

INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS

Mübeccel YUMUŞAK (*)

Tanımı :

Kimyasal Yapısı :

İnfeksiyöz Laringotracheitis, kanatlılarda özellikle daha çok tavuk ve sülünlerde larenks ve trachea'nın yangısıyla ortaya çıkan, solunum güçlüğü ve ağızdan kanlı bir exudatın çıkmasıyla karakterize akut ve bulaşıcı bir solunum yolu hastalığıdır (2, 6, 7).

Tarihçesi :

Hastalık ilk olarak 1925 yılında tanıtılmıştır. Ancak bazı raporlar onun varlığının çok daha erken bulunduğunu açıklamaktadırlar. Hastalık, daha önceki araştırmacılar tarafından Infectious Bronchitis olarak isimlendirilmişse de 1931 yılında, Amerikan Veteriner Medikal Association tavuk hastalıkları özel komitesi tarafından Infectious Laryngotracheitis olarak değiştirilmiştir (7).

Hastalığın çıktığı ve yayıldığı yerler :

Laryngotracheitis 1925 yılında Kanada, 1929 Hollanda, 1935 Britanya ve Avusturalya, 1940 İsveç, 1948 Polonya, 1959 Almanya, 1965 Avusturya ve Finlandiya, 1973 Küba ve 1982'de de Mısır'da Hastalık ilk olarak tesbit edilmiştir.

Yurdumuzda yapılan çalışmalarda zaman zaman hastalığın bazı işletmelerde görüldüğü bildirilmektedir (2, 7, 11, 13, 15, 16, 18).

Etiyoloji :

İnfeksiyöz Laringo tracheitis etkeni, Herpes- A grubundan ILT virüsüdür. Herpes grubu virusların bütün karakterlerini taşımaktadır.

(*) Etlik Hay. Hast. Araşt. Enst. Uzman Vet. Hek.

Morfoloji :

ILT virusu ile enfekte edilmiş tavuk embryo hücre kültürlerinde virusun elektron mikrofasi Herpes simplex virus yapısına benzediğini göstermiştir.

Virus küboidal şekilde ve ikosahedral viral partiküller halindedir. Vironlar hegzagonal yapıda 80-100 mμ'dur. Kapsidleri ikosahedral simetri ve 162 kapsomerden teşekkül etmiştir. Tam virus partikülü nükleokapsidi saran irregüler bir zara sahiptir. Ve çapı 195-250 mμ olur (7, 17).

Kimyasal Yapısı :

Herpes grubu virusların nükleik asit yapısı DNA'dır. ILT viral DNA'nın yoğunluğu 1,704 g/ml olup, diğer herpes viruslarının DNA'larıyla uyum sağlar. ILT virusunun kimyasal yapısı henüz tam olarak aydınlığa kavuşmamıştır. Ancak araştırmalar Herpes Simplex virusunun kapsidinin bir spesifik protein olduğunu göstermiştir (7).

Virusun Replikasyonu :

ILT virusunun replikasyonu, Herpes Simplex ve Yalancı Kuduz viruslarına benzerler.

Enfeksiyon Laringotrahitis virusunun hücre yüzeyine adsorbe olmasıyla başlar. Viral giriş hücrede pinositozisle meydana gelir. Adsorpsiyon hücre sistemi ve inokulun miktarı ile değişmektedir. Bazı araştırmacılar zarflı herpes simplex virus partiküllerinin, çıplak nükleokapsidlerden daha kolayca adsorbe olduğunu gözlenmişlerdir. Zar ve kapsid, hücre nükleusuna, geçeden DNA salgılayan konakçı anzimleri tarafından tahrip edilerek yeni bir ILT viral komponentin meydana gelmesine yardım ederler. Yeni bir ILT viral komponentin ilk bulguları yaklaşık 10-12 saatte belirmeye başlamaktadır.

Girişi tamamlanmış nükleokapsidler, zarf şeklinde hücrenin nüklear membranına geçerek stoplazmada bir vakuolar membranda birikirler. Viral partikülleri kapsayan vakuoller plazma membranına doğru hareket eder ve hücre duvarı aralıklarından geçerek yüzeyde virusu saklarlar (7).

Fiziksel ve Kimyasal Etkenlere Karşı Dayanıklılığı :

Laringotracheitis virus partikülleri, lipolitik ajanlara, ısı ve bazı dezenfektanlara karşı duyarlıdır. Virus 24 saat etere maruz bırakıldığında enfektivitesini kaybeder. —20 ve —60°C'de Liyofilizasyonda uzun zaman canlı kalabilir. Buna karşılık 55°C'de 10-15 dakikada harab olurlar.

Et suyunda 38°C'de 48 saat'te ölürlür.

Bir tavuk kadavrasının trehal dokusunda virus 37°C'de 44 saatte veya CAM'da 25°C'de 5 saatte canlılığını kaybederler. % 3 krezol solüsyonunda virus 1 dakikadan daha az bir zamanda inaktive olurken Trehal exudattaki virus % 01 formol ve % 5 fenol solüsyonunda 24 saatte ölür. Bunlardan ayrı olarak virus pH'sı 7,4 olan % 50 gliserinli suda 37°C'de 7-14 gün, 16-24°C'de 35-42 gün, 4-10°C'de 217 gün canlılığını korumaktadır (2, 6, 7, 17).

Suşun Klasifikasyonu :

Nötralize olma kabiliyetindeki bazı varyantlar farklı patojenitedeki suşlar arasında gösterilmiş olmasına rağmen farklı immünolojik suşlar izole edilememiştir. Bazı araştırmacılar 1953'te akut laryngotracheitisli bir hayvandan izole edilmiş bir virus suşundan bahsetmişlerdir. Bu suş birtakım ILT virus suşlarına karşı hazırlanmış antiserumlarla nötralizasyona tamamen dirençli bulunmuştur. Yine bazı araştırmacılar hastalığın sadece yumuşak şekline neden olan ILT virus suşlarını araştırdılar ve izole ettiler.

ILT virusunun bazı suşları değişik patojenite göstermektedir. Bir kısım suşlar çok hafif klinik septomlar oluşturarak hastalık yaparken bir kısım suşların patojenitesi de oldukça yüksektir (7, 17).

Bu yıl yapılan bir çalışmada Kotiv ve arkadaşları bir klonel DNA iplikçığı kullanarak DNA = DNA hibridizasyonu ile ILT virusunun virulent ve avirulent suşlar arasındaki farklılıklarını ayırt etmişlerdir (12).

Patojenesis ve Epizootioloji :

Doğal, ve Deneysel Konakçılar :

ILT virusuyla etkilenen ilk doğal konakçılar tavuklardır. Hastalık hernekadar tavukların bütün yaş gruplarında meydana gelir-

sede ençok karakteristik bulgular yetişkin tavuklarda tesbit edilmiştir. Bazı raporlar, sülünler ve sülün-tavuk melezlerinde ILT'nin bir şeklini bildirmektedirler. Son zamanlarda bir kısım araştırmacılar laboratuvarında üretilmiş ILT suşu ile genç hindileri enfekte etmeyi başarmışlardır.

Hatta tavuskuşunun trehasından bile araştırmacılar ILT virus izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir (17).

ILT virusuna duyarsız olarak görünen özel kanatlılar sığırcık kuşu, serçe, karga, kumru, ördek, güvercin ve Afrika hindisidir. Fakat Wattanabe ve Ohmi (1983) isimindeki araştırmacılar ILT-NS-175 suşu ile nazal veya trahal olarak Afrika hindilerini enfekte etmeyi başarmışlardır (19).

Bunlardan başka tavşan, kobay ve beyaz ratlar gibi deney hayvanlarının ILT virusuna karşı duyarsız olduğu açıklanmaktadır (7, 6).

Hindi ve tavukların embriyolu yumurtalarının duyarlı olmasına rağmen, ördek, güvercin ve Afrika Hindisi etkilenmez.

1985'de Hıllbink adındaki bir araştırmacı tavuskuşu ve sülünlerin duyarlı olduğunu fakat kanarya, Avusturalya muhabbet kuşları ve Japon bıldırcınlarının dirençli olduğunu ortaya koymuştur (9).

Bulaşma :

Virusun doğal olarak giriş yolları üst solunum sistemi ile intra oküler yoldur. Ağız yoluyla bulaşma görülmemiştir (7).

Bulaşma, direkt temastan ziyade hastalığı klinik olarak geçirmiş portör kanatlılarla akut olarak enfekte olmuş kanatlılardan daha kolay meydana gelir. Hatta virus hastalığı geçirmiş tavukların tracheal dokularından 2 yıl sonra bile izole edilebilmiştir. ILT virusu portör hayvanların yaklaşık % 2'sinde tesbit edilmiştir. İnokülasyondan 11 gün sonra, aşılınmış kanatlılardan ILT virusu elde edilememiş olmasına rağmen aşılınmış ve aşılınmamış kanatlılar arasındaki temasla saha salgınlarının ortaya çıkışı ILT virusunun aşılınmış tavuklar tarafından daha uzun bir zaman bulaşmayı oluşturduğunu ortaya koymuştur. Daha önce ILT ile aşılınmış kanatlılar duyarlı piliçlerden ayrılmadığı taktirde ILT enfeksiyo-

nunun bir çiftlikte tekrar nüksedebileceği bildirilmektedir (2, 7, 13, 17).

Minbay ve arkadaşları (1977), Ankara yakınında bir tavukçuluk işletmesinde yaptıkları deneysel çalışmalarda ILT'yi tesbit ederek hastalığın epizootolojisini incelemişlerdir.

Direk temas ile bulaştırma denemelerinde başarılı olmuşlardır. Bunun için hastalığın tipik klinik septomlarını gösteren iki tavuğun, 5 adet Newhampsire tavuk ile biraraya konulmasından 7-8 gün sonra Newhampsire tavukların hepsinde klinik septom belirmeye başlamıştır. Enfekte tavuklardan ikisi ölmüş, diğerleri 3 hafta içinde iyileşmiştir (13).

Hastalık daha çok sonbahar ve kışın görülür. Solunum sistemini etkileyen çeşitli stresler, vitamin ve iz mineral eksiklikleri, özellikle A-a vitaminosis, dengesiz beslenme, hastalığın çıkış ve yayılımını etkileyen nedenler arasında sayılabilir (2, 7, 13, 17).

İnkubasyon Periyodu :

Doğal enfeksiyonlarda, kuluçka süresi 6-12 gün arasında değişir. Enfektif materyalin, trahal inokulasyonundan sonra ise, semptomlar 2 ve 4 gün gibi kısa bir sürede meydana gelir.

Duyarlı tavuklarda kolayca yayılan hastalığın epizootik formu, sürülerin % 90 - 100'ünde etkilidir. % 5'den % 70'e kadar değişen mortalite, genellikle, ortalama % 10 ve % 20 arasındadır. Fakat şiddetli enfeksiyonlarda mortalite yüksektir. (3, 5). Tantawi ve arkadaşları, 1983'te yaptığı bir çalışmada Mısır'da meydana gelen bir salgında, mortalitenin, % 19-8'e kadar çıktığını kaydetmişlerdir. Mortalite, hastalığın sakin şeklinde, 2 haftalıklarda iyileşmeyle düşmüştür (16).

Bulgular :

Hastalık her yaşta tavuklarda görülürse de genel bir kural olarak piliç ve yumurta sürülerinde daha çok görülmektedir. Enfeksiyon akut ve hafif olarak iki klinik formda seyreder.

Akut seyirli enfeksiyonda, hastalık meydana geldikten 6-10 gün sonra en önemli belirtiler olarak öksürük, hırıltı ve solunum güçlüğüdür.

Hayvanlar çömelmiş vaziyette otururlar. Ekspirasyon sırasında ayakları üzerine çöküşü ve başını eğişi, inspirasyon sırasında, başını kaldırarak ileri ve yukarı uzatıp ağzını açarak solunumunu kolaylaştırmaya çalışması çok tipiktir. Şiddetli salgınların başlangıcında birkaç hayvanın gözünden akıntı gelmesi ve 1-2 piliç ölümleri olabilir. Hastalık ilerledikçe, öksürük ve solunum güçlükleri artar. Her öksürme sonunda, trachia'dan kanlı ve müköz bir exudat atılır. Kümes duvarları ve ekipmanın kanla bulaşık oluşu dikkati çeker. İbik ve sakallar, çoğunlukla mor renktedir. Genel bir iştahsızlık ve yumurtlayan hayvanlarda % 30-40 kadar verim düşüklüğü görülür. Verimde düşüklük genellikle hastalığın dördüncü günü başlar ve 18. güne kadar devam eder. 30 gün sonra tekrar normal düzeye erişir.

Hafif seyirli enfeksiyonlarda hayvanlar gelişemez, yumurta verimi düşer, konjunktivitis infraorbital sinüslerde şişkinlik, inatçı burun akıntısı, gözyaşı akıntısı dikkati çeken bulgular arasındadır. Klinik bulguların göstermiş olduğu morbidite % 5 kadar düşüktür.

Hastalığın seyri enfeksiyonun şiddetine göre değişmekle beraber çoğunlukla 10-14 günde tavuklar tekrar iyileşebilirler. Fakat ortalama 1-4 hafta olarak rapor edilmiştir (2, 6, 7, 17).

Lezyonlar :

Lezyonlar en iyi tracheal ve laringeal dokularda gelişir. Şiddetli öksürük ve konvulsive solunum esnasında kan pıhtısı ve epitel doku dökülmeleri meydana gelir. Trahalümeni, kan pıhtıları, müköz, kazeöz ve sarımtırak bir exudat ile devamlı doludur. Eski olmuş olaylarda bu exudat kazeifiye olur ve trahayı tıkar. Traha ve larenkste hemorajiler vardır. Ölüm trahanın tıkanmasıyla asfeksiden meydana gelir.

Konjunktiva ve infraorbital sinüslerin epitelyumunun konjesyon ve ödemi, daha az patojenik enfeksiyonların bazısında gözlemlenmiş tek lezyon olabilir (2, 6, 7, 17).

Histopatoloji :

Histopatolojik bulgular hastalığın gelişme devrelerine göre değişik ve oldukça tipiktir. Trachia mukozasında ödem ve hücre infiltrasyonu, kanamalar hastalık ilerledikçe epitel hücrelerin dökül-

meleri ve yapılarının bozulması ve hücre çekirdeği içinde inklüzyon cisimciklerine raslama tipik histopatolojik bulgular halinde özetlenebilir (6).

Hayashi ve arkadaşları (1985)'te ILT virusu ile tavukları enfekte ederek traha mukozasının patolojik değişimlerini incelemişlerdir. Burada ILT virusu ile 19 haftalık tavuklar posterion torasik hava kesesi yoluyla inokule edilir. Bu tavuklar 16 gün aralıklarda öldürülerek tracheaları ışık ve elektron mikroskopta incelenir. Dikkati çeken patolojik bulgular kadeh hücrelerinde hypertrophi ve hyperplazi'dir. 3 gün sonra epithelial hücreler eriyerek çok miktarda intranükleer inklüzyon cisimciklerini içeren sinsitia formuna dönüşür. Daha sonra sinsitaller dökülür ve bağ doku açığa çıkar. Bunu takiben bağ doku yüzeyinde aşınmalar meydana gelir. Ve serofibrinoz bir exudat birikerek bir pseudomembran görünümünü alır. 5. günde, kalan epithelial hücreler pseudomembranın harap ettiği mukozayı tamir etmeye başlar. 6. günde mikrovilluslardan zengin yenilenmiş epithelial hücreler ortaya çıkar. 8. günde epithelial hücreler bol miktarda çoğalarak tabakalaşır. 16. günde trahal epitelyum cilia ile kaplanır ve onun normal histolojik görünümünü yeniden kazanır (8).

Ayırıcı Teşhis :

ILT, infeksiyöz bronşitis, newcastle ve fowl pox gibi akut solunum yolu hastalıkları ile karışabilir. İnfeksiyöz bronşitis yumurta üretimine olan etkisi bakımından ILT'den daha etkilidir. Mortalite ILT'de Newcastle'den daha fazladır. Bütün kanatlılarda Newcastle disease ve infeksiyöz bronşitisle 24-48 saat içinde etkilenme vardır.

ILT bütün sürüye çok yavaş yayılır ve tavuk çiçeğine özellikle difteritik şekline benzetilebilir. Bunu ayırt etmek için traha epitelinin histopatolojik muayenesi, yumurta inokulasyonu veya duyarlı tavukların inokulasyonundan yararlanılabilir (2, 6, 17).

İmmunite :

ILT virusuna karşı duyarlı tavukların dirençliliği aşılama veya doğal enfeksiyonu takiben değişir. Doğal bir enfeksiyondan meydana gelen rezistansın süresi genellikle bir yıl veya daha fazladır. Aşılama ile kazanılan bağışıklık ise 6 haftadan 1 yıla kadar uzun

bir süre için değişiklik gösterir. Bağışıklık, aşısındaki aktif virusun konsantrasyonu, uygulama yolu ile ve virus suşu ile değişir. Bazı araştırmacılar memnuniyet verici bir bağışıklık elde edebilmek için ml'inde 10^2 Embryo plak form Unit'ten daha fazla içermesi gerektiğini bildirdiler.

Pasif bağışıklık hiperimmün serum uygulamasıyla anlaşılabilir. İnfeksiyondan 44 saat sonra intratracheal olarak verilen immün serum ILT bulgularını önlemektedir (7).

Teşhis :

ILT lezyonlar ve bulguların yardımıyla, diğer öteki hastalıklar gibi güvenilir bir teşhisi yapılamaz. Gerçi hastalığın bazı akut bulguları karakteristikse de bazı bulgular tavukların öteki solunum yolu hastalıklarına benzerdirler.

Akut formu, tipik öksürme, kan ifrazı ve yüksek mortalite ile kolayca ILT olarak identifiye edilebilir. Hastalığın öteki bütün formlarında kontrol işlemlerinin yürütülmesi için laboratuvar bulgularının daha önceden elde edilmesi lâzımdır.

Gimza boyası ile boyanmış konjunktival dokular ve tracheada intranükleer inkuluzyon cisimciklerinin görülmeleri ILT için oldukça diagnostiktir. İnkluzyon cisimcikleri diama hastalığın ilk 1 ve 5 günlerinde ortaya çıkmaktadır.

Virus, tavuk embryo inokülasyonu, duyarlı tavukların infraorbital sinusların ve traha inokülasyonu ile kolayca elde edilebilir. Tracheal dokuda virusun çabuk idantifikasyonu FA tekniği kullanılması ile yapılabilir.

ILT'de en iyi izolasyon şekli, tracheal exudat veya trachea ve akciğer suspansiyonu ile 9-12 günlük embryolu tavuk yumurtasına inokulasyondur (7, 17).

Virus İzolasyon ve İdantifikasyonu için marazi maddelerin seçimi:

Hastalığın erken akut fazında virus izolasyonu için tracheal exudat, trachea ve akciğer dokusu toplanmalıdır.

Bu materyaller normal tuz ve Hank'in dengeli tuz solusyonunda veya buyyonda steril kum ile bir havanda döğülerek % 10'luk bir doku suspansiyonu elde edilir. Suspansiyon 10 dakika 700 de-

virde santrifüj edilir, son konsantrasyon ml'inde 1 mg veya 1000 ünite olacak şekilde sıvı süpermatanta antibiyotik ilâve edilir. Sıvı süpermatant kültür substratta inokulasyondan önce 30 dakika oda derecesinde tutulur Daha sonra embryolu yumurtaya inokule edilir. İnfekte trachea dokusu histopatolojik yoklama için intra nükleer inkluzyon cisimciklerinin demostrasyonu için biriktirilmelidir. Froti ve histopatolojik teknikler virusun idantifikasyonu için önemlidir. Serum örnekleri, ön bulguları tayin etmek için bilinen bir laringotracheitis virusuna karşı virus nötralizasyon testlerinde kullanılır.

Serum antikorlarının aranması için SPF kümeslerinde kanatlıların % 15'inden serum örnekleri almak ILT virusunu doğru olarak tayin etmeye yeterlidir (17).

Kültür İçin Maddelerin Tercih :

ILT virusu duyarlı tavukların, infraorbital sinüsleri, trahası ve gelişmiş embryolu yumurtaların inokulasyonu ile traha ve akciğer dokularından trahal exudattan veya hücre kültürlerinden izole edilebilir (17).

Laboratuvar Konakçı Sistemleri :

Embryo İnokulasyonu

9-12 günlük embryolu yumurtaların korioallantoik membranlarına hastalıklı hayvanların, sinüs boşluklarından trahal exudat, traha ve akciğer suspansiyonları, kalp kesesi sıvılarından ve kazeifiye olmuş hava keselerinden uygun solusyonlar hazırlanarak cam üzerine 0,1 ve 0,2 ml. damlatılarak inokule edilir (7, 15, 17).

İnokule edilen embryolu yumurtalar 37°C'de inkube edilerek inokulasyondan 24 saat sonra ölen yumurtalar atılır. Genellikle embryolar inokulasyondan 2-12 gün içinde ölürlür. Ancak virulansı düşük etkenlerle ölümler daha sonra veya hiç olmayabilir. Camın afettede bölgelerinin nekrozu ve proliferasyonundan dolayı plaklar meydana gelebilir. Plaklar, inokulasyondan 3 gün sonra meydana gelir. 5-7 mm. çapında gri, sarı-beyaz renklidirler. Opak kenarlı, ortası çukur, nekrozlaşmış bir şekilde kendini gösterir. Dağılmış birkaç odaktan daha çok sayıda CAM'da değişik şekilde lezyonlar şekillenir.

Cam, histopatoloji, pasaj ve antijen hazırlanması için toplanmalıdır. Enfekte edilmiş CAM lezyonlarının histopatolojik yoklamasıyla intranükleer inklüzyonların varlığı ortaya konulmaktadır. CAM'ı inokule edilmiş embryolarda enfeksiyondan 6-9 gün sonra intranükleer inklüzyonları içeren sinsitial hücre formasyonları ile miliyen nekrotik odaklar şekillenir.

Lezyonlar, safra kanalları epitel hücrelerinde, oral mukozada, ağız bezleri, faringeal mucosa, özefagal mukozaya proventrikülüs bezi, üriner kanallar, timusun medullası, bursal mukozaya ve kloakada gözlemlenmiştir.

Enfekte edilmiş embryoların yaşama süresi yumurta pasajıyla azalmaktadır (7, 17).

Tavukların İnokulasyonu :

Duyarlı kanatlıların treha, infraorbital sinüsler veya aerosol metodu kullanarak inokulasyonları ile doğal hastalığına benzer bulgular 3-5 gün içinde meydana gelir.

Aeresel tekniğine uyularak deneysel olarak enfekte edilmiş kanatlılarda oluşan makroskobik değişiklikler enfeksiyonun 3. gününde başlıyarak şiddetli laringitis ve tracheitis'tir. 4. gün bronşlara yayılma olur. Enfeksiyondan 6 gün sonra trachia ve larynx'i kaplayan sarımtırak difteritik bir membran gözlenmiştir. 8. günde larenks ve yukarı tracheada bir tıkaç bulunur. Tracheal plaklar 10. günde ortaya çıkmaktadır. Akciğer ve hava keselerinin geniş lezyonları, bazı deneysel tavuklarda 3 ve 7 gün arında meydana gelir (17).

Hücre Kültürü :

ILT virusu tavuk embryo böbrek ve tavuk böbrek hücre kültürlerinde gelişir.

Yadar ve arkadaşları (1975) ILT virusunu üretmek için, tavuk embryo böbrek (CEK) primer hücre kültürleri, tavuk embryo fibroblast (CEF), manda fetal böbrek (BFK) ve domuz yavrusu (böbrek) (PK) hücre kültürlerini kullanmıştır (20).

Tavuk embryo böbrek hücre kültürlerine ILT virusu ile inokulasyondan 4-6 saat sonra meydana gelen değişiklikler çok sayıda, çok çekirdekli polikargositlerdir. Polikargosit çekirdeklerinde bü-

yük bazofilik DNA-pozitif inkluzyon cisimcikleri 12 saatte tesbit edilmiştir. 3 günden sonra CPE'ler ve intranükleer inkluzyon cisimcikleri oluşur.

İnokulasyondan sonra 30. ve 36. saatleri arasında hücrelerde ve sıvıda her ikisinde de virus içeriğinin en yüksek olduğu ve ondan sonrada titrenin azaldığı görülmektedir.

Virusun ve üremenin varlığını, intranükleer inkluzyon cisimciklerini saptamakla, Floresan antikör tekniği ile ve immün serumla, CPE'leri nötralize etmekle anlamaktayız.

Yumurta ve doku kültüründe üretilen viruslar hayvan inokulasyonlarında her zaman enfeksiyon oluşturmaz. Çünkü çoğu kez 4. pasajdan sonra patogeniteleri azalmaktadır (6, 7, 17).

Virusun İdentifikasyonu :

Bir araştırmacı ILT'nin teşhisi için intra nükleer inkluzyon cisimciklerinin saptanmasında kullanılan oldukça çabuk bir yöntem geliştirmiştir. Buna göre :

a) Düzgün ve bozulmamış larenx veya trachea epiteli kazınır ve üzerindeki exudatla birlikte alınır. Bu işlem konjunctivadan da yapılabilir.

b) Kazıntı temiz bir lamın ortasına konur ve diğer bir lam üzerine kapatılarak hafif hafif sağa sola hareket ettirilerek bastırılıp dokuların yayılması sağlanır. Böylelikle her iki lamda froti olarak kullanılır.

c) Frotier saf metil alkolde 3-5 dakika fikse edilir.

d) Gimza boyasıyla boyanır (1 ml distile suya 1 damla stok Giemsa solusyonu hesabıyla) sulandırılarak preparat boya solusyonunda 37°C'de 2 saat veya oda derecesinde bir gece tutulur.

e) Preparatlar musluk suyu ile yıkanır.

f) Lamdaki morumsu renk giderilene kadar 3-5 defa saf metil alkole daldırılıp çıkarmak suretiyle differansiye edilir. Musluk suyunda yıkanıp kurutulurken immersion objektifi ile pembemsi, purpul renkli inkluzyon cisimcikleri aranır.

Yine Seveian ismindeki bir araştırmacıda ILT'den Avian Pox'u ayırt etmek için bir çabuk metodu şöyle tarif etmiştir. Bu metoda göre küçük trachea veya deri parçaları, 5 ml glacial acetic asit ve 15 ml. % 40 formalin ve pikrik asit ile doymuş 75 ml. % 95 alkol içeren bir fixativede yerleştirilir. 56°C'de 30 dakika parafin fırınında tutulur. 20 dakika 56°C'de 2 değişmeli saf alkolde suyu giderilir. Bunu 30 dakika 56°C'de toluende aynı şekilde işlem yapılarak berraklaştırılması takip eder. Doku daha sonra 20 dakika 58°C'de parafin-wax'a yerleştirilir ve sonra kalıba alınır.

Kesitler 6 µ. kalınlığında kesilir ve Mayers'in albümini ile buleştirilmiş lamlara alınır ve 20 dakika yavaş ısıtma ile kurutulurlar.

Kesitler bütün olarak alkol ve ksilolden geçirilerek hematoksinle boyanırlar. Daha sonra suyu giderilir, berraklaştırılır ve monte edilerek incelemeye konulurlar (17).

Serolojik İdentifikasyon :

Serolojik yoklamalarda AGP testi, serum nötralizasyon testi, FA testi ve ELİZA testinden yararlanılmıştır.

AGP Testi :

Jel difüzyon testi için, ILT antijeni embriyolu yumurtanın enfekte korioallantoik membranlarından hazırlanır. Bunlar yani belirli lezyonlar gösteren membranlar steril bir havanda ezilerek homojenize edilir. 1600 devirde 10 dakika santrifüj edilerek büyük partiküller çöktürülür. Üstte kalan süpernatant antijen olarak kullanılır.

Tracheal antijen, ya ILT'li ölü kanatlılardan veya bir hafta içinde septom gösterilip öldürülen hayvanlardan hazırlanır. Larynx, trachea ve akciğer dışındaki bronşların cidar ve lümenlerinden biriktirilmiş exudat'ta antijen olarak kullanılır. Eğer exudat çok fazla kuruyorsa normal tuzlu su ile dilue edilir.

Presipitasyon hattı, eğer antijen konsantrasyonu tracheal exudatta yeterliyse antijen ile antikor çukurları arasında 24 saat içinde şekillenecektir.

Tracheal exudattaki presipite antijeninin miktarı, canlı virus miktarı, enfeksiyon periyodu ile ve hatta kuştan kuşa değişme göstereceği için jel diffuzyon testi yumurta inokulasyonu ile beraber yapılmalıdır. Çünkü tracheal exudattaki canlı virusun en küçük miktarı embriyolu yumurtaların CAM'larını enfekte edebildiği halde presipite antijenin yetersiz bir konsantrasyonu antikor ile bir presipitasyon çizgisi oluşturmuyacaktır.

Jel diffuzyon testi, CAM'dan hazırlanmış bilinen antijen ile serumların reaksiyona girmesiyle portör hayvanlarda antikor aranması için kullanılır (17).

AGP testinin kanatlılarda bireysel olarak yapılan serolojik yoklamalarda ILT antikorlarının aranması için kullanılan uygun bir test olmadığı bildirilmektedir (4).

Yurdumuzda ILT yönünden AGP testiyle çeşitli işletmelerde zaman zaman araştırmalar yapılmış ve bu hastalığın serolojik olarak yaygınlık derecesi ölçülmeye çalışılmıştır.

Buna göre Fuhr ve arkadaşları 1977'de Enstitümüze hastalık şüphesiyle gelen ve toplu tavuk yetiştiriciliği yapılmakta olan işletmelere giderek serumlar üzerinde çalışmalar yapmışlardır.

Bu çalışmalarda hastalık arazi gösteren tavuk serumlarından alınan sonuçlarda 140 serumdan 9 müsbet ve yüzdesi 6,4, sağlam görünen tavuklardan alınan serumlarda ise 289 serumdan 36 müsbet ve 12,5 bir yüzde elde etmişlerdir (5).

Yine Sipahioğlu ve arkadaşları (1980), kasaplık piliçler ve yumurtacı piliç ve tavuklar üzerinde serolojik yoklamalar yapmışlardır.

Burada hastalık arazi gösteren 710 tavuk ve piliçten, ayrıca hiçbir hastalık arazi göstermeyen sağlam görünümlü 9780 piliç ve tavuktan kan alınarak serumları ILT yönünden muayene edilmiştir. ILT bakımından hastalıklı kasaplıklarda % 9,5 yumurtacılar da % 7,4 sağlam görünüşte olan kasaplıklarda % 1,5, yumurtacılar da % 2 oranlarında olumlu reaksiyon saptanmıştır.

Bu duruma göre ILT'nin yurdumuzdaki yaygınlığı % 2,1 oranında tesbit edilmiştir (15).

Virus Nötralizasyon Testi :

Virolojide bilinmeyen virusların idantifikasyonu veya özgül antikoların saptanmasında yaygın olarak kullanılan yüksek derecede özgül veya duyarlı olan güvenilir bir testtir.

Bu test kısaca şöyle yapılmaktadır. Spesifik immün serum 10^{-1} den başlayarak dilue edilmiş virusla karıştırılır ve oda derecesinde 1 saat bekletildikten sonra 9-12 günlük embryolu yumurtaların CAM'ına tavuk böbrek dokukültürlerine 0,1 - 0,2 ml veya 4-10 haftalık piliçlere inokule edilir. Yumurta inokulasyonundan 7-10 gün sonra CAM'da plak oluşumlarına göre karar verilir.

Nötralizan antikolar aşılardan veya doğal enfeksiyondan 7 - 10 gün sonra kadar erken bir zamanda tesbit edilebilir (17).

Floresan Antikor Tekniği :

Floresan Antikor tekniği enfeksiyonun teşhisinde çok kullanışlı ve çabuk yöntemlerden birisidir.

Viral antijen enfekte trachea preparatlarıyla, hastalığın erken akut dönemlerinde laringo tracheitise karşı Florescein Isothiocyanete ile boyanmış spesfik antikolarla tesbit edilebilir. Hatta bu teknikle enfekte cam hücrelerinde ve hücre kültürlerinde antijen tesbitinde kullanılabilir. ILT virusu ile enfekte edilmiş tavuk böbrek hücre kültürlerinde inokulasyondan 8 saat sonra çekirdekte ve inokulasyondan 24 saat sonra polykaryositlerin büyük bir çoğunluğunda floresan olgularının meydana geldiği görülmüştür (17).

ELİSA TESTİ :

Son yıllarda, humoral bağışıklığın ölçülmesinde Primer bağlanma testleri içinde yer alan antijen yada, antikor tanımlamada kullanılan ve enzim bağlanmayı gerektiren testlerden birisi de ELİSA testi'dir. Test, bilinen bir antijenin plaklara adsorbe edilerek bilinmeyen antikoların enzimle bağlanmış antiglobulin yardımıyla enzime uygun bir substrat kullanarak antijen antikor antiglobulin kompleksinin saptanması ve ölçülmesi suretiyle indirekt olarak uygulandığı gibi aynı işlem bilinen serumla bilinmeyen antijenin ortaya konulması için direkt olarak da uygulanır.

Literatür verilerine göre, ELİSA testinin diğer testlerden daha duyarlı olduğu anlaşılmaktadır. Son yıllarda kanatlı hastalıklarının serolojik teşhisinde bu testin uygulanabildiği üzerinde birçok araştırma yapılmış bulunmaktadır.

İnfeksiyöz laringotracheitis hastalığının serolojik tanısında da bu testin bir değer taşıdığı ve daha duyarlı olduğu bildirilmektedir.

ELİSA testi İnfeksiyöz laringotracheitis hastalığının serolojik olarak teşhisinde Adair ve arkadaşlarının bildirdikleri yöntemeye göre aşağıdaki şekilde uygulanmaktadır (1).

ELİSA Antijeninin Hazırlanışı :

Testte kullanılacak pozitif antijen üretimi için, grup ILT virüsü (Strain Sinkoviç) inokule edilir. 10^{5-5} TCID₅₀ içerene 1.0 ml. virüs süspansiyonu her şişeye ilâve edilerek 2 saat için hücreler absorpsiyona bırakılır. Şişelere idame besi yeri ilâve edilip 37°C'de CPE'lerin gelişiminin tamamlanmasına kadar inkubasyonda bekletilir.

Negatif antijen için, hücreler serumsuz idame besiyeri ile yalancı olarak enfekte edilir.

Şişeler dondurulup çözdürülür ve hâlâ yapışmış olan hücreler varsa besi yerinden kazınarak kaldırılır.

Toplanan hücreler 1 dakika sonike edilir ve 20 dakika 5000 (g) devirde 4°C'de santrifüj edilir. (Selüler kırıntıları uzaklaştırmak için) Ölü hücreler atılır. Süpernatant 1,5 saat 4°C'de 8000 (g) devirde santrifüj edilir ve küçük parçalar, topraklar 1/50 orijinal volüm PBS'de tekrar süspanse edilir. Daha sonra 0,1 ml. miktarlarında taksim edilerek -70°C'de deepfrizde saklanır (1).

ELİSA Testinin Uygulanışı :

Pozitif ve negatif antijenler sırasıyla karbonat bikarbonat buffer (pH = 9,5) içinde 200 ve 100 misli sulandırılarak pleytlerin karşılıklı sıralarına 0,1 ml. hacimlerinde tevzi edilir. Antijen 4°C'de bir gece absorpsiyona bırakılır. Pleytler % 0,05 Tween 20 içeren PBS ile 4 kez yıkanır ve test edilecek serumun 0,1 ml. 0,5 M Sodyum Chloride ve % 0,05 Tween 80 içeren PBS ile 1/10 oranında sulandırılıp pozitif ve negatif antijen ile kaplanmış çift çukurlara ilâve

edilir. Pleytler 37°C'de 2 saat inkübe edilerek 4 kez yukama suyu ile yıkanır. Konjuget'in 0,1 ml.'i, % 4 at serumu içeren Tween 80 ile 1'4.000'e kadar dilue edilip her çukura ilâve edilir. Pleyt'ler 37°C'de bir saatten fazla inkübe edilir ve tekrar 4 kez yıkanır. Enzim substrate 5-amino salisilik asit, Sodium metabi sülfit eşliğinde daha önceden tekrar kristalize edilir. % 01 M EDTA içeren, % 1 fosfat bufferde 1 mg/ml.'lik bir konsantrasyonda eritilir.

Son pH'sı 6'dır. % 0,005 son konsantrasyona hidrojen peroxide ilâve edilir.

0,1 ml. miktarındaki esas solusyon her çukura ilâve edilir. 450 nm'de her çukurun absorsansı Titertek Multiskan mikro ELİSA okuyucusu kullanılarak 1 saat sonra okunur (1).

TEDAVİ :

Hastalık septomlarının giderilmesi veya lezyonların yayılımının azaltılmasında etkili bir ilâç yoktur. Antibiyotikler komplikasyonları önlemektedir (2).

ÖNLEM ve KONTROL :

ILT'den korunma ve hastalıkla savaş koşullara göre değişmektedir.

ILT'nin yayılmasında portör tavuklar büyük önem kazanmaktadır. Bu bakımdan duyarlı tavuklar ile portör tavukları birarada bulundurmak veya karışık aşılamadan kaçınmak oldukça önemlidir. Karışık stoklar yetiştirildiği zaman bu hayvanların geçmişlerini bilmek ve bu konuda gereken özeni göstermek en iyi yoldur. Virusun 10 gün 13-23°C'de canlı kaldığını gözönüne tutarak bina ve ekipmanın kontaminasyonunu önlemek için sağlık işlemlerinin çok ciddi bir şekilde yürütülmesi duyarlı tavukların bu hastalığa yakalanmamasını sağlayacaktır.

Hastalığın hiç görülmediği ülkelerde yerinde uygun sanitasyon ile korunmanın mümkün olduğu ve kesinlikle aşı uygulamalarından kaçınıldığı bildirilmektedir.

Genel olarak, hastalık çıkan işletmelerde, lokal olarak izole edilen virusla hazırlanan aşuların uygulanması öngörülmektedir (13).

İmmünizasyon :

Aşılama, enfeksiyonun endemik olarak seyrettiği bölgelerde duyarlı tavuk popülasyonlarında hayvanları dirençli kılmak için salık verilmiştir. Aşılama, daha önceden hastalığın bulunduğu bölgelerde enfeksiyonun yükseldiği sürülerde yapılmasının uygun olduğu öngörülmektedir. Aşılama sonucunda portör hayvanlar ortaya çıkacağı için hastalığın hüküm sürmediği bölgelerde tavsiye edilmemiştir.

Bazı araştırmacılar daha uygun bir bağışıklık sağladığı için kloakal dokunun aşılmasını önerdiler.

Tavuklarda etkili bir aşılama, aşının infraorbital sinüsler, intranasal akıntı ve tüy folliküllerine tatbiki ile başarılmıştır.

Attenüe hücre kültürü virus aşuları daha az patojenik olduğu için daha fazla kullanılır. Bunlar intranasal veya göze damlatma yöntemiyle uygulanmalıdır.

İlk olarak attenue edilmiş virus aşuları ile aşılama genellikle 4 ve 8 haftalık yaşlar arasında yapılmalıdır.

Embryo orijinli memnuniyet verici bir aşı, her dozunda en azından $10^{3.5}$ EID₅₀ ILT virusu içermesi lâzımdır. Hücre kültür orijinli benzer bir aşı ise her dozunda 10^{2-0} EID₅₀ veya $10^{2.5}$ TCID₅₀ içermesi gerekir.

Aşılama virulent ve avirulent suşlarla başarılı olmuştur. Tavuk embryo orijinli virulent aşı suşları kloaka üzerine fırça ile sadece

endemik yerlerde kullanılmalıdır. Her uygulamadan önce fırçanın aşının içerisine batırılmasına dikkat edilmelidir.

Bursa fabrisiusun inokulasyonu ise aynı şekilde uygulanmayı gerektirir. Aşılannmış tavuklar aşı uygulamasını takiben incelemek için 4-5 gün tutulmalıdır.

Froymen ve arkadaşları (1983), gözyaşı, adi sprej veya aerosol gibi aşılarla duyarlı tavukları aşılamışlar ve 22-37 hafta sonra virulent ILT virusu ile tracheal olarak epruvasyonda çok iyi bir koruma elde etmişler. Fakat aerosol bir aşının uygulanışı tracheal epitelyumda aşı sonrası iyi olmayan reaksiyonlara neden olduğundan tavsiye etmemişlerdir. Onlara göre sprej metodu kolaydı fakat gözyaşı en güvenilirirdi (3).

Redman ve arkadaşları (1983), aerosol ve gözyaşı ile 7-14 haftalık tavukları aşılayarak antikorları 69 haftalıktan yukardakilerde aramışlar, fakat gözlem periyodu boyunca titrelerinin aynı olduğunu saptamışlardır (14).

Ruchı ve arkadaşları (1983), doku kültüründe modifiye edilmiş bir suşla ILT'ye karşı bir aşı hazırlamışlardır.

Burada 50 günlük tavuklar TCID₅₀ 10⁴⁻⁷⁵ ile oküler veya intranasal yolla aşılanmış ve bu tavukların % 83 veya daha fazlasını koruduğunu saptamıştır. Aerosol yolla verildiğinde bu aşı hiçbir klinik belirti göstermeksizin bir ILT virulen suş ile epruvasyona karşı korumuştur. 70 günlük aşılanmış tavukların % 57'si 6 ay bağışıklığını devam ettirmiştir.

Genç tavuklarda immun cevabın yaşlılara göre daha aşağıda olduğunu saha denemelerinde saptamışlardır (10).

KAYNAKLAR

- 1 — ADAIR, B.M., TODD, D., MCKILLOP, E.R. and BURNS, K. (1986) : Comparison of Serological Tests for Dedection of Antibodies to Infectious Laryngo tracheitis Virus Zootechnica International 68-72.
- 2 — BAŞKAYA, H. and MİNBAŞ, A. (1979) : Kumes Hayvanları Hastalıkları. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınlarından. Sayı 354, 188-194. A.Ü. Basımevi, 252.
- 3 — FROYMAN, R., DERIJCKE, J., VIAENE, N., BIJNENS, B. and TILBURG J.V. (1983) : Protection of Adult Laying Hens Against Infectious Laryngo-tracheitis after previous administraction of commercial Caccine either by eyedrop or by aerosol. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift 52 (5) 335-44.
- 4 — FUCHS, B., BÖDDECKER, C and BÜLOW, V.V. (1985) : Serological Studies on methods fon detecting antibodies against Infectious laryngotracheitis virus Inchickens. Berliner und Müchenen Tierarztliche Wochenschrift. 98(8), 261-266.
- 5 — FUHR, R., SİPAHİOĞLU, A., ERGÜN, A. and YALÇIN, Ş. (1974-1975-1976) : Önemli ve bulaşıcı bazı tavuk hastalıklarının teşhisinde agargel presipitasyon testinin uygulanması. Etlik Vet. Bakt. Enst. Derg. (1976) 4 (5-18).
- 6 — GÜVEN, S., NADAS, Ü.G., SARISAYIN, F. and DEMİRÖZÜ, K. (1983) : «Kanatlı Hayvanların İnfeksiyon Hastalıkları ve Laboratuvar Teşhis Yöntemleri» Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Yayınları No: 7, Milli Eğitim Basımevi.
- 7 — HANESON, L.E. (1972) : Laringotracheitis. (Diseases of Poultry) Sixth Edition. 607-618.
- 8 — HAYASHI, S., ODAGIRI, Y., KOTANI, T. and HORIVCHI, T. (1985) : Pathological changes of tracheal mucosa in chickens infected with infectious laryngotracheitis virus. Avian Diseases (1985), 29(4), 943-950.
- 9 — HILBINK, F.W. (1985) : Susceptibility of some avian species other than chickens to infectious laryngo tracheitis virus. Tijdschrift voon Diergeneskunde. 110(11), 437-439.
- 10 — İZUCHI, T., HASEGAWA, A. and MIYAMOTA, T. (1983) : Studies on a live virus vaccine against Infectious Laryngotracheitis of Chickens I. Biological Diseases. 27(4), 918-924.
- 11 — KISSLING, R. (1983) : Reappearance of Infectious Laryngotracheitis in Austria. Wiener Tierarztliche Monatsschrift 70(10), 330-32.

- 12 — KOTIW, M., SHEPPARD, M., MAY, J.T. and WIKS, C.R. (1986) : Differentiation between virulent and avirulent Strains of Infectious Laryngotracheitis virus by DNA = DNA hybridization using a clorel DNA marker. Microbiology 11 (4) : 319-330.
- 13 — MİNBAŸ, A., ERGÜN A. and CAN, S. (1977) : Ankara'da bir tavukçuluk işletmesinde görülen Enfeksiyöz Laryngotracheitis üzerinde araştırmalar. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu IV. Bilim Kongresi Veterinerlik ve Hayvancılık Araştırma Grubu Teblięleri. 81-87.
- 14 — REDMANN T., BUKON, B., KALETA, E.F., LUDERS, H. and SIEGMAN, O. (1963) : Immunuzation against avian Infectious Laryngotracheitis. Estimating Immunity after eye drop an aerosol vaccination by means of serology and challenge Infection. Deutsche Tierarztliche Wochenschrift 90 (4) : 137-141.
- 15 — SİPAHİOğLU, A., GİRGIN, H., ERGÜN, A. and YALÇIN, ř. (1980) : Tavukların Solunum Yolları Hastalıklarından Süregelen Solunum Hastalığı (CRD), Bulaşıcı Bronřit (IB), Bulaşıcı Yutak ve Nefes Borusu (ILT) hastalıklarının memleketimizde mevcudiyetlerinin yayılma oranlarının araştırılması. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Veterinerlik ve Hayvancılık Araştırma Grubu.
- 16 — TANTAWI, H.H., BATRAWI, A.M.EI., BASTAMI, M.A., POUSSEF, Y.I. and FAWZIA, M.M. (1983) : Avian infectious laryngotracheitis in Egypt. Epiemiology, virus isolation and identification. Veterinary Research Communications 6(4) : 281-287.
- 17 — TRIPHATHY, D.N. and HANSON, L.E. (1975) : Laryngotracheitis. (Isolation and identification of Avian Pathogens). The American Association of avian Pathologists. 227-234.
- 18 — VIVO, L.M., ESPINOSA, V.M. and FONSECA, C. (1978) : Spread of avian laryngotracheitis in Cuba. Revista Avicultura. 22(1) : 71-76.
- 19 — WATTANABE, T. and OHMI, H. (1983) : Susceptibility of guinea fowls to the virus of infectious Laryngotracheitis and egg drop syndrome. Journal of Agricultural Science Japan 2(2) : 193-201.
- 20 — YADAV, M-P., BANSAL, M.P. and KUMAR, S. (1975) : Cytopathogenicity of infectious Laryngotracheitis (ILT) and adenoviruses of poultry in homologous and mammalian cell systems. Indian Journal of Animal Sciences 45(3) : 139-145.