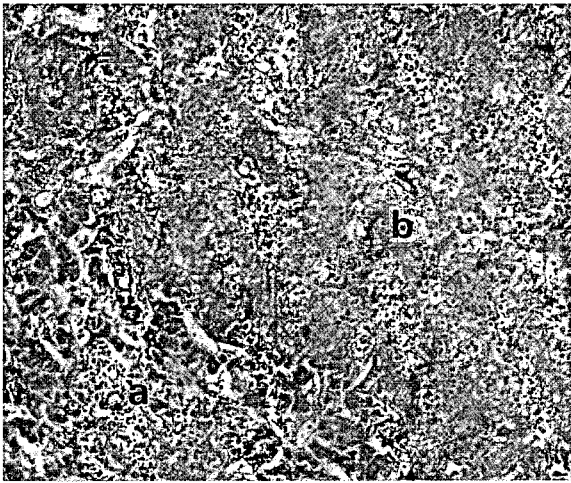
Şekil 6. Günlük civciv. Akciğer paransiminde nekroz odakları (w) ve çok çekirdekli dev hücreleri (oklar), HxE. x100.
Figure 6. One-day-old chick. Small necrotic foci in the lung of infected chick. Central necrotic region is surrounded by zone of giant cells (arrows). HxE. x100.

namında yuvarlak sınırlı, 1-2 cm çapında, değişen büyüklüklerde şekilsiz, sarımtırak-gri renkte, sert kıvamlı odaklara rastlandı (Şekil 2). Karaciğerde günlük olgularda konjesyon, 2 haftalık ve 1 aylık deneme gruplarında ayrıca boz-beyaz renkte, milierden submilierde değişen nekroz odaklarına rastlandı. İki aylık piliçlerin B grubunda (0,1 ml etken verilen) ise bu değişikliklerin yanısıra karaciğer yeşilimtırak-kahverengindeydi ve kanama alanları içeriyordu (Şekil 3). Dalak günlük civcivlerde oldukça açık, beyazımsı sarı renkteydi, 2 haftalık civciv ve 1 aylık piliçlerin A, B grubu ve 2 aylık deneme grubunun hemen tamamında dalak oldukça şişkin, siyahımtırak renkte ve alacalı mermer görünüşteydi (Şekil 4). Geriye kalan olgularda ise dalak sarımtırak renkte ve nekroz odakları içeriyordu. Bursa Fabricius'da günlük, 2 haftalık, 1 aylık grubun bazı olgularında involusyon gözlemlendi. Ayrıca, bursa Fabricius ve kloakada yaygın kanamalara rastlandı. İki aylık grupta ise sadece B grubunda konjesyon gözlemlendi. Sadece bu gruptaki olgularda kalpte hemen tamamı dışarı taşkınlık gösteren topluğne başı büyüklüğünde yoğun odaklara rastlandı. C grubunda bezli mide mukozasında çok yoğun fibrin ve peteşiyal kanamalar dikkati çekti (Şekil 5). Özellikle günlük civcivlerde ve 1 aylık B grubunda sekum mukozasında kanamalara rastlandı. Günlük civcivler hariç tüm gruplarda pektoral kaslarda diffuz kanamaya rastlandı. Bir aylık deneme grubunda böbrek oldukça şişkin ve açık renkteydi. İncelenen diğer organlarda kayda değer makroskopik bulguya rastlanmadı.

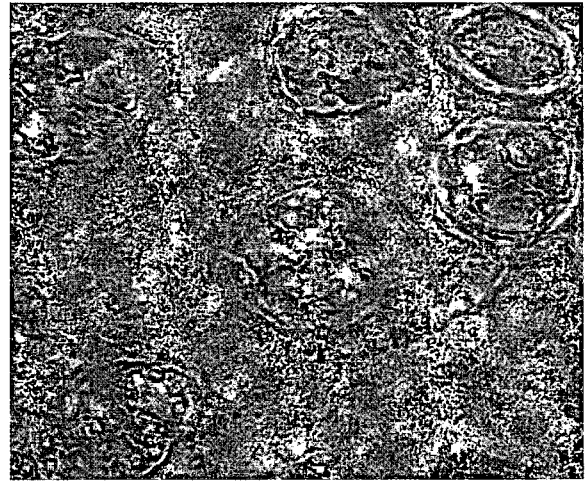
Mikroskopik bulgular

Günlük civcivlerin hemen tamamında akciğer parenşimi çok sayıda nekroz odağı içeriyordu. Bu odakların etrafında çok çekirdekli dev hücreleri, heterofil lökositler

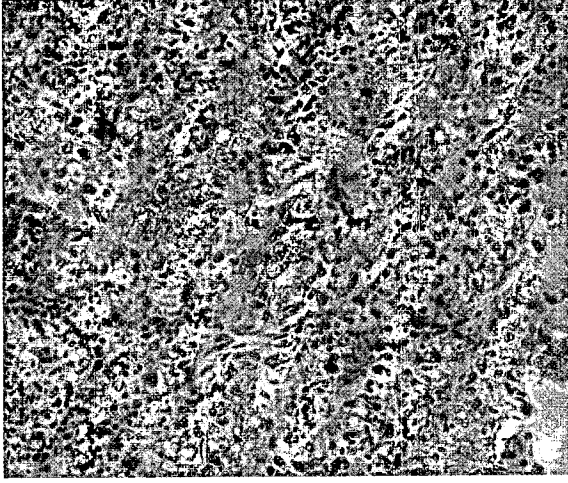
ve makrofajlar, lenfosit ve plazma hücreleri mevcuttu (Şekil 6). Karaciğerde, A grubu ve diğer yaş gruplarındaki olgularda pasif konjesyon ve kanamaya rastlandı. Ayrıca, tüm yaş gruplarının çoğunluğunda diffuz vakuoler dejenerasyon gözlemlendi. Diffuz hepatitis ve koagülasyon nekrozuna 2 haftalık, 1 aylık ve 2 aylık gruplarda rastlandı (Şekil 7). Grupların hemen tamamında dalakta nekroz alanlarıyla günlük olgular hariç diğer gruplarda mononükleer fagositik sistem hücre hiperplazisi dikkati çekti. Kalpte sadece 2 aylık piliçlerin C grubunda myokardiyumda kanama gözlemlendi. Ayrıca, B grubunda subepikardiyal yağ dokusunda şiddetli kanama, kas demetlerinde dejeneratif nekrotik değişiklikler ve bu alanda heterofil lökosit infiltrasyonu, fibrin ağları ve tek tük lenfositlere rastlandı. A grubunda ise hücresel yapıda lenfosit ve makrofaj dikkat çekiciydi. Günlük civcivlerde bursa Fabricius mukoza epitelinde kist benzeri yapılar, foliküllerde nekroz, yoğun kanama (Şekil 8) ve C grubunda foliküllerde vakuoler yapılar, subserozal bağdokuda makrofaj, lenfosit ve plazma hücresi gözlemlendi. Bursal foliküllerdeki vakuoler yapılar bu grupta çok yoğun olarak rastlandı. Bir aylık ve iki aylık gruplarda hücresel yapının tamamen arttığı folikül yapısının yer yer glanduler hale geçtiği dikkati çekti. İki aylık piliçlerin A ve B gruplarında heterofil lökositler yoğunlukta idi. Tüm gruplarda pektoral kaslarda kas demetleri arasında yoğun kanamaya rastlandı. Barsaklarda, günlük civcivlerin C grubunda özellikle sekumda propriya mukozada kanama gözlemlendi. Böbrekte 2 haftalık civcivlerin A ve B grubunda, 1 aylık piliçlerin C grubu ve 2 aylıkların tümünde intertübuler alanda lenfoblastik hücre infiltrasyonu, kanama, tubul epitelinde dejeneratif değişiklikler dikkati çekti. Bezli midede mukoza yüzeyinde



Şekil 7. 2 aylık piliç. Karaciğerde lenfositler hücre infiltrasyonu (a) ve nekroz (b). Hx E. x100.
Figure 7. Two-month-old chicken. Lymphocytic infiltration (a) and coagulative necrosis (b) in liver. Hx E. x100.

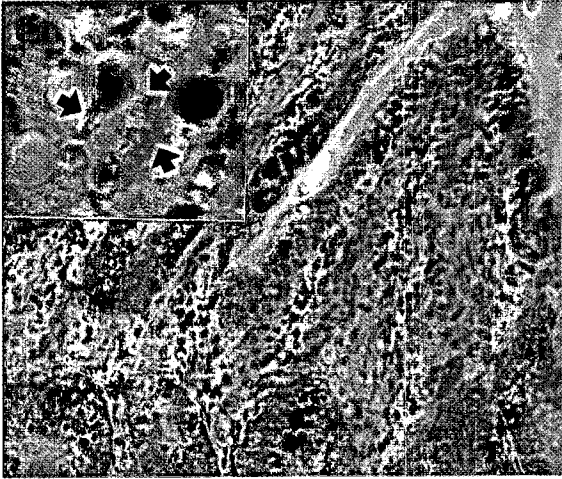


Şekil 8. 2 haftalık civciv. Bursa Fabricius'da geniş kanama ve nekroz alanı. Hx E. x100.
Figure 8. Two-week-old chicken. Hemorrhages and necrosis of bursal follicles. Hx E. x100.



Şekil 9. Günlük civciv. Akciğerde makrofaj ve heterofillerde *S.gallinarum* pozitif reaksiyon. IP/HE. x200.

Figure 9. One-day-old chick. Immunoreactive granules in macrophages and heterophils in the lung. IP/HE. x100.



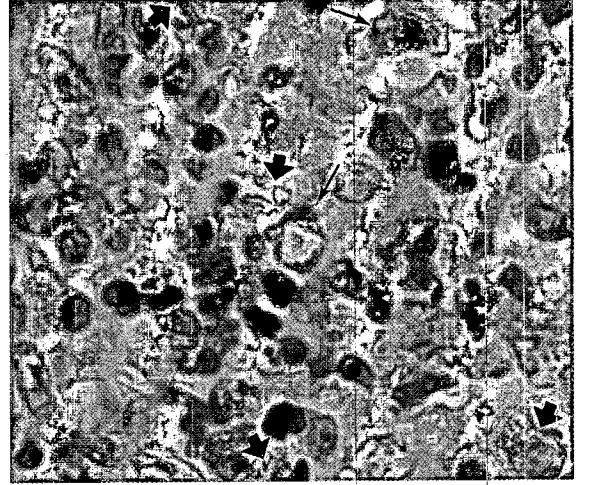
Şekil 10. Günlük civciv. Bağırsak propriya mukozasında nekrotik hücrelerde pozitif reaksiyon (oklar). IP/HE. x100. (üst resim) x1000.

Figure 10. One-day-old chick. Immunopositive reaction in necrotic cells in lower intestine (arrows). IP/HE. x100. (upper) x1000.

nekrotik kitle, propriya mukozada kanama belirgindi. İki aylık piliçlerin C grubunda pankreasda histiositik hücre infiltrasyonu dikkati çekti.

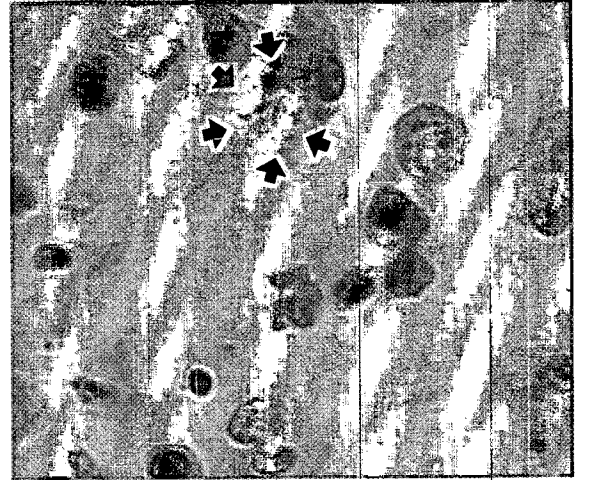
İmmunoperoksidaz bulguları

Günlük civcivlerin tüm gruplarında akciğer, karaciğer, dalak ve barsaklarda immunopozitif reaksiyon gözlemlendi. Akciğerde nekroz alanı ve çevresinde piknotik hücreler ile makrofajlar arasında, ayrıca makrofaj sitoplazmalarında immunoreaktif granüller dikkati çekti (Şekil 9). Karaciğerde hepatositlerde, dalakta nekrotik foliküllerde hücre içi ve dışı pozitif reaksiyon gözlemlendi. Barsaklarda propriya mukozadaki nekrotik hücrelerde ve hücre dışında immunopozitif reaksiyon dikkati çekti (Şekil 10). Bursa



Şekil 11. Günlük civciv. Bursa Fabricius'da makrofaj sitoplazmalarında (ince oklar) ve hücre dışında immunopozitif reaksiyon (kalın oklar). IP/HE. x1000.

Figure 11. One-day-old chick. Immunopositive reaction in the cytoplasm of macrophage (thin arrows) and out of cells (thick arrows). Bursa Fabricius. IP/HE. x1000.



Şekil 12. Makrofaj sitoplazmasında Gram-negatif *S.gallinarum*'lar (oklar). Brown-Brenn Gram. x1000.

Figure 12. Gram-negative *S. gallinarum* in the cytoplasm of macrophages (arrows). Brown-Brenn Gram. x1000.

Fabricius'da nekrotik bursal foliküllerde ve interfoliküler alanlarda hücre içi ve hücre dışı immunopozitif reaksiyon dikkati çekti (Şekil 11). Bununla birlikte, B grubunda bursa Fabricius'larda da immunopozitif granüllere rastlandı. İki haftalık civcivlerde de bu organlarda immunopozitif reaksiyon dikkati çekti. Bir aylık piliçlerde ayrıca böbrek tubul epitel hücrelerinde immunopozitif granüllere rastlandı. İki aylık piliçlerde ise C grubunda bezli midede mide mukozasında fibrin ve piknotik hücreler arasında hücre dışı, heterofil lökositlerde hücre içi immunopozitif boyanma dikkati çekti. Brown-Brenn Gram boyama yöntemi ile Gram-negatif *S. gallinarum*'lar dalakta makrofaj sitoplazmalarında (Şekil 12) bursa Fabricius'da bursal foliküllerde gözlemlendi.

Tartışma ve Sonuç

S. gallinarum enfeksiyonunun genç, gelişmekte olan ve erişkin kanatlılarda hastalık oluşturduğu iyi bilindiğinden (27), bu çalışmada günlük, 2 haftalık, 1 aylık ve 2 aylık olmak üzere değişik yaş gruplarında dört deneme grubu oluşturuldu.

Intraperitoneal olarak *S. gallinarum* ile enfekte edilen 7 günlük civcivlerde mortalite oranının %79,7-%94,4 gibi çok yüksek olduğu ve ırklar arasında çok az farklılık bulunduğu saptanmıştır (21). Bir günlükten 4 haftalığa kadar olan civcivlerde mortalite oranının %2,1'den %78,3'e kadar değiştiği ve yaygın mortalitenin 1-5 günlük civcivlerde görüldüğü bildirilmiştir (19). Bu çalışmada günlük ve 2 haftalık civcivlerde yaklaşık %95, 1 aylık piliçlerde %86 ve 2 aylık piliçlerde %43 oranında mortaliteye rastlandı. Sepsisemik hastalığa neden olan tavuk tifosunun mortalite oranının orta derecede ya da yüksek olması etkenin virulensine bağlanmıştır (24). Mevcut çalışmada günlük ve 2 haftalık civcivlerde bu oranı yaklaşık eşit olması, buna karşılık 1 ve 2 aylıklarda gittikçe azalması, hayvanların bireysel duyarlılığı ve etkenin virulensi yanında yaşın da etkili bir faktör olduğunu düşündürdü.

Akut olaylarda hastalığın ilk klinik bulgusu, yem tüketiminde ve su içmede azalmayı takiben mortalitedeki hızlı artış olarak kaydedilmiş, kanat teleklerinde dökülme, belirgin bir uyku hali, gözlerde kapanma, bir araya toplanma ve yeşilimsi-sarı renkte diyare hastalığın karakteristik bulguları olarak bildirilmiştir (2,3,11,18,27). Bununla birlikte, hastalığın ilerlemesiyle hızla kilo kaybı geliştiği ve bazı hayvanlarda dışkıda kana rastlandığı gözlenmiştir (1,8,20). Mevcut çalışmada, günlük civcivlerin A ve C grubu, 1 aylık piliçlerin C grubunun bazı olgularında kanlı ishalin ortaya çıkması, etkenin patojenitesini ve yaşın önemini ortaya koymaktadır. Diğer bir ifadeyle hastalıkta, hayvanların immun sisteminin gelişmemiş olmasının önemli olduğu açıktı. Aynı zamanda, farklı doz gruplarında kanlı ishalin ortaya çıkması ise, genç hayvanlarda dozun fazla önemi olmadığını ya da çok az önemi olduğunu düşündürdü.

Bıldırcınlarda yapılan deneysel çalışmada (4) baş ve boyunda lateral deviasyon, hiperekstabilite ve felç gibi sinirsel semptomlar gözlenmiştir. Tavuklarda benzer bulgulara ilgili herhangi bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. Mevcut çalışmada ise günlük civcivlerde benzer sinirsel semptomlar gözlendi. Dolayısıyla bu semptomların, *S. gallinarum* ile enfekte civcivlerde de ortaya çıkan bir bulgu olarak değerlendirilebileceği düşünülebilir. Çalışmadaki dikkati çekici bulgulardan birisi de günlük civcivlerin akciğerlerindeki nekroz odaklarının çevresinde görülen çok çekirdekli dev hücreleri oluşumlarıydı. Yapılan literatür ta-

ramalarında doğal veya deneysel *S. gallinarum* enfeksiyonlarında çok çekirdekli dev hücreleri oluşumlarına ilgili bildirimle rastlanmadı (24,27). Hastalığın kolaylıkla karıştığı *S. pullorum* enfeksiyonunda akciğerde pyogranülomatöz pnömoni tanımlaması yapılması (9) ve her iki enfeksiyonda akciğer lezyonlarının *Aspergillus* ve diğer mantar enfeksiyonlarına benzerliği de (27) düşünülürse, bu dev hücreleri oluşumlarının yabancı cisim dev hücreleri olarak tanımlanmasının doğru olacağı kanısına varıldı. Karaciğer ve dalakta ortaya çıkan şişkinliğin Gram-negatif bakteriyel enfeksiyonun komplikasyonu olarak eritrosit yıkımı ve birikimine bağlı mononükleer fagositik sistem aktivitesinin stimülasyonu sonucu olduğu kanısına varıldı.

Deneysel olarak oluşturulan enfeksiyonda akut kroniğe değişen bulgular bildirilmiş ve akut olgularda, pektoral kaslarda diffuz konjesyon gözlenmiştir (28). Çalışmada da günlük civcivler hariç tüm gruplarda benzer bulgu gözlendi. Hastalığın kronik fazında kalp, bağırsak, pankreas ve karaciğerde proliferatif lezyonlar bildirilmiştir (24,27,28). Kalpte başlangıçta şekil bozukluğuna neden olan nodüller, ileri aşamalarda perikardiyal boşlukta sarı opak sıvı ve kalp yüzeyinde kalın bir fibrin tabakası olarak gözlenmiştir. Karaciğer, myokard, pankreas ve bağırsaklarda gri-beyaz renkte milier odaklara rastlanmıştır (24). Mevcut çalışmada, benzer bulgu kalpte sadece 2 aylık grubun B ve C olguları, karaciğerde ise deneme gruplarının tamamında dikkati çekti. Kalp bulgularının ortaya çıkmasında, diğer bir ifadeyle hastalığın kronik faza ilerlemesinde etkenin patojenitesi yanında yaş ve dozun önemli olduğu düşünülebilir.

Mikroskopik olarak, akut olgularda karaciğerde hepatitis, şiddetli yağ distrofisi, küçük nekrotik odaklar ve lenfosit infiltrasyonu bildirilmiştir (20). Mevcut çalışmada, karaciğerde deneme gruplarının tamamında pasif konjesyon ve diffuz vakuoler dejenerasyon gözlendi. Diffuz hepatitis ve koagülasyon nekrozuna 2 haftalık, 1 aylık ve 2 aylık gruplarda rastlandı. Bu durum, özellikle immun sistemin gelişmediği günlük civcivlerde enfeksiyonun sepsisemik karakterde geliştiği, 2 aylık grupta ise immun sistemin gelişimiyle kronik faza girdiğini düşündürdü.

Hastalığın kronik formunda gözlenen karakteristik mikroskopik bulgunun kalp kası tellerinin nekrozu şeklinde olduğu bildirilmiştir (19,27). Kalp lezyonlarının yapı olarak hücre karakterde infiltrasyon odakları olduğu, başlıca stem ve retiküler hücrelerin bulunduğu, ancak mononükleer, heterofil ve fibroblastların da görüldüğü dikkati çekmiştir (28). Myokardiyumda hiperemi ve lenfoblastik hücre infiltrasyonu gözlenmiştir (20). Bu çalışmada ise, 2 aylık piliçlerin C grubunda myokardiyumda kanama gözlendi. B grubunda ayrıca, subepikardiyal yağ dokusunda

şiddetli kanama, kas demetlerinde dejeneratif-nekrotik değişiklikler ve bu alanda yoğun heterofil lökosit infiltrasyonu, fibrin ağları ve tek tük lenfosit rastlandı. C grubunda ise hücresel yapıda lenfosit ve makrofaj dikkat çekiciydi. Bursa Fabricius'da bursal folliküllerde medulla ve korteksi ayıran küboidal hücre metaplazisi ve buna eşlik eden hücre kaybı bildirilmiştir (17). Çalışmada ise, bunların yanında yaygın kanama alanlarının gözlenmesi ve immunoperoksidaz tekniği ile etkenin yüksek pozitif demonstrasyonu bu organın alınganlığını ortaya koymuştur

Sonuç olarak, immunohistokimyasal teknikler formalinle tespit edilmiş ve parafine gömülmüş doku kesitlerinde enfeksiyon etkenlerinin saptanmasında, daha da önemlisi enfeksiyon etkenlerinin dokulardaki kesin lokalizasyonunu gösterdiği için ayrıntı tanıda çok önemli bir yere sahiptir. Günümüzde çoğu hastalık etkeninin dokulardaki lokalizasyonu bu teknik sayesinde kısa zamanda ortaya konabilmektedir (23). Ancak, *Salmonella gallinarum*'un immunohistokimyasal teşhisine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada uygulanan immunoperoksidaz teknik ile hastalık etkeninin enfeksiyonun değişik aşamalarında ve çeşitli vücut dokularında (günlük civcivlerde özellikle akciğer ve bağırsaklarda, diğer yaş gruplarında ise bursa Fabricius, karaciğer ve dalakta) kısa zamanda ortaya konabileceği ve bu açıdan gerekli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *S. gallinarum*'un aynı serogrup içerisindeki *S. pullorum*'a klinik, makroskopik ve mikroskopik yönden benzerliği de göz önüne alındığında, tanıda immunoperoksidaz boyama metodunun önemi ortaya çıkmaktadır.

Teşekkür

Çalışmada kullanılan SPF embriyolu tavuk yu-murtası, civciv ve piliçlerin temin edildiği Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma Enstitüsü ile günlük civciv elde etmek amacıyla kullanılan Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Kuluçkahanesi'ne ve *Salmonella gallinarum* 9 suşunun temin edildiği Dr. Paul A. Barrow'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Allan D, Duffus WPH (1971): *The immunopathology in fowls (Gallus domesticus) of acute and subacute Salmonella gallinarum infection*. Res Vet Sci, **12**, 140-151.
- Assoku RKG, Penhale W, Buxton A (1970): *An immunological basis for the anemia of acute Salmonella gallinarum infection of chicken. 1. Haematological changes and their association with in vivo modification of the erythrocytes*. Clin Exp Immunol, **7**, 865-874.
- Assoku RKG, Penhale W, Buxton A (1970): *Haematological changes in acute experimental Salmonella gallinarum infection in chickens*. J Comp Path, **80**, 473-485.
- Awaad MHH, Hafez HM, El-Dimerdash MZ, Krauss, H (1981): *Some epidemiological aspects of Salmonella gallinarum infection in Japanese quail (Coturnix coturnix japonica)*. Zbl Vet Med B, **28**, 704-712.
- Aydın N, Arda M (1991): *Kanatlılarda salmonellozis sorunu ve kontrol yöntemleri*. Uluslararası Tavukçuluk Kongresi 91. s. 300-308. 22-25 Mayıs 1991, İstanbul.
- Barrow PA (1990): *Immunity to experimental fowl typhoid in chickens induced by a virulence plasmid-cured derivative of Salmonella gallinarum*. Infect Immun, **58**, 2283-2288.
- Bauzoubaa K, Nagaraja KV, Newman JA, Pomeroy BS (1987): *Use of membrane proteins from Salmonella gallinarum for prevention of fowl typhoid infection in chicken*. Avian Dis, **31**, 699-704.
- Beaudette FR (1925): *The possible transmission of fowl typhoid through the egg*. J Am Vet Med, **67**, 741-745.
- Buchholz PS, Fairbrother A (1992): *Pathogenicity of Salmonella pullorum in northern bobwhite quail and mallard ducks*. Avian Dis, **36**, 304-312.
- Bumstead N, Barrow PA (1993): *Resistance to Salmonella gallinarum, S. pullorum, and S. enteritidis inbred lines of chicken*. Avian Dis, **37**, 189-193.
- Buxton A (1960): *Pathological changes in the blood of chickens infected with Salmonella gallinarum*. J Comp Path, **70**, 308-325.
- Cameron CM, Fuls WJP, Van Reenen L (1972): *Characterization of eight rough mutants of Salmonella gallinarum*. Onderstepoort J Vet Res, **39**, 139-146.
- Das MS, Chakravorty MB, Ghos GK (1959): *Occurrence of avian salmonellosis in west Bengal*. Ind Vet J, **36**, 402-408.
- El Sergany MA, Mohammed MA (1973): *Pathologische befunde der ovarien natürlich und künstlich infizierter hühner (Salmonella gallinarum-pullorum)*. Vetmed Crichton Fak Univ Cairo, Agypten., **3**, 229-235.
- Esendal ÖM, Akay Ö, İzgür M, Keskin O (1995): *Tavuk tifosunun indirekt tanısında plate test, Rose Bengal plate test, tüp ve mikroaglutinasyon testlerinin kullanılması*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **42**, 31-36.
- Garren HW, Barber CW (1955): *Endocrine and lymphatic gland changes occurring in young chickens with fowl typhoid*. Poultry Sci, **34**, 1250-1258.
- Gast RK (1997): *Salmonella Infections. Introduction*. 81-82. In: BW Calnek, HJ Barnes, CW Beard, LR McDougald, YM Saif (Eds), Disease of Poultry. Iowa State University Press, Iowa.
- Jordan FTW, Pattison M (1996): *Poultry Diseases*. WB Saunders Company Ltd, London.
- Kaushik RK, Singh J, Kumar S, Kulshreshtha RC (1986): *Fowl typhoid in a few poultry farms of Haryana state*. Ind J Anim Sci, **56**, 511-514.
- Kokosharow T, Hristow H, Belchev L (1997): *Clinical, bacteriological and pathological studies on experimental fowl typhoid*. Indian Vet J, **74**, 547-549.

21. **Lambert WV** (1932): *Natural resistance to disease chickens. I. The effect of selective breeding on natural resistance to fowl typhoid.* J Immunol, **23**, 299-300.
22. **Luna LG** (1968): *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology.* McGraw-Hill, New York.
23. **Mcrill CM, Kramer TT, Griffith, RW** (1984): *Application of the peroxidase-antiperoxidase immunoassay to the identification of Salmonella from pure culture and animal tissue.* J Clin Microbiol, **20**, 282-284.
24. **Pomeroy BS** (1984): *Fowl Typhoid.* 79-91. In: MS Hofstad, HJ Barners, BW Calnek, WM Reid, HW Yoder Jr, (Eds), *Diseases of Poultry.* Iowa State University Press, Iowa.
25. **Porter RE, Holt PS** (1993): *Effect of induced molting on the severity of intestinal lesions caused by Salmonella enteritidis infection in chickens.* Avian Dis, **37**, 1009-1016.
26. **Rao SBV, Narayanan S, Rammani DR, Das J** (1952): *Studies on Salmonella gallinarum.* Indian J Vet Sci Anim Husb, **22**, 199-208.
27. **Shivaprasad HL** (1997): *Pullorum Disease and Fowl Typhoid.* 82-96. In: BW Calnek, HJ Barnes, CW Beard, LR Mcdougald, YM Saif (Eds), *Disease of Poultry.* Iowa State University Press, Iowa.
28. **Smith HW** (1955): *Observations on experimental fowl typhoid.* J Comp Path, **65**, 37-54.
29. **Smith HW, Tucker JF** (1980): *The virulence of Salmonella strains for chickens: their excretion by infected chickens.* J Hyg, **84**, 479-488.

Geliş tarihi: 14.10.2002 / Kabul tarihi: 05.11.2002

Yazışma adresi:

Dr. Latife Beyaz

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Patoloji Anabilim Dalı, Kayseri