

# İnfeksiyöz Bronşitis Virusu'nun Trakeal Organ Kültürlerinde İmmunoperoksidaz Tekniği ile Saptanması\*

Ayşin ŞEN

Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa-TÜRKİYE

Gürsel SÖNMEZ

Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Bursa-TÜRKİYE

Vildan CANER

Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli-TÜRKİYE

M.Özgür ÖZYİĞİT

Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Bursa-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 17.08.2001

**Özet:** Bu çalışmada, infeksiyöz bronşitis virusu (IBV)'nun kısa sürede tespit edilmesi amacı ile fikze edilmemiş-taze trakeal organ kültürleri (TOK)'nde immunoperoksidaz tekniğinin uygulanabilirliği incelendi. Bu amaçla, bir günlük SPF civcivlerden hazırlanan TOK'ne IBV M41 referens suşunun farklı dilusyonları inokule edildi. IBV antijeni, TOK'nde inokulasyondan 18 saat sonra immunoperoksidaz (IP) tekniği ile saptandı. IP boyama, tüm dilusyonlarda siliostaziden önce gözlemlendi. IP tekniği, formalin ile fikze edilmiş ve parafinle bloklanmış TOK kesitlerinde viral antijeni ortaya koymak amacı ile de uygulandı. Viral antijen bu kesitlerde de tespit edildi. IBV ile infekte trakeal halkaların histopatolojik incelemesinde, kinosilyum kaybı, lamina epitelyaliste yassılaşıma, epitel hücrelerde yuvarlaklaşma ve dökülme gözlemlendi.

**Anahtar Sözcükler:** İnfeksiyöz bronşitis virusu, Trakeal organ kültürü, İmmunoperoksidaz

## Detection of Infectious Bronchitis Virus in Tracheal Organ Cultures Using the Immunoperoxidase Technique

**Abstract:** The applicability of the immunoperoxidase (IP) technique in unfixed-fresh tracheal organ cultures (TOCs) was investigated for rapid detection of infectious bronchitis virus (IBV). For this purpose, TOCs prepared from one-day-old SPF chicks were inoculated with IBV M41 strain in serial dilutions. IBV antigen detected by IP technique in TOCs 18 h postinoculation. IP staining was observed before siliostasis in all dilutions. The IP technique was also applied to detect IBV antigen in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of TOCs inoculated with IBV M41 strain. Viral antigen was also detected in these sections. Histopathological examinations of IBV M41 infected tracheal rings showed loss of cilia, flattening of lamina epithelialis, and rounding and desquamation of epithelial cells.

**Key Words:** Infectious bronchitis virus, Tracheal organ cultures, Immunoperoxidase

### Giriş

İnfeksiyöz bronşitis virusu (IBV), tavuk yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara yol açan infeksiyonlardan biridir (1-3). Ülkemizde de infeksiyonun varlığı yapılan serolojik ve virolojik çalışmalarla ortaya konmuştur (4-7). Virus solunum yolu infeksiyonu ve nefritis oluşturması yanı sıra, yumurta verimini ve kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir (3,8-10). İnfeksiyöz bronşitis (IB)'in tanısı virusun kendisinin ya da

spesifik antikor yanıtının saptanması ile yapılmaktadır. Virusun saptanmasında ise virus izolasyonu ve identifikasyonu yanı sıra, daha kısa sürede sonuç alınan direkt tespit yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında en önemlileri, spesifik antikorların kullanımı ile infekte doku kesitlerinde viral antijeni ortaya koyan immunofluoresan tekniği (IFT) ve immunoperoksidaz tekniği (IPT) ile viral genomun belirlenmesine yönelik uygulanan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'dur (11-13).

\* Bu çalışma TÜBİTAK tarafından VHAG-1441 nolu projeye desteklenmiştir.

İmmunoperoksidaz tekniği (IPT), infekte dokularda viral antijeni, peroksidaz işaretli spesifik konjugat ile tespit eden ve ortama substrat ile kromojenin katılması sonucu reaksiyonu görülebilir hale getiren bir yöntemdir. IPT günümüzde IB yanısıra infectious bursal disease (IBD), egg-drop syndrome (EDS) gibi çeşitli infeksiyonların tanısında kullanılmaktadır (14,15).

IBV'nun izolasyonu amacı ile Trakeal Organ Kültürleri (TOK) sıklıkla kullanılmaktadır. TOK'leri 19-20 günlük Specific Pathogen Free (SPF) tavuk embriyolarından hazırlanmakta ve IBV'nun saha suşlarının adaptasyonuna gereksinim duyulmaksızın ilk pasajlarda siliostazis oluşturmaktadır (2,16). Siliostazis, virusa spesifik bir özellik olmaması nedeni ile, IBV'nun identifikasyonunun virus nötralizasyon testi ile teyidi gerekmektedir. Trakeal dokuda siliostazis oluşum süresi, inokulumdaki virus miktarına, virus suşuna ve genetik faktörlere göre değişmekle birlikte, inokulasyondan yaklaşık 18-24 saat sonra başlamakta ve aktivitenin % 100 oranında durması 72 saat içinde tamamlanmaktadır (17,18). IBV'nun izolasyonunda oldukça duyarlı bir teknik olan TOK'lerinde virusun tespit edilme süresini kısaltmaya yönelik yapılan bir çalışmada, Bhattacharjee ve ark. (19), TOK ile IFT'ni birarada kullanarak IBV-spesifik fluorezan ışımının 24 saatten daha kısa sürede saptandığını rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada, IF boyamanın trakeal halkalardaki siliostazisten daha önce ortaya çıktığı ve bu tekniğin IBV'nun hızlı identifikasyonunda kullanılabileceği bildirilmiştir.

IBV ile infekte trakeal halkaların histopatolojik incelemelerinde, siliostazis yanı sıra, trakeanın siliar epitel katmanında dökülmeler, yine epitel hücrelerde yuvarlaklaşma, çekirdeklerinde piknoz ve yaygın deskuamasyon ile kinosilyumlarda kayıp, dejenerasyon ve epitel hücrenin tamamen dökülmesi gibi değişiklikler gözlenmektedir (20,21).

Bu çalışmada, IBV ile infekte edilmiş TOK'lerinde IP tekniğinin uygulanabilirliğinin incelenmesi ve bu teknik ile viral antijenin trakeal dokularda kısa sürede saptanması amaçlanmıştır. Ayrıca IP tekniği, taze trakeal dokular yanı sıra parafinle bloklanmış trakeal dokudan hazırlanan kesitlerde de uygulanarak kesitlerin bu amaçla kullanılabilirliği incelenecektir.

## Materyal ve Metot

**SPF Embriyolu Tavuk Yumurtası:** Bir günlük SPF embriyolu tavuk yumurtaları Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsünden sağlandı.

**Minimum Essential Medium:** TOK hazırlanmasında ve referens virusun titrasyonunda Minimum Essential Medium (MEM) (Sigma M0643) kullanıldı.

**TOK Hazırlanması:** Trakeal halkalar 19-20 günlük SPF tavuk embriyolarından veya 1 günlük SPF civcivlerden hazırlandı. Halkaların her biri inverted mikroskopta incelenerek siliar aktivite yönünden incelendi. Halkaların % 100 siliar aktivite gösterenleri ayrılarak kullanıldı (16).

**IBV M41 Referens Suşun TOK'lerinde Titrasyonu:** Referens virusun (IBV M41) steril MEM ile 10 katlı sulandırılmaları yapılarak, trakeal halkalara inokule edildi ve % 100 siliostazisin gözleendiği son nokta saptandı. Sonuçlar Reed ve Muench Yöntemi (22) ile hesaplanarak,  $5.13 \log_{10} CD_{50}$  (% 50 siliostatik doz) / ml olarak saptandı (16).

**Anti-IBV Poliklonal Serum:** IBV M41 suşu  $10^3$  EID (Embriyo İnfektif Doz)/ml miktarında 3-5 haftalık SPF piliçlere subkutan yol ile iki defa inokule edilerek hazırlandı.

**TOK'lerinin IBV M41 ile İnfeksiyonu:** Trakeal halkalar hazırlandıktan 24 saat sonra siliar aktiviteleri kontrol edildi ve % 100 siliar aktiviteye sahip olan halkalar  $4.13 \log_{10} CD_{50}$  / ml IBV M41 ile inokule edildi. Virusun trakeaya absorpsiyonu için kültürler  $37^\circ C$ 'de ve statik durumda bir saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda inokulum uzaklaştırıldı ve halkaların üzerine 0,15 ml MEM eklendi ve % 5  $CO_2$  içeren etüvde ve otomatik zaman ayarlı bir çalkalayıcı üzerinde,  $37^\circ C$ 'de inkübe edildi.

**TOK'lerinde IPT Uygulanması:** IP tekniği için Biyotin İşaretli Pürüfiye keçi anti-tavuk IgG (H+L) (KPL-16-24-06), ExtrAvidin-Peroxidase (Sigma-E2886) ve AEC Kromojen Kit (Sigma-AEC101) kullanıldı.

a) **Endojen peroksidazın giderilmesi:** Bu amaçla iki farklı yöntem uygulandı. Trakeal halkaların bir kısmı % 0,28'lik periyodik asit solusyonu ile 2 dk muamele edildi (23). Diğer halkalar ise % 3'lük  $H_2O_2$ 'de 10 dk bekletildi (14). Her iki uygulama sonunda halkalar Phosphate Buffer Saline (PBS) ile 10 dk süre ile 2 defa hafif devirli çalkalayıcı üzerinde yıkandı.

b) **Trakeal halkaların IPT ile boyanması:** IP boyama, "Avidin-Biotin-Peroksidaz-Kompleksi" yöntemi ile uygulandı (24). İlk aşamada trakeal halkalar primer antikor (anti IBV antiserumu) ile muamele edildi. Bu aşamada mikroplyet gözlerindeki halkaların herbirinin üzerine 0,1 ml primer antikor eklendi ve 37 °C'de 45-60 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda halkalar "a" şikkında belirtildiği şekilde yıkandı. Sekonder antikor (biyotin işaretli keçi anti tavuk IgG (H+L)) uygulamasından önce "background" boyanmayı önlemek amacı ile % 20'lik normal keçi serumu ile halkalar oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Yıkama işleminin ardından sekonder antikor 0,1 ml halkalar üzerine eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Yıkama sonrası tüm halkalar 0,1 ml ExtrAvidin-Peroxidase ile oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Yıkama işlemi uygulandıktan sonra son aşamada AEC Kromojen ile halkalar 2 dk, 5 dk ve 10 dk olmak üzere farklı sürelerde inkübe edildi ve deiyonize su ile yıkandı. Boyama işlemi sonunda trakeal halkalar temiz lamalar üzerine yerleştirildi ve üzerlerine 1 damla kaplama mediyumu (gliserol-jelatin) damlatılıp bir lamel ile hafifçe kapatıldı ve ışık mikroskopunda incelendi.

c) **Reagentlerin Optimizasyonu:** IPT'nde kullanılan primer antikor (1/25, 1/50 ve 1/100), sekonder antikor (1/50, 1/100 ve 1/1000) ve ExtrAvidin-Peroxidase (1/50, 1/100 ve 1/200) farklı dilasyonları ile ön çalışma yapılarak optimize edildi.

**Doku Kesitlerinde IPT Uygulanması:** Trakeal halkalardan hazırlanan parafin kesitlerde IBV antijenini saptamak için "Avidin-Biotin-Peroksidaz-Kompleksi" yöntemi kullanıldı (24). Kesitler deparafinize edildikten sonra PBS'de 5 dk yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesi giderildikten sonra kesitler, normal keçi serumu, primer antikor, sekonder antikor, ExtrAvidin-Peroxidase ve AEC kromojen ile inkübe edildi. Karşıt boyama için Mayer'in hematoksileninde 2 dk boyandı. Kesitlerin üzerine 1 damla gliserol jelatin damlatılıp lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda incelendi. Negatif kontrol olarak PBS inokule edilen trakeal halkalar kullanıldı. Tüm işlemler oda ısısında ve nem odalarında gerçekleştirildi.

**Histopatolojik İnceleme:** IBV M41 suşu ile infekte edilen ve negatif kontrol olarak bırakılan trakeal halkalardan inkübasyonun 18., 24. ve 48. saatlerinde örnekler alınarak % 10'luk nötral formalin solusyonunda tespit edildi. Bilinen yöntemlerle hazırlanan parafin bloklardan alınan 5-6 mikronluk kesitler hematoksilen-eosin ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

## Deney Planı

\* IBV M41 referens suşun  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  ve  $10^{-3}$ 'lük dilasyonları yapılarak her bir dilasyondan, her deneme için üçer adet trakeal halkaya inokule edildi. İnkübasyonun 18., 24. ve 48. saatlerinde örnekler ayrıldı. Aynı zamanda siliar aktivite kontrolü yapıldı ve daha sonra halkalara IPT uygulandı. Kontrol grubu olarak PBS inokule edilen trakeal halkalara IPT uygulandı.

\* IBV M41 referens suşun  $10^{-1}$ 'lik dilasyonu inokule edilen trakeal halkaların bir kısmı aynı sürelerde ayrılarak formol içine alındı. Bu dokulardan parafin bloklar hazırlanarak kesitleri alındı ve IPT ile boyandı.

\* IBV M41 referens suşun  $10^{-1}$ 'lik dilasyonu inokule edilen trakeal halkaların bir bölümünden ise yine parafin bloklar hazırlandı ve histopatolojik yönden kontrolü yapıldı.

## Derecelendirme

TOK'lerinde IPT uygulamasında sonuçlar 0-4 arasında derecelendirildi. 0: IP reaksiyonu görülmeyen örnekler, 1: Trakeal epitel dokunun 1/4'ünde IP reaksiyonunun görüldüğü örnekler, 2: Trakeal epitel dokunun 1/2'sinde IP reaksiyonunun görüldüğü örnekler, 3: Trakeal epitel dokunun 3/4'ünde IP reaksiyonunun görüldüğü örnekler, 4: Trakeal epitel dokunun tamamında IP reaksiyonunun görüldüğü örnekler verildi. Aynı sistem siliostazisin derecelendirilmesi için de yapıldı. Böylece her grupta bulunan trakeal halkaların üçünde de maksimum IP reaksiyonu veya siliostazis gözleendiğinde skor 12 (4X3) olarak ifade edildi (19).

## Bulgular

### TOK'lerinde İmmunperoksidaz Boyanma Sonuçları:

- **Background boyama:** Trakeal halkaların immunoperoksidaz tekniği ile boyanması sonucunda reaksiyonlar ışık mikroskopunda X10 ve X25'lik objektiflerle incelendi. Periyodik asit (% 0,28) veya  $H_2O_2$  (% 3) ile muamele edilen örneklerde % 20 keçi serumu ile blocking uygulamasına rağmen background boyanmaların giderilemediği gözleendi. AEC substratın kısa süre (2-3 dk) uygulanması ile trakeal halkalarda non-spesifik boyanmaların daha az düzeyde olduğu gözleendi.

- Farklı dilusyonlar ve inkübasyon periyotlarında İmmunoperoksidaz boyanma sonuçları:

a) **4,13 log<sub>10</sub> ile infeksiyon:** TOK'lerinde viral antijen inkübasyonunun en erken 18. saatinde optimal düzeyde tespit edildi (Şekil 1). Bu gruptaki halkalarda siliostazis 18. ve 24. saatte gözlemlendi, ancak 48. saatte dahi siliostazis % 100 tamamlanmadı (Şekil 2).

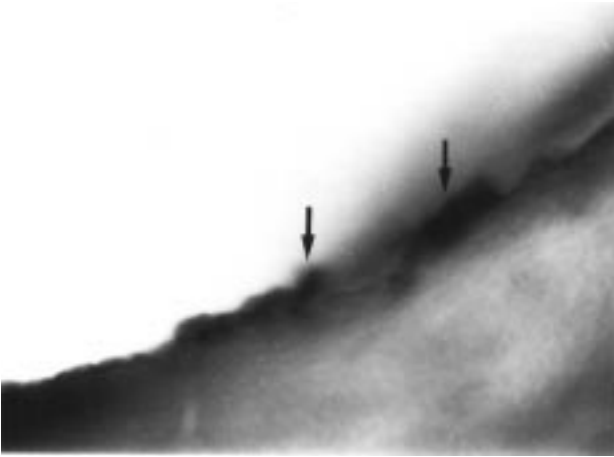
b) **3,13 log<sub>10</sub> ile infeksiyon:** Bu grupta viral antijen IP tekniği ile optimal düzeyde 48. saatte gözlemlendi. 18. ve 24. saatte de oldukça güçlü boyanmalar dikkati çekti. 10<sup>-2</sup>'lik sulandırma ile yapılan bu infeksiyon grubunda siliar aktivite 24. saatte % 50'nin altında idi, 48. saatte ise yaklaşık % 50 düzeyinde gözlemlendi (Şekil 3).

c) **2,13 log<sub>10</sub> ile infeksiyon:** En düşük virüs dilusyonu (10<sup>-3</sup>) ile yapılan infeksiyonun 18. saatinde oldukça az miktarda boyanmalar gözlemlendi (Şekil 4), 24. ve 48.

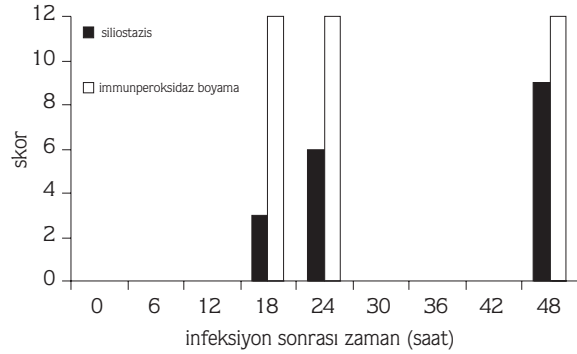
saatlerde ise kademeli olarak artış gözlenen spesifik reaksiyonlar belirlendi. Bu dilusyonlardaki halkaların siliar aktivitesi ilk 24 saat boyunca oldukça güçlü idi, 48. saatte ise halkalarda düşük düzeyde siliostazis tespit edildi (Şekil 5).

d) **Kontrol grubu:** PBS inokule edilen trakeal halkaların IPT ile boyanması sonucu spesifik reaksiyon gözlenmedi (Şekil 6).

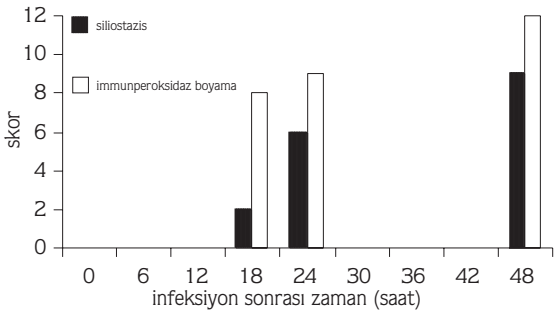
**Doku Kesitlerinin İmmunoperoksidaz Boyama Sonuçları:** 4,13 log<sub>10</sub> (10<sup>-1</sup>) IBV M41 ile infeksiyonun 18., 24. ve 48. saatlerinde alınarak formalin ile tespit edilen ve parafine gömülen trakeal halkaların IP tekniği ile boyama sonucunda epitel hücrelerin sitoplazmasında viral antijen tespit edildi (Şekil 7). PBS inokule edilen negatif kontrol grubu trakeal halkalarda spesifik boyanma gözlenmedi (Şekil 8).



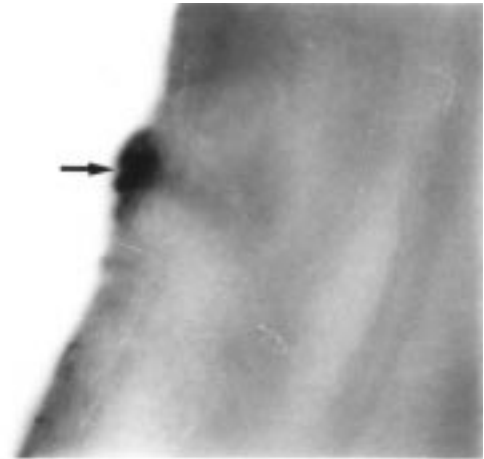
Şekil 1. IBV M41 ile infekte TOK'de yaygın, spesifik IP reaksiyonu (ok)X400.



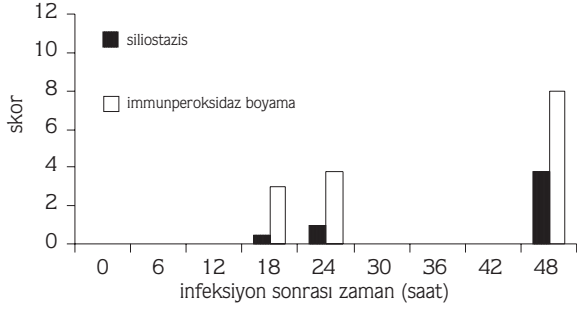
Şekil 2. 4,13 log<sub>10</sub> CD<sub>50</sub> ile infekte edilen TOK'lerinde immunperoksidaz reaksiyonu ve siliostazisin saptanma zamanı ve derecesi.



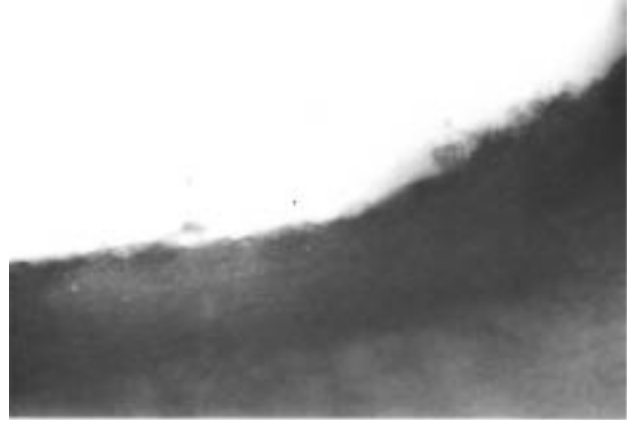
Şekil 3. 3,13 log<sub>10</sub> CD<sub>50</sub> ile infekte edilen TOK'lerinde immunperoksidaz reaksiyonu ve siliostazisin saptanma zamanı ve derecesi.



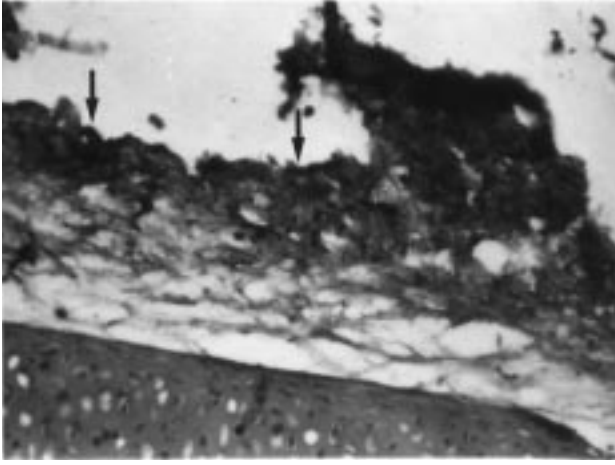
Şekil 4. IBV M41 ile infekte TOK'de düşük düzeyde spesifik IP reaksiyonu (ok)X400.



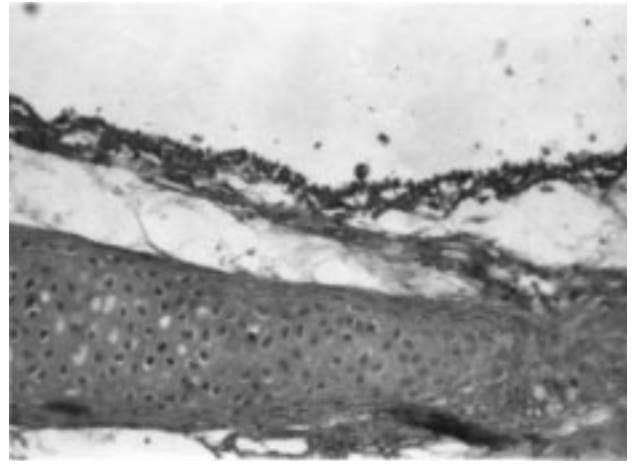
Şekil 5. 2.13 log<sub>10</sub> CD<sub>50</sub> ile infekte edilen TOK'lerinde immunperoksidadaz reaksiyonu ve siliostazisin saptanma zamanı ve derecesi.



Şekil 6. PBS ile inokule edilen TOK'de negatif IP reaksiyonu. X400.



Şekil 7. IBV M41 ile infekte TOK'den hazırlanan parafin doku kesitlerinde, epitel hücrelerde spesifik IP reaksiyonu (ok), X400.

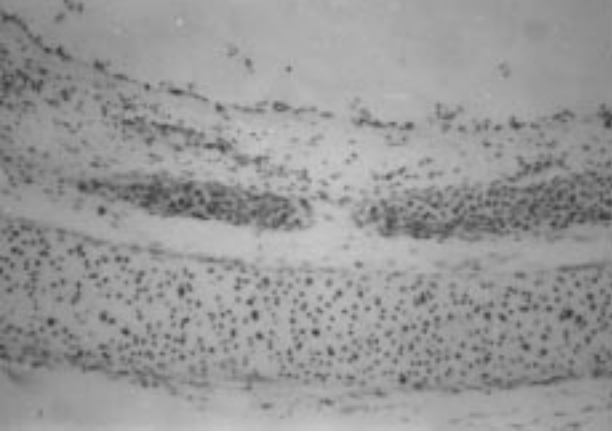


Şekil 8. PBS inokule edilen kontrol grubu TOK'lerine ait parafin doku kesitlerinde negatif IP reaksiyonu . X400.

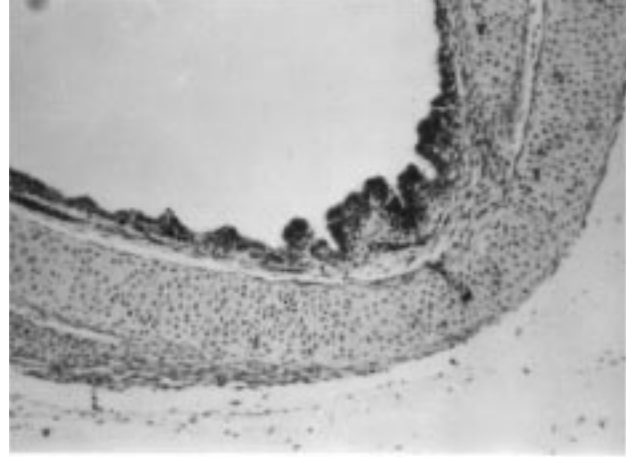
**Histopatolojik İnceleme Sonuçları:** IBV ile infekte edilen trakeal halkaların inokulasyondan 18, 24 ve 48 saat sonra yapılan histopatolojik incelemelerinde; lamina epitelyalisi oluşturur yalancı çok katlı prizmatik epitel hücrelerin kinosilyumlarının ortadan kaybolduğu, soluk eozinofilik sitoplazma ve piknotik çekirdeğe sahip bu hücrelerin yuvarlak bir görünüm aldığı dikkati çekti. Ayrıca bu dejenere hücrelerin yer yer epitel tabakadan ayrılıp, lümeneye döküldükleri tespit edildi. İnokulasyondan 48 saat sonra yapılan mikroskopik incelemede ise lamina epitelyalisin tek katlı yassı epitel halini aldığı ve yer yer tamamen dökülüp, ortadan kalktığı gözlemlendi (Şekil 9). PBS inokule edilen kontrol grubu trakeal halkalarda ise herhangi bir patolojik bulgu gözlenmedi (Şekil 10).

## Tartışma

IPT, birçok viral infeksiyonun tanısında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada IBV ile in vitro infekte edilmiş civciv trakeal organ kültürlerinden elde edilen fikze edilmemiş taze trakeal dokularda ve formalin ile fikze edilmiş parafin kesitlerde IPT uygulanmıştır. Bhattacharjee ve ark. (19) benzer olarak taze trakeal dokuda IFT ile IBV antijeninin varlığını ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar bu teknik ile yüksek titrede inokule edilen virusun trakeal halkalarda 24 saatten daha erken saptanabildiğini ve IF reaksiyonunun siliostazisten önce ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Naqi (23) ise, IBV ile infekte edilen SPF embriyolu yumurtaların CAM'larında viral antijeni inokulasyondan sonraki 15. saat içinde IP tekniği ile ortaya konduğunu rapor etmiştir. Bu çalışmada da IBV'nun 4,13 log<sub>10</sub> CD<sub>50</sub> ile infekte edilen trakeal



Şekil 9. IBV M41 inokule edilen TOK'lerinden hazırlanan kesitlerde, lamina epitelyaliste yassılaşıma ve epitel hücrelerinde belirgin kayıp .H.E. X200.



Şekil 10. PBS inokule edilen kontrol grubu TOK'ne ait kesitlerde epitelin normal yapısı , H.E. X200.

halkalarda inokulasyonun 18. saatinde reaksiyon optimal düzeyde saptandı. İnokulumdaki virus miktarının azalmasına paralel olarak IP reaksiyonları da gittikçe azalan düzeylerde gözlemlendi. Ayrıca tüm inokulasyon gruplarında IP reaksiyonları siliostazisten önce tespit edildi.

IBV'nun izolasyonu amacı ile TOK, embriyolu yumurtaya ve hücre kültürlerine tercih edilmekte ve trakeal halkaların siliar epitelinde üreyen virus, siliostazis oluşturmaktadır (8,16). IBV'nun siliostazis oluşturma gücü virusun serotipleri ve miktarı ile ilişkili olmakla birlikte, genellikle ilk 24 saatte başlayıp 3-4 günlük süre içinde trakeal halkanın % 100'ünde siliostazis görülmektedir (6,8,25). Bu çalışmada farklı miktarda IBV M41 ile inokule edilen trakeal halkalarda IP işlemi ile paralel olarak siliar aktivite de incelendi ve inokulumdaki virus miktarının azalmasına paralel olarak trakeal halkalardaki siliostazis oranlarının da azaldığı saptandı.

IPT ile hem kısa süre içinde sonuç alınmaktadır hem de virusun dokuda oluşturduğu değişiklikler incelenebilmektedir. Ancak bu çalışmada, IP boyama doku kesitleri yerine direkt trakeal halkalara uygulandığından ve trakeal halkaların kalınlığı oldukça fazla olduğundan trakeal epitelin yapısını inceleme olanağı olmadı. Ayrıca trakeal halkada endojen peroksidaz (EP) enziminin bulunması ve trakeal halkaların oldukça kalın yapıda olması nedeni ile teknikte EP'ı gidermek amacı ile kullanılan % 0,28'lik periyodik asit veya % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamaları yeterli olmadı ve trakeal halkalarda "background" boyanmalar giderilemedi. IP tekniğinde

background boyanmaların diğer bir sebebi ise testte kullanılan primer antikorlardır. Primer antikorların poliklonal özellikte olmasının non-spesifik boyanmalara neden olabileceği, monoklonal antikor kullanımı ile non-spesifik reaksiyonların önlenildiği bildirilmektedir (23,26). Ayrıca IPT uygulanan dokuya ait hayvan türünde hazırlanmış antiserum kullanımı da background boyanmalara neden olmaktadır. Bu çalışmada kullanılan primer antikor, IBV M41 suşunun 3-5 haftalık SPF piliçlere inokulasyonu ile elde edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan sekonder antikor ise keçiden elde edilmiş biyotin işaretli anti-tavuk IgG serumudur. Teknikteki background boyama nedenlerinden biri keçi serumundaki non-spesifik antikorlardır. Bunu gidermek için testin sekonder antikor kullanılan aşamasından hemen önce "blocking serum" (normal keçi serumu) kullanılmaktadır (27). Bu çalışmada da % 20'lik normal keçi serumu blocking amaçlı kullanıldı. Ancak background boyama üzerinde önemli bir etkisi gözlenmedi. Çalışmada kullanılan kromojenin inkubasyon süresinin kısa tutulması ile preparatlarda nonspesifik boyanmanın daha az görüldüğü ve spesifik boyanmaların da bu süreden etkilenmediği saptandı. Ayrıca yine trakeal dokuların kalın olması nedeni ile mikroskopik incelemede dokunun kalınlığı boyunca farklı derinliklerde spesifik boyanmaların olduğu ancak net gözlenemediği dikkati çekti. Bu da trakeal halkalarda IP tekniğinin değerlendirilmesini zorlaştırdı. Benzer problemler halkaların IF ile boyanmasında da saptanmıştır (19).

IBV'nun trakeal epitel dokudaki varlığının saptanmasında formalin ile fikze edilmiş veya

dondurulmuş trakeal doku kesitleri yaygın olarak kullanılmaktadır (23,26). Bu çalışmada IBV M41 ile in-vitro infekte edilmiş TOK'lerinden hazırlanan ve formalin ile fikse edilerek parafinle bloklanmış doku kesitleri kullanıldı. IBV M41 referens suşun  $4,13 \log_{10} (10^{-1})$  miktarı ile infekte edilen trakeal halkaların kesitlerinde, inkubasyonun 18., 24. ve 48. saatlerinde viral antijen saptandı. Trakeal doku kesitlerinde viral antijenin 18. saatte saptanması, IBV'nun TOK'nde çoğalması ile açıklanabilir. Naqi (23), IBV M41 ile intraokuler yolla infekte ettiği piliçlerin trakeal dokularında viral antijeni inokulasyondan 96 saat sonra tespit ederken aynı çalışmada, 9 günlük SPF embriyolu yumurtalara allantoik boşluk yolu ile inokule ettiği virüsü inokulasyondan 15 saat sonra tespit etmiştir. Viral antijenin saptanmasındaki bu süre farklılığının inokulumdaki virüsün embriyolu yumurtalarda daha kısa sürede çoğalmasına bağlı olduğu vurgulanmıştır.

Çalışmada  $4,13 \log_{10}$  IBV M41 ile inokule edilen TOK'lerinden inokulasyondan 18, 24 ve 48 saat sonra hazırlanan kesitlerin histopatolojik incelemesinde, yalnızca çok katlı prizmatik epitellerde kinosilyum kaybı, soluk eozinofilik sitoplazma, epitel hücrelerinde yuvarlaklaşma

ve deskuamasyon gözlemlendi. Pradhan ve ark. (20) ile Şen ve ark. (21) yaptıkları çalışmalarda, bu çalışmada elde edilen bulgulara benzer olarak, IBV ile infekte edilen TOK'lerinin histopatolojik incelemelerinde lamina epitelyalinin tek katlı yassı ve tek katlı kübik epitel yapıya dönüşmesi, epitel hücrelerde yer yer yuvarlaklaşma, çekirdeklerinde piknoz ve yaygın deskuamasyon ile kinosilyumlarda kayıp saptanmıştır.

Sonuç olarak; TOK'lerinde IP tekniği ile IBV'na ait spesifik reaksiyon 18. saatte saptanmıştır. Virüsün embriyolu yumurtalarda veya hücre kültürlerinde izolasyon ve identifikasyonunun aldığı süre dikkate alınırca, bu tekniğin oldukça zaman kazandırıcı olduğu açıktır. IP tekniğinin fikse edilmemiş-taze trakeal halkalara uygulanmasında zemin boyama problemi tam olarak giderilememiş, ancak kromojen ile inkubasyon süresi 2-3 dk uygulandığında non-spesifik boyanmaların oldukça azaldığı dikkati çekmiştir. Bu çalışmada, taze trakeal halkalardaki viral antijenin saptanmasına paralel olarak, doku kesitlerinde de benzer viral antijen tespitinin yapılması, her iki doku preparatının da IBV viral antijeninin ortaya konması amacı ile kullanılabileceğini göstermektedir.

## Kaynaklar

1. Cavanagh, D.: Recent Advances in Avian Virology. Br. Vet. J. 1992; 148: 199-222.
2. Dhinakar Raj, G., Jones, R.C.: Immunopathogenesis of Infection in SPF Chicks and Commercial Broiler Chickens of a Variant Infectious Bronchitis Virus of Economic Importance. Avian Pathol. 1996; 25: 481-501.
3. King, D.J., Cavanagh, D.: Infectious Bronchitis. Diseases of Poultry. Wolfe Publishing Ltd., London, 1991; 471-484.
4. Çöven, F.: Ege Bölgesinde Bazı Önemli Kanatlı Hastalıklarının Seroepidemiolojik Taraması. I. Uluslararası Tavukçuluk ve Tavuk Hastalıkları Sempozyumu, Manisa, 1988; 99-107.
5. Ergün, A., Çöven, F., Orhan, G., Karaçalı, S., Deveci, R.: İzmir ve Bursa Bölgesinde İnfeksiyöz Bronşitis Olaylarının Araştırılması ve İzolasyon Çalışmaları. Bornova Hay. Hast. Kont. Merk. Derg. 1994; 32: 29-46.
6. Şen, A., Çarlı, K.T., Çetin, C., Minbay, A.: Bursa Bölgesi Yumurta Tavuğu, Broiler ve Damızlık İşletmelerinde İnfeksiyöz Bronşitis Virüsünün İzolasyonu ve İdentifikasyonu. Veterinarium 1998; 9: 39-45.
7. Şen, A.: Yumurta Tavuğu, Damızlık ve Broiler İşletmelerinde İnfeksiyöz Bronşitisin Teşhisi ve Hastalığın Prevalansı. U.Ü. Sağlık Bil. Ens. Doktora Tezi, 1991.
8. Dhinakar Raj, G., Jones, R.C.: Infectious Bronchitis Virus: Immunopathogenesis of Infection in the Chicken. Avian Pathol. 1997; 26: 677-706.
9. Parsons, D., Ellis, M.M., Cavanagh, D., Cook, J.K.A.: Characterization of an Infectious Bronchitis Virus Isolated from Vaccinated Broiler Breeder Flocks. Vet. Rec. 1992; 131: 408-411.
10. Song, C.S., Lee, Y.J., Kim, J.H., Song, H.W., Lee, C.W., Izumiya, Y., Miyazawa, T., Jang, H.K., Mikami, T.: Epidemiological Classification of Infectious Bronchitis Virus Isolated in Korea between 1986 and 1997. Avian Pathol. 1998; 27: 409-416.
11. De Wit, J.J., Koch, G., Kont, A., Van Roozelaar, D.J.: Detection by Immunofluorescent Assay of Serotype-Specific and Group-Specific Antigens of Infectious Bronchitis Virus in Tracheas of Broilers with Respiratory Problems. Avian Pathol. 1995; 24: 465-474.
12. Handberg, K.J., Nielsen, O.L., Pedersen, M.W., Jorgensen, P.H.: Detection and Strain Differentiation of Infectious Bronchitis Virus in Tracheal Tissues from Experimentally Infected Chickens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. Comparison with an Immunohistochemical Technique. Avian Pathol. 1999; 28: 327-335.

13. Nakamura, K., Cook, J.K.A., Otsuki, K., Huggins, M.B., Frazier, J.A.: Comparative Study of Respiratory Lesions in Two Chicken Lines of Different Susceptibility Infected with Infectious Bronchitis Virus: Histology, Ultrastructure and Immunohistochemistry. *Avian Pathol.* 1991; 20: 241-257.
14. Cruz-Koy, J.S., Giamborne, J.J., Hoerr, F.J.: Immunohistochemical Detection of Infectious Bursal Disease Virus in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Chicken Tissues Using Monoclonal Antibody. *Avian Dis.* 1993; 37: 577-581.
15. Smyth, J.A., Platten, M.A., McFerran, J.B.: A Study of the Pathogenesis of Egg Drop Syndrome in Laying Hens. *Avian Pathol.* 1988; 17: 653-666.
16. Cook, J.K.A., Darbyshire, J.H., Peters, R.W.: The Use of Chicken Tracheal Organ Cultures for the Isolation and Assay of Avian Infectious Bronchitis Virus. *Arch. Virol.* 1976; 50: 109-118.
17. Colwell, W.M., Lukert, P.D.: Effects of Avian Infectious Bronchitis Virus (IBV) on Tracheal Organ Cultures. *Avian Dis.* 1969; 13: 888-894.
18. Otsuki, K., Huggins, M.B., Cook, J.K.A.: Comparison of the Susceptibility to Avian Infectious Bronchitis Virus Infection of Two Inbred Lines of White Leghorn Chickens. *Avian Pathol.* 1990; 19: 467-475.
19. Bhattacharjee, P.S., Naylor, C.J., Jones, R.C.: A Simple Method for Immunofluorescence Staining of Tracheal Organ Cultures for the Rapid Identification of Infectious Bronchitis Virus. *Avian Pathol.* 1994; 23: 471-480.
20. Pradhan, H.K., Mohanty, G.C., Rajya, B.S.: Comparative Sensitivities of Oviduct and Tracheal Organ Cultures and Chicken Embryo Kidney Cell Cultures to Infectious Bronchitis Virus. *Avian Dis.* 1983; 27: 594-601.
21. Şen, A., Ülgen, M., Mısırlıoğlu, D.: İnfeksiyöz Bronşitis Virusunun Trakeal Organ Kültürlerine Etkisi: Işık Mikroskopik İnceleme. *Etilik Vet. Mikrobiyol. Derg.* 1996; 8: 21-28.
22. Villegas, P., Purchase, H.G.: Titration of Biological Suspensions. In: *Isolation and Identification of Avian Pathogens*, AAAP, Creative Printing Co., Inc., NY, 124-128, 1980.
23. Naqi, S.A.: A Monoclonal Antibody-Based Immunoperoxidase Procedure for Rapid Detection of Infectious Bronchitis Virus in Infected Tissues. *Avian Dis.* 1990; 34: 893-898.
24. Jackson, P., Blythe, D.: Immunolabelling Techniques for Light Microscopy. In: *Immunocytochemistry*, Oxford University Press Inc., NY, 15-41, 1993.
25. Dhinakar Raj, G., Jones, R.C.: An In Vitro Comparison of the Virulence of Seven Strains of Infectious Bronchitis Virus Using Tracheal and Oviduct Organ Cultures. *Avian Pathol.* 1996; 25: 649-662.
26. Owen, R.L., Cowen, B.S., Hattel, A.L., Naqi, S.A., Wilson, R.A.: Detection of Viral Antigen Following Exposure of One-Day Old Chickens to the Holland 52 Strain of Infectious Bronchitis Virus. *Avian Pathol.* 1991; 20: 663-673.
27. Cho, B.R., Synder, D.B., Lona, D.P., Morquardt, W.W.: An Immunoperoxidase Monoclonal Antibody Stain for Rapid Diagnosis of Infectious Bursal Disease. *Avian Dis.* 1987; 31: 538-545.