

İNFEKSİYÖZ BRONŞİTİS VİRUSU'NUN TRACHEAL ORGAN KÜLTÜRLERİNE ETKİSİ: IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEME

EFFECT OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS ON THE TRACHEAL ORGAN CULTURES: LIGHT MICROSCOPIC EXAMINATION

Ayşin ŞEN* Mihriban ÜLGEN* Deniz MISIRLIOĞLU**

ÖZET

IBV M41 referens suşunun infektivite titrasyonu tracheal organ kültürlerinde yapıldı ve M1'de %50 siliostatik doz olarak ifade edildi. IB M41 suşunun titresi Log₁₀ 5,48 CD₅₀/ml idi. Virus-infekte tracheal halkaların histopatolojik incelemesinde kinosilyumlarda kayıp, epitel katmanda yassılaşıma ve epitel hücrelerinde yuvarlaklaşma, piknoz ve dökülmeler gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: IBV, tracheal organ kültürleri, histopatoloji

SUMMARY

Infectivity titration of IBV M41 strain (reference virus) were done in tracheal organ cultures and expressed as the fifty per cent ciliostatic dose (CD₅₀) per ml. The titer of the IBV M41 strain was log₁₀ 5,48 CD₅₀/ml. Histopathological examination of virus -infected tracheal rings showed loss of cilia, flattening of lamina epithelialis and pyknosis, rounding and desquamation of epithelial cell.

Key Words: IBV, tracheal organ cultures, histopathology.

GİRİŞ

Kanatlı infeksiyöz Bronşitis Virüsü (AIBV), tavukların önemli solunum yolu patojenlerinden biridir (2,19). Etken solunum sistemi (11,12) yanısıra reproduktif sistem (8,9,10), böbrekler (3,11) ve gastrointestinal sisteme (16,18,20) de lokalize olup infeksiyon oluşturmaktadır. Ancak virus en fazla solunum sistemine, özellikle tracheaya, affinite göstererek tipik değişiklikler oluşturmaktadır (7,13,19). Bu

*U.Ü. Vet. Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa/TÜRKİYE

**U.Ü. Vet. Fak. Patoloji Anabilim Dalı, Bursa/TÜRKİYE

Kabul tarihi; Mart 1996

nedenle, özellikle son yıllarda, AIBV izolasyonu amacı ile civciv veya ebriyo tracheal organ kültürleri (CTOK veya ETOK) sıklıkla kullanılmaktadır (6,21). TOK tekniği ayrıca IBV'nun infektif titresinin belirlenmesinde ve virus nötralizasyon testi ile identifikasyonunda da tercih edilmektedir (4,6,17). TOK'lerinde virus üremesinin tipik göstergesi siliar aktivitenin durmasıdır (siliostasis). Virus ile infekte tracheal halkalarda siliostasis yanısıra, hücresel düzeyde birtakım değişiklikler de oluşmaktadır (12,21). Darbyshire ve ark. (21)'nin, 23 ayrı doku örneğinin AIBV'na duyarlılığını inceledikleri çalışmada, üst solunum sisteminin özellikle tracheanın virusa çok duyarlı olduğu ve tracheanın siliar hücre katmanında dökülmeler ile süperficial epitilial hücrelerde progresif hasarın olduğu rapor edilmiştir. Pradhan ve ark. (14) ise saha suşu ile (Massachusetts serotipi) infekte ettikleri tracheal halkalarda gözlemledikleri histolojik değişiklikleri silioların kaybolması, epitel hücrelerde yuvarlaklaşma, dejenerasyon ve epitel tabakanın tamamen soyulması şeklinde bildirmişlerdir. AIBV ile infekte tracheal halkalarda oluşan değişiklikler, civciv veya tavukların AIBV ile experimental infeksiyonu sonucu oluşan değişiklikler ile büyük benzerlik göstermekte ve bu nedenle TOK'lerinin IBV infeksiyonlarında uygun bir model sistem olduğu bildirilmektedir (5).

Bu çalışma, IBV M41 referens suşunun infektif titresinin TIK'lerinde belirlenmesi ve sözkonusu virus ile infekte edilen CTOK'lerindeki değişikliklerin histopatolojik yoldan incelenmesi amacı ile yapılmıştır.

MATERYAL METOT

Virus: IBV M41 referens suşunun 6. yumurta pasajı kullanıldı. Virus Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı üretim Enstitüsü'nden sağlandı.

Tracheal Organ Kültürü: TOK'leri Cook ve ark. (6) tarafından bildirilen yöntemle göre, 1 günlük SPF civcivlerden hazırlandı. Her civcivden yaklaşık 30-40 adet tracheal halka elde edildi. ÖN yıkama işleminden sonra halkalar 0.1 ml. Minimal Essential Medium (MEM-Gibco, pH:7.0) içeren steril, düz tabanlı, kapaklı mikroplyet gözlerine aktarıldı ve inverted mikroskopta siliar aktivite yönünden incelendi. Çalışmada %100 siliar aktivitenin gözlemlendiği halkalar kullanıldı. Kültürler %5 CO₂ içeren etüvde, otomatik zaman ayarlı bir shaker üzerinde ve 37°C'de inkübe edildi.

IBV M41 Referens suşunun infektivitesinin ölçülmesi: Referens virusun (M41-6. yumurta pasajı) MEM ile 10 katlı sulandırılması yapıldı. Her sulandırma 5 ayrı tracheal halkaya inokule edildi. İnokulasyon için, halkaların bulunduğu pleytlerdeki MEM mikropipet yardımı ile çekildi ve halkaların üzerine virus

sulandırmalarından 0.1ml konuldu. 37°C'de, 1 saat inkübasyon süresi sonunda virüslü materyal atıldı ve hergöze tekrar 0.1 ml. MEM ilave edildi. Kültürler 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde ve her iki saatte bir 15 dakika çalkalama yapan, otomatik zaman ayarlı bir shaker üzerinde inkübe edildi Kültürler 5 gün süre ile hergün siliar aktivite yönünden inverted mikroskop ile incelendi (6). Sonuçlar Reed and Muench Yöntemi ile hesaplanarak ml'de %50 siliostatik doz (CD₅₀) olarak ifade edildi (1). 5 adet tracheal halka hiçbir işlem uygulanmazsınız negatif kontrol olarak bırakıldı.

Histopatolojik inceleme, IBV M41 referens suş ile infekte edilen halkalarda %100 siliostasis oluştuğundan sonra, bu halkalar %10'luk formol solusyonunda tespit edildi. Bilinen rutin yöntemlerle parafin bloklar hazırlanarak mikrotom ile 5-6 um kalınlığında kesitler alındı. Hazırlanan preparatlar Hematoksilen - Eosin ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi. Negatif kontrol olarak bırakılan tracheal halkalara da aynı işlemler uygulanarak histopatolojik inceleme yapıldı.

BULGULAR

IBV M41 referens suşunun 10 katlı sulandırmaları ile infekte edilen tracheal halkalarda, ilk 48 saat içinde %100 siliostasis oluşmadı. 72 saatlik inkübasyon periyodu sonunda virüsün 10⁻¹ ile 10⁻³ arasındaki sulandırmalarının inokule edildiği tüm halkalarda %100 siliostosis gözlemlendi. 10⁻⁴ sulandırmada 3 halkada siliostosis

IBVM41	Siliostatik Etki										log ¹⁰ CD ₅₀ /ml	
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰		
1 no'lu halka	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	5.48
2 no'lu halka	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
3 no'lu halka	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
4 no'lu halka	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
5 no'lu halka	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Oran	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	

Tablo 1: IBV M41 referens suşunun farklı sulandırmalarındaki siliostatik etkisi.

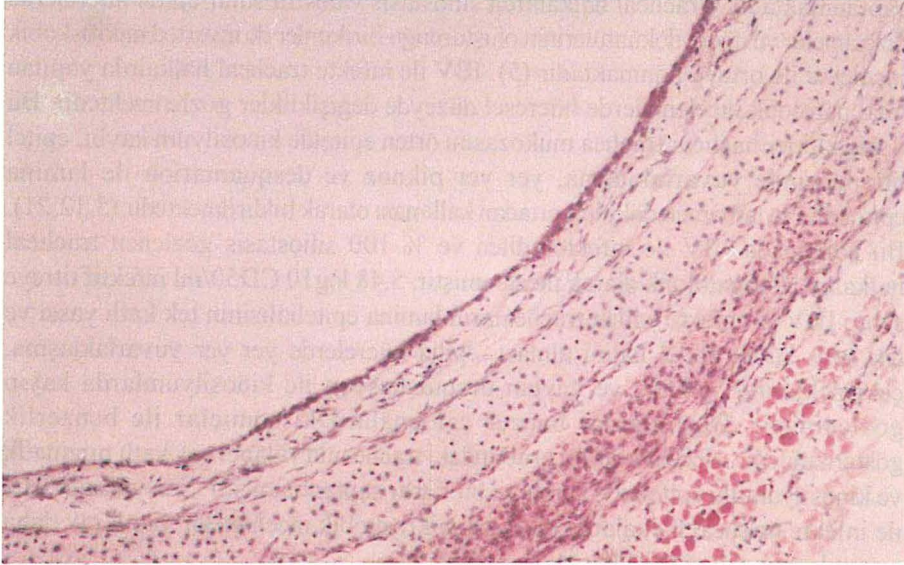
oluşurken, 2 halkada siliar aktivitenin devam ettiği belirlendi. 10-5 sulandırmanın inokule edildiği halkaların 2'sinde siliostosis oluştu. 3 halkada ise silio-aktivite gözlemlendi. Virusun daha yüksek sulandırmalarında (10-6 ile 10-10 arasındaki sulandırmalar) siliar aktivitenin etkilenmeyerek devam ettiği saptandı (Tablo 1). Referans virusun siliostasis oluşturan %50 titresini (log₁₀ CD50/ml) 5.48 olarak belirlendi. Virus inokule edilmeksizin kontrol olarak bırakılan halkalarda siliar aktivitenin 5 gün boyunca devam ettiği gözlemlendi.

IBV'nun %100 siliostasis oluşturduğu tracheal halkaların histopatolojik incelemesinde, kinosilyumlarda kayıp, lamina epitelialis'in tek katlı yassı ve tek katlı kübik epitel halini alması ile epitel hücrelerinde yer yer yuvarlaklaşma, çekirdeklerinde piknoz ve yaygın bir desquamation gözlemlendi (Resim 1). Virus inokule edilmeyen kontrol grubundaki tracheaların yalancı çok katlı prizmatik ve kinosilyumlu epitelinde herhangi bir hasar gözlenmedi (Resim 2).

TARTIŞMA

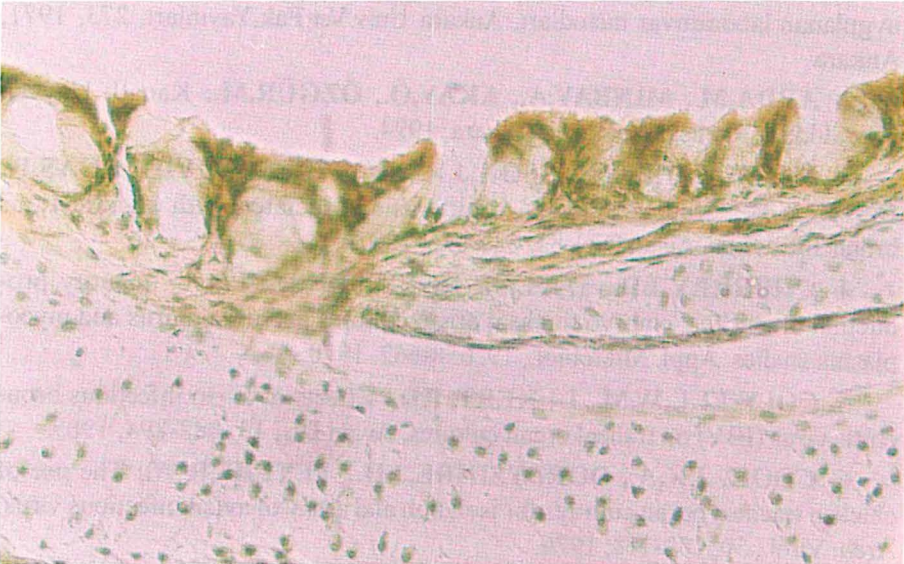
Tavukların önemli solunum sistemi patojenlerinden biri olan İnfeksiyöz bronşitis virüsü (IBV)'nin izolasyonunda ve virus ile ilgili diğer çalışmalarda tracheal organ kültürleri sıklıkla kullanılmaktadır (6,21). Anabilim Dalı'mızda daha önce yürütülen bir doktora çalışması (22) ile bir araştırma projesinde de (23) IBV'nun izolasyonu ve virus nötralizasyon testi ile identifikasyonu için TOK'leri kullanılmış ve tracheal kültürlerinin amaca uygun olduğu sonucuna varılmıştır. IBV'nun infektif titresinin belirlenmesinde de TOK'lerinin kullanılabilirliği ve bu ortamdaki virus titresinin embriyolu yumurtalarda saptanan IBV titresini ile paralel olduğu bildirilmektedir (4,6). Bu çalışmada da IBV M41 referans suşunun infektivitesini belirlemek amacıyla TOK'leri kullanılmış ve virusun titresini saptanmıştır. İnkübasyonun ilk 48 saatlik periyodu boyunca virusun tüm sulandırmalarının inokule edildiği halkalarda tipik bir değişiklik gözlenmemiştir. İnkübasyonun 72. saatinde ise: ilk üç sulandırmada virus %100 siliostasis oluştururken, 10-4 sulandırmada 3/5 ve 10-5 sulandırmada 2/5 sulandırmada 2/5 oranında siliostasis gözlenmiştir. 10-6 ve daha yüksek sulandırmalarda virus tracheal halkalardaki siliar aktiviteyi etkilememiştir. Bu sonuçlar ışığı altında IBV M41 referans suşunun siliostasis oluşturan %50 infektif titresini (log₁₀ CD50/ml) 5.48 olarak saptanmıştır. Aynı amaçla yapılan benzer çalışmalarda, IBV'nun infektif titresinin virusun serotipine ve tracheal halkaların hazırlandığı SPF embriyo veya civcivlerin yaşına bağlı olarak değişiklik gösterdiği ve titreinin (log₁₀ CD50/ml) 4.2 ile 6.6 arasında olduğu bildirilmektedir.

IBV ile infekte edilen tracheal halkalarda gözlenen tipik değişiklik siliar aktivitenin durmasıdır (6). Siliostasis inverted mikroskop ile yapılan incelemelerde



Resim 1. Deney grubu tracheal organ kültürü. Lamina epithelialiste yassılaşma, epitel hücrelerinde belirgin kayıp. x160 H.E.

Fig.1 TRacheal organ culture of IB group. Flattening of lamina epithelialis and marked loss of epithelial cells. x160 H.E.



Resim 2. Kontrol grubu tracheal organ kültürü. Yalancı çok katlı prizmatik epitel ve kinosilyumlar gözleniyor. x320 H.E.

Fig.2 Tracheal organ culture of control group. Pseudostratified prisma epithelium and kynociliums are seen. x320 H.E.

saptanmaktadır. Tracheal halkalarda siliostasis yanısıra siliar epitel hücrelerde dökülmeler ve hücre döküntülerinin oluşturduğu birikimler de inverted mikroskopik inceleme ile ortaya konmaktadır (5). IBV ile infekte tracheal halkalarda yapılan histopatolojik incelemelerde hücresel düzeyde değişiklikler gözlenmektedir. Bu değişiklikler başlıca; trachea mukozasını örten epitelde kinosilyum kaybı, epitel hücrelerinde yuvarlaklaşma, yer yer piknoz ve desquamation ile lamina epitelialis'in tamamen dökülüp ortadan kalkması olarak bildirilmektedir (5,12,21). Bu çalışmada IBV ile infekte edilen ve % 100 siliostasis gözlenen tracheal halkalar histopatolojik olarak incelenmiştir. 5.48 log₁₀ CD50/ml infeksiyöz titreye sahip IBV ile infekte edilen tracheaların lamina epitelialisinin tek katlı yassı ve tek katlı kübik epitel halini alması, epitel hücrelerde yer yer yuvarlaklaşma, çekirdeklerinde piknoz ve yaygın desquamasyon ile kinosilyumlarda kayıp gözlenmiştir. Bu bulgular benzer çalışmalardaki sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Nefatif kontrol grubundaki tracheanın yalancı çok katlı prizmatik ve kinosilyumulu epitelinde herhangi bir hasar saptanmamıştır. Son yıllarda IBV ile infekte tracheal halkalarda elektron mikroskopik incelemeler yapılarak daha ayrıntılı sonuçlar elde edilmektedir (14,15,24).

KAYNAKLAR

1- ARDA,M.: Hastalık etkenlerinin titrasyon ve nötralizasyon testlerinde uygulanan laboratuvar metodları, Ankara Üniv.Vet.Fak.Yayımları, 273, 1971, Ankara.

2- ARDA,M., MİNBAY,A., AKAY,Ö., ÖZGÜR,M.: Kanatlı Hayvan Hastalıkları, Medisan Yayınevi, Ankara, 1994.

3- BROWN, T.P., GLISSON,J.R., ROSALES,G., VILLEGAS,P., DAVIS,R.B.: Studies of avian urolithiasis associated with an infectious bronchitis virus, Avian Dis., 31, 629-636, 1987.

4- CHERREY,J.D., TAYLOR-ROBINSON,D.: Large- quantity production of chicken embryo tracheal organ cultures and use in virus and mycoplasma studies. Appl. Microbiol., 19, 658-662, 1970.

5- COLWELL,W.M., LUKERT, P.D.: Effects of avian infectious bronchitis virus (IBV) on tracheal organ cultures, Avian Dis, 13, 888-894, 1969.

6- COOK, J.K.A., DORBYSHIRE,J.H., PETERS,R.W.: The use of chicken tracheal organ cultures for isolation and assay of avian infectious virus. Arch. Virol., 50, 109-118, 1976.

7- COOK,J.K.A., HUGGINS,M.B., BUMSTEAD,N.: Pathogenesis for respiratory tract of IBV alone or with invasive E.coli (Proceedings of), I.

Int. Sym. Infectious Bronchitis, Rouischolzhausen, 108-112, 1988.

8- CRINION, R.A.P.: Egg quality and production following infectious bronchitis virus exposure at one day old. *Poult Sci.*, 51, 582-585, 1972.

9- CRINION, R.A.P., BALL, R.A., HOFSTAD, M.S.: Pathogenesis of oviduct lesions in immature chickens following exposure to infectious bronchitis virus at one day old., *Avian dis.*, 15, 32-41, 1971.

10- CRINION, R.A.P., BALL, R.A., HOFSTAD, M.S.: Abnormalities in laying chickens following exposure to infectious bronchitis virus at one day old., *Avian Dis.*, 15, 42-48, 1971.

11- CUMMING, R.B.: Infectious avian nephrosis (ureamia) in Australia *Australian Vet.J.*, 39, 145-147, 1963.

12- DARBSHIRE, J.H., COOK, J.K.A., PETERS, R.W.: Organ culture studies on the efficiency of infection of chicken tissues with avian infectious bronchitis virus. *Br. J. exp.Path.*, 57, 443-454, 1976.

13- DUCATELLE, R., MEULEMANS, G., COUSSEMENT, W., HOORENS, J.: Aetiopathology of the fowl trachea early after inoculation with H52 Infectious bronchitis virus. *ZBL. Vet. Med. B*, 31, 151-160, 1984.

14- DUTTA, S.K.: Morphological changes of chicken tracheas and tracheal organ cultures infected with avian infectious bronchitis virus studied in scanning electron microscope. *Avian Dis.*, 19, 429-438, 1975.

15- DUTTA, S.K., JIHNSON, R.B.: Scanning electron microscopy of trachea infected in vitro in organ culture and in vivo with avian infectious bronchitis virus. *Proceedings of the 32 nd Annual EMSA meeting, Missouri*, 24-25, 1974.

16- EL-HOUADFI, MD., JONES, R.C., COOK, J.K.A., AMBALI, A.G.: The isolation and characterisation of six avian infectious bronchitis viruses isolated in Morocco, *Avian Pathol.*, 15, 93-105, 1986.

17- JOHNSON, R.B., MARQUARDT, W.W.: The neutralizing characteristics of strains of infectious bronchitis virus as measured by the constant-virus variable-serum method in chicken tracheal organ cultures. *Avian Dis.*, 19, 82-90, 1975.

18- JONES, R.C., AMBALI, A.G.: Rexcretion of an enterotropic infectious bronchitis virus by hens at point of lay after experimental infection at day old. *Vet.Rec.*, 120, 617-620, 1987.

19- KING, D.J., and CAVANAGH, D.: Infectious bronchitis in "Disease of Poultry" ed. B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid and

H.W.Yoder Jr., 9th-ed., 471-484, Wolfe Publishing Ltd., London, 1991.

20- MARTI,N.K., SHARMA, S.N., SAMBYAL, D.S: Isolation of infectious bronchitis virus from intestine and reproductive organs of laying hens with dropped egg production, *Avian Dis.*, 29, 509-513, 1984.

21- PRADHAN,H.K., MOHANTY,G.C., RAJYA,B.S.: Comparative sensitivities of oviduct and tracheal organ cultures and chicken embriyo kidney cell cultures to infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, 27, 594-601, 1983.

22- PEN,A.: Yumurta tavuğu, broyler ve damızlık işletmelerinde infeksiyöz bronşitis teşhisi ve hastalığın prevalansı, U.Ü.Sağlık Bil.Ens., Doktora Tezi, 1991.

23- PEN,A., ÇARLI,K.T., ÇETİN,C., MİNBAŞ,A.: Bursa bölgesi yumurta tavuğu, broyler ve damızlık işletmelerinde infeksiyöz bronşitis virusunun izolasyonu ve identifikasyonu, U.Ü.Araştırma Fonu, Proje No: 93/16, 1996.

24- XINGING,W., Xİ, L.: Studies on the pathomorphology and pathogenesis of avian IB. *Acta Vet. Zootech. Sinica*, 24, 554-559, 1993