

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİNDİ VE BROYLERDE *Ornithobacterium*
***rhinotracheale*'NİN İZOLASYONU VE**
İDENTİFİKASYONU ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Yasin AKOVA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE

2004

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİNDİ VE BROYLERDE *Ornithobacterium*
***rhinotracheale*'NİN İZOLASYONU VE**
İDENTİFİKASYONU ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Yasin AKOVA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. İ. Yavuz SEZEN

GEBZE
2004

ÖZET

Kanatlı hayvan endüstrisinde solunum sistemi hastalıkları çok önemli bir yer tutmaktadır. Solunum sistemi hastalıklarına yol açan bakterilerden biri de çok yakın bir zamana kadar tanımlanamamış olan *Ornithobacterium rhinotracheale*'dir. Bu çalışmada Kocaeli ili Gebze ilçesindeki tavuk ve hindi çiftliklerinden alınan hayvanlardan *Ornithobacterium rhinotracheale*'nin izolasyonu ve identifikasyonu yapıldı.

Çalışmanın laboratuvar çalışmaları Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarında, PROTEKT Hayvan Sağlığı ve Gıda Kontrol Hizmetleri Ltd. Şti. Laboratuvarlarında ve İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nde yapıldı.

Bu çalışmada 30 tavuk ve 20 hindinin tracheaları çıkarıldı ve incelendi. İncelenen bu trachelardan yapılan ekimler sonucu 2 adet *O. rhinotracheale* suşu izole edildi.

SUMMARY

Respiratory system diseases have a special importance in poultry industry. *Ornithobacterium rhinotracheale* is one of the bacteria causing respiratory system diseases. This bacterium has just been identified. In this study, *Ornithobacterium rhinotracheale* was isolated from broilers and identified. Broilers and turkeys were taken from poultry and turkey farms in Gebze, Kocaeli.

Experiments of this study were carried out G.Y.T.E. Biology Department laboratories, PROTEKT laboratories and Istanbul University Fisheries Faculty laboratories.

In this study, 30 broilers and 20 turkey's were taken out and analysed. Samples that were collected by swap from tracheas were inoculated on the sheep blood agar two ORT strains were isolated and identified from these tracheas samples.

TEŞEKKÜR

Sevgili hocam Prof. Dr. İ. Yavuz SEZEN'e, tavukların temininde yardımlarını esirgemeyen Vet. Hekim Fatih MISIRLI ve Vet. Hekim Sabri Saruhan Beye, tüm GYTE Mikrobiyoloji Laboratuar çalışanlarına, laboratuarlarını kullanıma açan PROTEKT Hayvan Sağlığı ve Gıda Kontrol Hizmetleri Ltd. Şti.'nden Uzman Veteriner Hekim Güney GÖKÇELİK Beye, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden Nesrin TURAN hanıma ve İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri fakültesinden Yrd. Doç. Dr. Süheyla KARATAŞ hocama yardımlarından ötürü sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmada beni yalnız bırakmayan, bana en büyük maddi ve manevi desteği veren meslektaşım ve arkadaşım Salih ULU'ya ve de her zaman yanımda olan sevgili eşime en derin şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	IV
SUMMARY	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XI
RESİMLER DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> 'nin Tarihçesi	3
2.2. <i>O. rhinotracheale</i> 'nin Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	5
2.3. Hastalığın Seyri	11
2.4. <i>O. rhinotracheale</i> Tanısı	14
2.5. Enfeksiyonun Kontrolü	15
2.6. Nekroskopi Bulgusu	15
3. MATERYAL VE METOD	18
3.1. Örneklerin Toplanması	18
3.1.2 Trachea Örneklerinin Alınması	18
3.2. Besiyerleri	19
3.3. Metod	20
3.3.1. Uygulama	20

3.3.2. Laboratuvar Testleri	21
4. BULGULAR	25
4.1. Bakteriyolojik İnceleme Sonuçları	25
4.2. Laboratuvar Test Sonuçları	29
5. TARTIŞMA	33

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AGID	Agar Gel Immunodifussion
AGP	Agar Gel Precipitation
CAV	Chicken Anemia Virus
ELISA	Enzyme Linked Immuno Assay
IB	İnfeksiyöz Bronşitis
NDV	Newcastle Disease Virus
ORT	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>
PGNR	Pleomorphic Gram Negative Rod
REOV	Reo Virus
TRT	Turkey Rhnotracheitis
TSIA	Triple Sugar Iron Agar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil

Sayfa

2.1. *O. rhinotracheale*'nin laboratuvar tanısında izlenecek basamakları

15

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>O. rhinotracheale</i> 'nin <i>Pasteurellaceae</i> , <i>Kingella</i> ve diğer gram negatif çomaklardan ayırımı.	6
2.2. <i>O. rhinotracheale</i> 'nin biyokimyasal özellikleri	10
2.3. <i>O. rhinotracheale</i> infeksiyonlarının görüldüğü yaşlar, mortalite ve hastalığın seyri	11
3.1. Trachea örneklerinin alındığı hindi ve broylerin, sayı, kaynak ve yaş bilgileri.	18
4.1. <i>O. rhinotracheale</i> izolatların kaynak, adeti zaman ve yaş bilgileri	25
4.2. İzole edilen. <i>O. rhinotracheale</i> suşlarının biyokimyasal test sonuçları	31
4.3. İzole edilen. <i>O. rhinotracheale</i> suşlarının Api 20 NE test kitinde saptanan biyokimyasal özellikleri	32
4.4. İzole edilen. <i>O. rhinotracheale</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları	34

RESİMLER DİZİNİ

<u>Resim</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Api 20 Ne değerlendirme cetveli	24
4.1. <i>O. rhinotracheale</i> kolonilerin 24 saatlik inkübasyondan sonraki makroskopik görüntüsü	26
4.2. <i>O. rhinotracheale</i> kolonilerin 48 saatlik inkübasyondan sonraki makroskopik görüntüsü.	26
4.3. <i>O. rhinotracheale</i> kolonilerin tipik plemorfik görüntüsü.	27
4.4. <i>O. rhinotracheale</i> kolonilerin tipik plemorfik görüntüsü.	27
4.5. <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> 'nin Api 20 NE test kitinde verdiği reaksiyonlar. (NO ₃ 'e çinko katılmadan önce)	28
4.6. <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> 'nin Api 20 NE test kitinde verdiği reaksiyonlar. (NO ₃ 'e çinko katıldıktan sonra)	28

1. GİRİŞ

Hızla gelişmekte olan kitle iletişim araçlarının toplumun hemen tüm kesimlerine ulaşması ile dengeli ve yeterli beslenme bilinci gelişmiştir. Bugünün ekonomik koşulları ve nüfus artışı dikkate alındığında hayvansal protein (besin) açığını en iyi kapatacak sektörün başında kümes hayvancılığı, bununda en gelişmiş dalı tavukçuluk gelmektedir.

Günümüzde insanların hayvansal kaynaklı gıdalarla beslenmesinde, kolesterolün damar tıkanıklıklarına ve çeşitli dolaşım bozukluklarına neden olması bakımından kırmızı et yerine beyaz et tercih edilir duruma gelmiştir.

Ülkemiz tavukçuluk sektörü, hayvancılığımız içerisinde en hızlı gelişen, modern teknolojiyi uygulamada bu konuda ileri ülkeler seviyesinde entegre tesislere sahiptir. Ülkemizde son yıllarda, broiler tipi kapalı alanda büyütülen hindi eti üretimine geçiş başlamıştır. Hindi yetiştiriciliği özel sektörün ilgisini çekmiş ve entansif şartlarda üretimler sürdürülmektedir.

Kanatlı hayvan yetiştiriciliği ülkemizde de dünyada olduğu gibi hızla gelişmekte, bu hızlı gelişme de bir takım sorunları beraberinde getirmektedir. Kümes hastalıkları tavuk ve hindi yetiştiricilerini ciddi bir şekilde etkilemektedir. İklim ve bakım koşulları gibi enfeksiyöz olmayan faktörler ile birlikte, bakteriyel (Blackall, 1999; da Rocha ve ark., 2002; Noormohammadi ve ark., 2002; Pruijboom ve ark., 1996), mikotik (Akan ve ark., 2002), viral (Alexander, 2000; Ignjatovic ve ark., 2002; McFerran and Adair, 1977; Swayne ve ark., 2001) ve paraziter etkenler solunum sistemi enfeksiyonlarının gelişmesine neden olmaktadır. Kümes hayvancılığı endüstrisinde solunum sistemi hastalıkları bulaşma riskini, ölüm oranlarını, sağaltım maliyetlerini arttırarak, et-yumurta-civciv çıkımlarını düşürerek ve kabuk kalitesini bozarak büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır(van Empel., 2002).

Birçok patojen primer rol oynayarak solunum sistemi hastalığına neden olduğu gibi, diğer farklı mikroorganizmalar ile sinerjik etki yaparak veya sekonder rol oynayarak da solunum sistemi rahatsızlığına neden olur.

Ornithobacterium rhinotracheale, tavuk ve hindilerde solunum sistemi hastalıklarına, büyümenin yavaşlamasına ve mortaliteye neden olan ve yakın zamanda isimlendirilen bir bakteridir. Bu kompleks ismi indirgemek üzere “ORT” kısaltması kullanılmaktadır. Tavuk ve hindilerde *Ornithobacterium rhinotracheale* enfeksiyonu, ünilateral veya bilateral pnömoni, plöritis ve hava kesesi yangısı ile karakterize olur. Hastalığa bağılı şiddetli lezyonlar öncelikle yaşı hayvanlarda, özellikle de damızlıklarda görülür. Damızlık hayvanların hastalığa yakalanması ile ekonomik kayıplar önemli boyutlara çıkabilir. Şu an insan sağığı açısından bir tehlike oluşturduğuna dair bir bilgi bulunmamaktadır(11).

Ekonomik yönden oldukça önemli olduğu saptanan ve kısa bir geçmişe sahip ORT enfeksiyonu ile ilgili çalışmalar ülkemizde yakın bir zamanda başlamıştır.

Bu çalışmada çiftliklerden alınan tavuk ve hindilerden çıkarılan trachealarda *Ornithobacterium rhinotracheale* enfeksiyonunun varlığı bakteriyolojik yöntemlerle saptanmaya ve yeni bir hastalık olan bu hastalığın Gebze çevresindeki durumu ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. *Ornithobacterium rhinotracheale*'nin Tarihçesi

Ornithobacterium rhinotracheale, izolasyonu ve identifikasyonu zor bir bakteri olduğu için, kanatlı hayvan popülasyonlarında uzun yıllardan beri bulunuyor olmasına karşın sekonder ve oportunistik bir bakteri olarak değerlendirilerek gözden kaçırılmış ve varlığı ancak 1994 yılında Vandame ve ark. tarafından ortaya konmuş ve isimlendirilmiştir (Vandamme P. ve ark., 1994).

1991 yılında Güney Afrika'da Jan DuPreez tarafından yeni bir solunum hastalığı gözlemlendi(van Beek ve ark., 1994). Diğerlerine nazaran daha hafif septomlar gösteren ve infekte broylerde aksırık ile başlayan, %3'lük mortalite ile seyreden, günlük büyümede yavaşlama ve gıda tüketiminde düşüş gibi klinik belirtilerle devam eden ve tipik nekroskopi bulguları olarak tek taraflı pnömoni, hava keselerinde özellikle de abdominal hava keselerinde köpüklü, kazeifiye bir eksudat görülmesi ile karakterize yeni bir solunum sistemi infeksiyonu olduğu tespit edildi. Bakteriyolojik incelemeler daha önce sınıflandırılmamış yavaş üreyen, pleomorfik, gram negatif ve çomak şeklinde bir bakteri olduğunu göstermiştir (van Beek P. ve ark., 1994).

1987 yılında Macaristan'da solunum hastalığı bulunan ördeklerden izole edilen *Pasteurella* benzeri bir bakteri ile Güney Afrika'da izole edilen bakterinin biyokimyasal incelemelerinde aynı bakteri olduğu ortaya çıkmıştır. Daha sonra 1991–1992 yıllarında Almanya'da tavuklardan elde edilen *R. anatipestifer* benzeri bakteri ile Macaristan ve Güney Afrika'da izole edilen bakterilerin aynı biyokimyasal özellikleri taşıdıkları görülmüştür (Hafez H.M. ve ark., 1993).

1992–1993 yıllarında da Hollanda ve Almanya'da bazı hindi sürülerinde yapılan klinik incelemelerde burun akıntısı, hapşıırma, gözlerde akıntı, infraorbital sinuslarında şişkinlik ile birlikte aşırı derecede büyüme geriliği tespit edilmiştir. Bazı çiftliklerde de ilaç tedavisine karşın ölümlerde sabit bir artış görülmüştür(15). Ayrıca hafif şiddetli solunum problemlerinin broylerde akut ölümlere sebep olduğu görülmüştür(13). Bu klinik bulgular 2–8 haftalık hindilerde ve 2–5 haftalık broylerde

şiddetli purulent pnömoni ile karakterizedir. Bu belirtiler *P. multocida* infeksiyonlarına benzemekle beraber çok erken dönemlerde görüldüğünden *P. multocida* infeksiyonlarından ayrılmaktadır(13)

Almanya'da solunum rahatsızlığı bulunan 6 hindi sürüsünden *Pasteurella* benzeri bakteri izole edildiği rapor edilmiştir (16). Yine Amerika'nın Kaliforniya eyaletinde bu pleomorfik gram negatif çubuklar (pleomorphic gram-negative rods; PGNR) tavuk ve hindilerden izole edilmiştir. En son Hollanda'da solunum rahatsızlığı bulunan hindi sürülerinden izole edilmiş ve ilkin *R. anatipestifer* olarak tanımlanmıştır. Fakat sonrasında izole edilen bakterinin Güney Afrika'da, Almanya'da ve Macaristan'da izole edilenle aynı koku ve biyokimyasal reaksiyonlara sahip olduğu tespit edilmiştir.

Başta bu yeni bakteri pleomorfik gram-negatif çomak (PGNR), *Pasteurella* benzeri (*Pasteurella*-like) veya *Kingella* benzeri (*Kingella*-like) olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra Bisgaard tarafından Taxon-28 olarak tanımlanan grup içerisinde sınıflandırılmıştır. Çeşitli ülkelerden temin edilen izolatların genetik taksonomik yöntemlerle incelenmesi sonucunda etken 1994 yılında Vandamme ve ark. tarafından rRNA süperfamilya V içinde bu bakteriyi sınıflandırmışlardır(13).

Almanya'daki kültür koleksiyonları incelendiğinde aslında *O. rhinotracheale*'nin 1981 ve 1983 yıllarında Glünder tarafından, solunum sistemi infeksiyonu bulunan 5 haftalık hindi sürülerinden izole edildiği ortaya çıkmıştır (Hinz KH. Ve Hafez HM., 1997). Yine 1986'da İngiltere'de orta şiddette öksürük ve tracheitis belirtileri görülen hindilerin trachealarından ve tavuk kolerasını andıran ünilateral pnömoni ve yüksek mortalite gösteren kümeslerdeki hayvanlardan, yine 1986'da İsrail'de akut eksudatif pnömoni ve hava kesesi yangısı bulunan değişik yaş gruplarındaki hindilerden, 1987'de Macaristan'da ördeklerden izole edildiği ortaya çıkmıştır. Ancak *O. rhinotracheale*'nin 1981'den önce izole edilmediği de rapor edilmiştir. Sonraki yıllarda etkenin Avusturya, Fransa, Kanada ve Japonya'da tavuk ve hindilerden izole edildiği bildirilmiştir(18,19,20,21).

2.2. *O. rhinotracheale*'nin Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

O. rhinotracheale Gram negatif, oldukça pleomorfik, çomak veya kokobasil şeklinde, hareketsiz ve sporsuz bir bakteridir (Tahseen AA, 1997). Mikroskopta 0,2–0,9 µm genişliğinde, 1–3 µm uzunluğunda kısa, şişkin çomakçıklar tarzında görülür. Kemoorganotrofik ve mezofilik bir metabolizmaya sahiptir. rRNA Süperfamilya V içerisinde yer alan, taksonomik olarak da *Cytophaga*, *Riemerella*, *Flavobacterium*, *Weeksella*, *Sporocytophaga* ve *Capnocytophaga* gibi cinsler ile yakınlık gösteren bir bakteridir. *O. rhinotracheale*'nin bu bakterilerden ayırımı Tablo 2.1.'de gösterilmiştir. *O. rhinotracheale* suşlarının Guanin+Sitozin içeriği %37–39 mol arasındadır. *O. rhinotracheale*'de pilus, fimbria, plazmid ve spesifik toksik aktivite yoktur (Hafez HM, 1998).

Gram boyama yöntemiyle görülebilen pleomorfik morfoloji *O. rhinotracheale*'nin en önemli özelliğidir. Bu özellik ORT'yi diğer benzer bakterilerden ayırmaktadır. Yapılan araştırmalar tüm *O. rhinotracheale* suşlarının aynı pleomorfik morfolojiyi gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. (Charlton ve ark., 1993)

Tablo 2.1. *O. rhinotracheale*'nin *Pasteurellaceae*, *Kingella* ve diğer gram negatif çomaklardan ayırımı (*Diseases of Poultry* , 9th ed.)

Testler	<i>Haemophilus paragallinarum</i>	<i>Riemerella Anatipestifer</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Pasteurella haemolytica</i>	<i>Pasteurella gallinarum</i>	<i>(Pasteurella) pseudotuberculosis</i>	<i>Actinobacillus spp.</i>	<i>Kingella spp.</i>	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>
Nitrat redüksiyon	+	-	+	+	+	+/-		+/-	-
Katalaz	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Oksidaz	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Üreaz	-	+/-	-	-	-	+	+/-	-	+/-
β -Galaktosidaz (ONPG)	+	-	+/-	-	+/-	+	+/-	-	+
Arjinin dehidrolaz	-	+	-		-		-	-	-/+
İndol	-	+/-	+	-	-	-	-	+/-	-
McConkey Agar'da üreme	-	-	-	-	-	+/-	+		-
Lisin dekarboksilaz	-		-		-	-	-	-	-
Ornitin dekarboksilaz	-		-		-	-	-	-	-
Fruktoz	+	-			+	+		-/+	+
Laktoz	-	-	-	+/-	-	-	+/-	-	+
Maltoz	+	-	+/-	+	+	+	+	+/-	+
Galaktoz	-	-	+		+	+	+/-	-	+

O. rhinotracheale aerobik, mikroaerobik veya anaerobik koşullarda ve 30–42 °C’ler arasında üreyebilmesine karşın, etkenin optimal üremesi %5 koyun kanlı agar (van Empel and Hafez, 1999), çikolata agar ve Columbia agarda, mikroaerobik koşullarda (%5–10 CO₂), 37 °C’de 48 saat içinde meydana gelir. *O. rhinotracheale* 24 saatlik inkübasyon sonunda 0,5–1 mm çapında toplu iğne başı büyüklüğünde koloniler oluşturur. 48 saatlik inkübasyon sonunda ise 1–3 mm çapında yuvarlak, konveks, yağlımsı görünümde, gri veya gri-beyaz renkte, bazen kırmızımsı parlaltı oluşturan kenarları düzgün, non-hemolitik koloniler meydana getirir. *O. rhinotracheale* kolonilerinin en tipik özellikleri agara zayıf yapışmalarıdır. Koloniler deforme olmadan bir öze yardımıyla agar yüzeyinde kaydırılabilir. Kültürlerin inkübasyonuna devam edilirse 96 saatten sonra kanlı agarda tam olmayan bir hemoliz meydana gelir (Roepke ve ark. 1998). *O. rhinotracheale* kendine has bütirik asit kokusuna sahiptir. Etkenin primer izolasyonunda koloni büyüklüğünde varyasyonlar gözlenirken, pasajlar sonucunda koloniler daha üniform bir durum alırlar. *O. rhinotracheale*’nin pleomorfik özelliği, sıvı besiyerlerinde üretildiğinde katı besiyerlerine göre çok daha belirgin olur. *O. rhinotracheale*’nin kültüründe sıvı besiyeri olarak serumla zenginleştirilmiş Todd Hewitt veya Brain Heart Infusion buyyon kullanılır. Ayrıca mikroorganizma pasteurella buyyon, peptonlu su ve tryptose soy agarda da üremektedir.

Araştırmacılar invitro üremenin yavaş olduğunu ve özellikle 24 saat sonunda koloniler küçük olması nedeniyle *E. coli*, *Proteus*, *Pseudomonas* türleri gibi hızla üreyen bakteriler tarafından üremenin maskelenebildiği, bu nedenle incelemelerde etkenin her zaman izole edilemeyeceğini bildirmişleridir (23). Back ve ark. *O. rhinotracheale* izolatlarının %90’nının gentamisine karşı direnç gösterdiğini bildirmişler, bu nedenle etkenin izolasyonu için mililitresine 10 µg gentamisin katılmış kanlı agarı önermişlerdir(23). van Empel (1997), *O. rhinotracheale* için selektif bir besiyerinin hazırlanmadığını, kontamine olmuş örneklerde hızlı üreyen bakterilerin üremesini baskılamak için koyun kanlı agara veya 5 µg/ml gentamisin ve 5 µg/ml polimiksin eklenmesinin iyi sonuç verdiğini belirtmiştir (van Empel and Hafez, 1999).

Primer izolasyon sırasında antibiyotiklere duyarlı %10 oranındaki suşların gözden kaçırılmaması için hem antibiyotikli hem de antibiyotiksiz koyun kanlı agara ekim yapılması önemlidir.

O. rhinotracheale MacConkey, Endo, Gassner veya Simmon's Sitrat agarda üreme meydana getirmez. Yatık Triple sugar iron agarda (TSIA) herhangi bir değişiklik göstermeksizin zayıf ürer. *O. rhinotracheale* izolatları katalaz negatif ve oksidaz pozitif özellik gösterirler. İndol testi negatif, β -D galaktosidaz testi pozitifdir. İzolatlar jelatini hidrolize etmezler fakat hepsi hyalurodinaz oluştururlar. *O. rhinotracheale* suşlarının karbonhidrat fermantasyon özelliklerinin incelenmesinde, %2 tavuk serumu ilave edilmiş, %1 oranında karbonhidrat içeren fenol red buyyon kullanılır. Değişken sonuçlar alınabilmesine karşın, izolatların büyük bir çoğunluğu glukoz, galaktoz, laktoz maltoz ve fruktozu fermente eder. İnositol, rafinoz, sorbitol, trehaloz ve xylose ise fermente edilemez. Biyokimyasal testlerin reaksiyonları 48–72 saatten önce görülmez (28,29). İzolatların büyük bir kısmı standart biyokimyasal testlerde reaksiyon oluşturmadığı için izolatların karakterizasyonları amacıyla API-NFT, API-ZYM ve API-20 NE gibi ticari sistemler geliştirilmiştir. Bu test sistemlerinde *O. rhinotracheale* alkalen fosfataz, esteraz, esteraz lipaz, lösin arylamidaz, valin arylamidaz, asit fosfataz, naftol-AS-Bi-fosfohidrolaz, α -glaktosidaz, β -galaktosidaz, α -glukosidaz ve N-asetil- β -glukozaminidaz gibi enzimler yönünden pozitif reaksiyon gösterir.

Bu testler içerisinde en çok tercih edilen API-20 NE test kitidir. *O. rhinotracheale* suşlarının API-20 NE sistemde potasyum nitrat (NO_3), triptofan (TRP), glukoz (GLU), eskulin (ESC), jelatin (GEL), arabinoz (ARA), mannoz (MNE), mannitol (MAN), N-asetil-glukozamin (NAG), maltoz (MAL), glukonat (GNT), kaprat (CAP), adipat (ADI), malat (MLT), sitrat (OT), fenil-asetat (PAC) testlerinin negatif, tetrametil-p-fenilen diamin (OX) ve p-nitro-fenil-pD-galaktopiranozid (PNG) testlerinin pozitif, arjinin dihidrolaz (ADH) ve üreaz (ÜRE) in değişken olabileceği belirtilmiştir (van Empel P., 1994).

O. rhinotracheale'nin agar jel immunodiffüzyon (AGID) ve ELISA teknikleri kullanılarak dünyanın değişik bölgelerinde tavuk ve hindilerden izole edilen 18 farklı serotipi (A-R) belirlenmiştir (van Empel, 2002). Bunlar arasında en yaygın

olanı A serotipidir. Her iki serolojik teknikle de A, B, ve F serotipleri arasında çapraz reaksiyonlar ekillenebilir. Œimdiye kadar hindilerden G serotipi ve tavuklardan da D ve F serotipleri izole edilememiştir. ABD’de ise tavuklardan sadece A ve C serotipleri izole edilmektedir. Araştırcılar tavuk izolatlarının % 95 inin serotip A, hindi izolatlarının % 57 sinin serotip A, % 23 ünün serotip B olduğunu bildirmişlerdir (van Empel ve ark., 1997). van Empel ve Hafez 443 *O. rhinotracheale* suş sayısını 1091 suşa çıkararak izolatların coğrafik orjin ve serotipleri arasındaki bağlantıyı ortaya koymuşlardır. Araştırcılar tavuk ve hindi izolatları içinde serotip A’nın baskın olduğunu belirtmişlerdir.

O. rhinotracheale’nin biyokimyasal zellikleri Tablo 2.2 de verilmiştir.

Tablo 2.2. *O. rhinotracheale*'nin biyokimyasal özellikleri(Turan, N., 2001)

Testler	Referans suşlar (N=18)
Oksidaz	+
Katalaz	-
Ureaz	+
İndol	-
Nitrat redüksiyonu	-
Metil-red	-
Voges-Proskauer	+
ONPG (P -galaktosidaz)	+
Arjinin dihidrolaz	+
Ornitin dekarboksüaz	-
Eskulin hidrolaz	-
Fenilalanin deaminaz	-
Jelatin	-
Kondrotin sülfataz	+
Hiyalunoridaz	+
Karbonhidratlardan asit oluşumu	
D (+) -glukoz	+
D (+) mannoz	+
D (-) fruktoz	+
Laktoz	+
D (+) galaktoz	+
N-asetil -glukozamin	+
Maltoz	+
Sukroz	-
Laktuloz	+
Dekstrin	+

2.3. Hastalığın Seyri

İnfeksiyonun yayılmasında en temel yol horizontal bulaşmadır. Yapılan saha çalışmalarında infeksiyöz aerosollerin soluk havası ile alınması sonucunda hava kaynaklı bulaşmanın oluşabileceğini gösterilmiştir. Doğal ve deneysel infekte hindilerin üreme organlarından ve yumurtalarından *O. rhinotracheale* izole edilmiş olması, infeksiyonun vertikal yolla da bulaşabileceğini göstermiştir.

O. rhinotracheale infeksiyonları doğal koşullarda tavuk ve hindilerde görülür. Etken ayrıca keklik, sülün, güvercin, ekin kargası, bıldırcın, ördek, Hint kekliği, deve kuşu, kaz ve beç tavuğu gibi kanatlı hayvanlardan da izole edilmiştir (Tahseen AA., 1997).

O. rhinotracheale genellikle 3–4 haftalık broylerde %2-10'luk ölüm oranı ile görülmektedir. Broyler damızlıklar ise infeksiyona en duyarlı kanatlılar olup infeksiyon daha çok 24–52 haftalıklarda seyretmektedir. Hindilerde daha çok 14 haftalıktan büyüklerde görülmesine rağmen 2–8 haftalıklarda da hastalık yapabilmektedir (Roepke ve ark., 1998).

Kanatlı hayvanlarda *O. rhinotracheale* infeksiyonlarının görüldüğü yaşlar, mortalite ve hastalığın seyri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.3. *O. rhinotracheale* infeksiyonlarının görüldüğü yaşlar, mortalite ve hastalığın seyri (van Empel, P. and Hafez, 1998).

	Yaş (hafta)	Mortalite (%)	Seyir (gün)
Hindi	>2	1–15	7–8
Broyler	3–4	2–10	5–8
Broyler Damızlık	24–52	1–3	>21

O. rhinotracheale infeksiyonlarında mortalite oldukça değişkenlik göstermektedir. Mortalite kötü bakım koşulları, yetersiz havalandırma, fazla

sayıda hayvan barındırma, kümes hijyeninin kötü olması, yüksek amonyak düzeyi, tekrarlayan infeksiyonlar ve sekonder infeksiyonlar gibi pek çok faktörlerden etkilenmekte ve duruma göre, yüksek veya düşük olarak seyredebilmektedir (van Empel ve Hafez,1999).

O. rhinotracheale infeksiyonlarında iklim faktörü oldukça önemlidir. Soğuk geçen kış aylarında solunum sistemi infeksiyonlarında bir artışın olduğu ve salgınların daha şiddetli seyrettiği bildirilmektedir. (23)

O. rhinotracheale, özellikle çevresel strese maruz kalmış, viral ya da bakteriyel bir patojen ile immun sistemi baskılanan hindi ve broilerlerde oldukça ciddi düzeyde infeksiyon oluşturabilmektedir (Mante, 1999).

O. rhinotracheale hem broiler hem de hindilerdeki olguların %80'inde *E. coli* infeksiyonu ile birlikte seyretmektedir. Tavuklarda *B. avium*, IBV, NDV'nun, broilerlerde CAV, IBV ve REOV gibi immunsupressif ajanların ve hindilerde de TRT virüsünün bulunması durumunda *O. rhinotracheale* infeksiyonlarının görülme sıklığında bir artış olduğu ve infeksiyonun çok daha ağır seyrettiği bildirilmektedir. Viral bir infeksiyonun bulunmadığı durumlarda tek başına *O. rhinotracheale* ile infekte tavuk ve hindilerde pnömoni ve hava kesesi yangısı meydana gelmeyebilirken, viral infeksiyonlar saha koşullarında *O. rhinotracheale* infeksiyonlarının seyrini şiddetlendirirler (Travers ve ark., 1996; Mante, 1999).

Deneyisel çalışmalarda *O. rhinotracheale* ile Newcastle, Turkey Rhinotacheitis (TRT), İnfeksiyöz Bronşitis (IB) gibi viral; *Escherichia coli*, *Bordetella avium* gibi bakteriyel etkenlerin birlikte verilmesinin infeksiyonun şiddetini artırdığı görülmüştür (Travers ve ark., 1996; van Empel ve ark., 1999).

Broilerlerde iklim ile hastalık arasındaki ilişki oldukça belirgindir. Özellikle soğuk geçen kış aylarında solunum sistemi infeksiyonlarında bir artışın olduğu ve salgınların daha şiddetli seyrettiği bildirilmektedir. Kanatlıların solunum sistemleri stres altına girdiği zaman *O. rhinotracheale*'ye duyarlılık artmaktadır (Hafez ve Sting, 1998).

Broyler piliçlerde subklinik seyir gösteren *O. rhinotracheale* infeksiyonları 3–4 haftalıktan büyük piliçlerde solunum sistemi hastalığı oluşturabilmesine karşın, tipik olarak hastalık tablosu daha ziyade 24–52 haftalar arasındaki damızlık broylerlerde, özellikle de yumurta veriminin pik yaptığı dönemde daha sık görülür.

Hindilerde *O. rhinotracheale* infeksiyonları 2 haftalık palazlarda görülmesine karşın, hastalığa bağlı en şiddetli lezyonlara 14 haftalıktan büyük hindilerde ve damızlıklarda rastlanır. Genelde, hastalık yaşlı hindilerde gençlere ve erkek hindilerde dişilere oranla daha şiddetli seyrederken her iki cinsiyette de ağır yapılı hayvanlar hastalıktan çok daha fazla etkilenirler.

Yumurta verimlerinin pik döneminde bulunan damızlık tavuklarda mortalite oranında hafif bir artış, yem tüketiminde azalma, orta şiddette solunum sistemi belirtileri ile birlikte yumurta veriminde azalma, yumurtanın kabuk kalitesinde bozulma ve yumurtaların boyutlarında da bir küçülme gözlenir. Genç hayvanlarda ise, hayvanlar 3–4 haftalık olduklarında orta şiddette solunum sistemi belirtileri, halsizlik, büyümede gecikme, mortalite oranında hafif bir artış ve kesim döneminde karkas telefatu görülmesi hastalık için oldukça tipik bulgulardır.

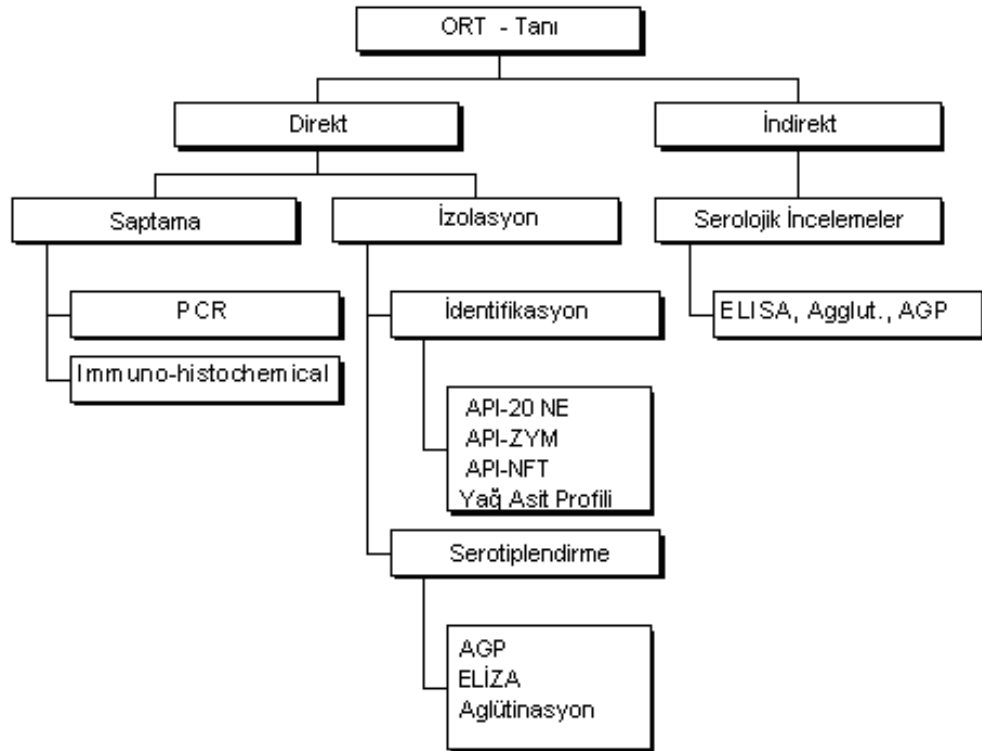
Hindilerde *O. rhinotracheale* infeksiyonu esas olarak akut solunum sistemi hastalığına neden olur. Hem ticari hem de damızlık hindilerde infeksiyon 5-haftalık veya daha yaşlı hayvanlarda görülür. Klinik belirtiler arasında aksırık, öksürük, hırıltılı soluma ve soluma güçlüğü gibi solunum sistemi belirtileri ve burun akıntısını takiben yüzde ödem ve infraorbital sinuslarda sinüsitis görülür. Hayvanlarda depresyon, tüylerde karışıklık, yem ve su tüketiminde azalma, bitkinlik, büyümede gecikme ve ağırlık kaybı gibi belirtilerin ardından mortalite artışı şekillenir. Daha yaşlı hindilerde ise sadece mortalite artışı görülebilir. Ölümden hemen önce hafif bir depresyon ve nefes almada zorluk, daha sonra belirgin bir nefes güçlüğü ve ağızdan kanlı mukus gelmesi şekillenir. Damızlık kümeslerde yumurta üretiminde %2–5 oranında bir azalma meydana gelebilir.

2.4. *O. rhinotracheale* Tanısı

O. rhinotracheale'nin direkt izolasyonu güçtür. Rutin incelemelerde *E. coli*, *Proleus spp.*, *Pseudomonas spp*, *Bacillus spp.* gibi hızlı üreyen mikroorganizmalar *O. rhinotracheale* kolonilerinin üzerini örtmekte ve nereyse *O. rhinotracheale* izolasyonunu imkansız hale getirmektedir. Mikrobiyolojik incelemeler için materyallerin erken dönemde alınması gerekmektedir (Hinz KH., 1997)

O. rhinotracheale ile solunum sistemi infeksiyonuna neden olan viral ve bakteriyel pek çok etkenin oluşturduğu semptomlar birbirlerine çok benzediklerinden dolayı teşhiste laboratuvar muayenelerinden yararlanılmaktadır (van Empel and Hafez, 1999). *O. rhinotracheale*'nin laboratuvar teşhisi direkt olarak izolasyon, indirekt olarak da serolojik yöntemler ve antikorların saptanması ile yapılabilmektedir. (Şekil 2.1.)

Şekil 2.1. *O. rhinotracheale*'nin laboratuvar tanısında izlenecek basamaklar(Hafez, 1998).



2.5. İnfeksiyonun Kontrolü

Kanatlı endüstrisinde ORT probleminin kontrolü bakterinin antibiyotiklere hızlı bir şekilde rezistans geliştirmesiyle güçleşmiştir. Hollanda'da ticari broilerlerden izole edilen türlerin %85'i amoksisilin, enrofloksasin, trimetoprim+sulfanamid ve oksitetrasiklin'lere karşı direnç geliştirmiştir. Bu türe karşı diğer antibiyotikler test edilmiş (ceftiorur, tilmikosin, tylosin, eritromisin içeren) ve sadece amoksisilin ve klavulonik asit kombinasyonu bakteriyel üremeyi engellemiştir. Bazı hindi kümeslerinde sadece bu enjekteable antibiyotiğin kullanılması ORT enfeksiyonunu durdurabilmiştir. Farklı antibiyotiklere karşı serotiplerin direnci çeşitlidir. Örneğin Almanya'da izole edilen türlerin %6'sı enrofloksasine hassas iken bütün Fransız suşları enrofloksasine hassastır. Çünkü ORT bakterisinin yaşam siklusu ve tekrar oluşması kümeden kümeye veya çiftlikten çiftliğe olduğu için üretim dönemleri arasında temizlik ve dezenfeksiyon önemlidir. Dezenfektanlar formik ve glyoxyl asit gibi organik asitler içeren ve ORT' yi kolayca inaktive etmek için içinde aldehit bulunan kimyasallardır(L. van Veen, 2000b).

2.6. Nekroskopi Bulgusu

Tavuk ve hindilerde dikkat çeken en önemli nekropsi bulgusu, akciğerlerde ödem, büyüme ve konsolidasyon ile birlikte plörada fibrinöz eksudat görülmesi ile karakterize olan, ünilateral veya bilateral fibrinoprulent pnömoni ve hava kesesi yangısıdır. Akciğerlerde zaman zaman sarı renkte nekroz alanları görülebilir. Şekillenen bu lezyonlar hindilerde ortaya çıkan tavuk kolerasında görülen lezyonlara benzer fakat şiddeti bunlardan azdır. Bu lezyonlara ek olarak hayvanlarda orta şiddette bir tracheitis ve sinüsitis, çok hafiften orta şiddete kadar değişebilen splenomegali ve hepatomegali, epikardiyumda hemoraji ve perikardiyal kesede bulanık sıvı birikimi de görülebilir. Çok ender olgularda peritoneal boşluklarda ve eklemlerde fibrinöz eksudat dikkat çekebilir. Bazı şiddetli olgularda ise, tracheitis ile birlikte trachea lumeninde kanlı mukus görülebilir. Broyler piliçlerde tipik olarak abdominal ve/veya torakal hava keselerinde kalın, sarı renkte ve köpüklü eksudat birikmesi ile karakterize hava kesesi yangısı şekillenir. Hayvanlarda ayrıca pnömoni ve şiddetli olgularda da tracheada

peynirimsi materyal bulunması ile karakterize şiddetli bir tracheitis oluşabilir. Hastalığın subklinik seyir gösterdiği broyler piliçlerde ise nekropside dikkat çeken yegane lezyon hava kesesi yangısıdır (11).

Histopatolojik lezyonlar en sık olarak akciğerler, plöra ve hava keselerinde görülür. Akciğerlerde konjestiyon ve büyük fibrin kümeleri dikkati çeker. Bu tablo ile birlikte, hava kapillarlarının ve parabronşların lumeninde makrofaj ve heterofil kümeleri ile birlikte, çoğunlukla makrofajlar ve bazen de heterofillerden oluşan belirgin interstisyel infiltratlar görülür. Parabronşların lümen çevresinde oluşan ve bitişikte bulunan parenkimaya kadar da uzanabilen yaygın koagülatif nekroz odaklarına da sıklıkla rastlanır. Nekrotik odaklar tipik olarak yoğun nekrotik, heterofilik infiltrat kümeleri veya içinde, lezyondan köken alan, küçük bakteri kümeleri bulunan eksudat ile dolu olarak görülür. Kapillar damarlar sıklıkla genişlemiştir ve içlerinde fibrin trombozları bulunur. Plöra ve hava keseleri belirgin bir şekilde genişlemiş ve ödematöz bir durum almış olabilir ve içlerinde interstisyel fibrin artıkları, diffuz heterofilik infiltrat, dağınık biçimde küçük nekrotik heterofiliik infiltrat ve fibrozis odakları bulunabilir (11).

Hastalıkta görülen solunum sistemi belirtileri, çok hafif bir formdan akut ve şiddetli bir forma kadar değişiklik gösterebilir. Genç hindi palazlarında hastalık *Bordetella avium* veya pnömoviruslar tarafından oluşturulan rinotracheitis ile karıştırılabilir. Hastalığın hafif solunum sistemi formunda hayvanlarda burun akıntısı, burun çekme, iştahın azalması, aşırı susama ve yemden yararlanmada düşüş gibi klinik belirtiler görülür. Hindilerde yüzde ödem ve infraorbital sinuslarda şişme de şekillenebilir. Hastalığın hindilerde görülen bir akut formunda, hayvanlarda ölüm şekillenmeden birkaç saat önce, depresyon, solunum güçlüğü, ağızdan kanlı mukus gelmesi ve baş bölgesinde siyanoz gibi belirtiler rapor edilmiştir. Hastalığın arasıra görülen septisemik formundaki klinik belirtiler Pasteurellosis'i andırmaktadır. Hindilerde omuz eklemi ve bacaklarda görülen lokomotor bozukluklar, erken enfeksiyonu takiben şekillenir ve daha ziyade 10 haftalıktan büyük hayvanlarda ortaya çıkar. Bazı sürülerde hasta hayvanların beyinlerinden etken izole edilebilmiştir. Hindilerde hastalığın daha hafif bir formunda ise yumurta veriminde normalinden daha yavaş bir artış ile birlikte yumurtlama dönemindeki hayvanlarda orta şiddette bir öksürük dikkati çekmiştir (11).

Hastalığın solunum formunda nekropsi bulgusu olarak akciğerlerde konsolidasyon ile birlikte hafif veya şiddetli bir bronkopnömoni ve hava kesesi yangısı görülür. Üst solunum sisteminde ise, arasıra kanla bulaşık halde bulunan aşırı bir mukus bulunur. Hastalığın lokomotor formunda da hasta eklem veya bacaklarda artritis, tendinitis ve sinovitis şekillenir (11).

Yetiştirme koşulları, çevrede fazla miktarda amonyak ve toz bulunması, aşırı kalabalık ve çevresel ısı gibi stres faktörleri ve aynı anda diğer patojenler tarafından oluşturulan infeksiyonlar ve immunosupresyon oluşturan çeşitli nedenler hastalığın şiddetini arttırmırlar (11).

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Örneklerin Toplanması

Ornithobacterium rhinotracheale'nin tracheadan izolasyonu için Gebze yöresindeki besi tavuk çiftliklerinden canlı tavuk ve Ömerli ilçesindeki hindi kesimhanesinden hindi kelleleri alındı. Alınan bu canlı tavuklar laboratuara getirilerek burada kesildi. Alınan tavuklar 3 farklı çiftlikten ve bu çiftliklerin farklı kümeslerinden toplandı. Hindiler ise Alphindi kesimhanesinden alındı. Toplanan hayvanlarla ilgili gerekli bilgiler veteriner hekimden veya yetiştiricilerden alındı.

3.1.1. Trachea Örneklerinin Alınması

Tavuk ve hindiden trachea örnekleri farklı şekilde alındı.

Tavuk çiftliklerinden alınan hastalık belirtisi gösteren canlı tavuklar hızlı bir biçimde Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Muallimköy Kampüsü Biyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirildi. Laboratuvarda hayvanlar kesilerek bekletilmeden tracheları çıkarıldı. Hayvanlar kesilirken tracheaların uzun olması için normal kesim yerlerinin biraz daha altından kesildi.

Hindilerden ise kelle örnekleri alındı ve trachealar kelle üzerinden çıkarılmadan buradan swap yoluyla ekim yapıldı. İncelenen örneklerin kaynak ve sayıları Tablo 3.1 de verilmiştir.

Tablo 3.1. Trachea örneklerinin alındığı hindi ve broylerin, sayı, kaynak ve yaş bilgileri.

Kaynak (Kocaeli)	Örnek Sayısı	Hayvanların yaşı
1 (tavuk)	5	40 günlük
2 (tavuk)	7	48 günlük
3 (tavuk)	7	48 günlük
4 (tavuk)	11	45 günlük
5 (hindi)	20	24 haftalık

Çiftliklerden alınan tavuklarda görülen klinik bulgular;

1. Büyüme geriliği, yeterli kiloya ulaşamama
2. Solunum bozukluğu
3. Baş bölgesinde şişme ve renk değişikliği
4. Göz çevresinde enfeksiyon

Alınan hindi örneklerinin kesimhaneden elde edilmesinden dolayı hindiler hakkında herhangi bir bilgi elde edilemedi.

3.2. Besiyerleri

Ornithobacterium rhinotracheale çok çabuk kontamine olan bir bakteri olduğu için kontaminasyonu azaltmak için gentamisinli ve izolasyon sırasında antibiyotiklere duyarlı %10 oranındaki suşların gözden kaçırılmaması için de gentamisinsiz koyun kanlı agara ekim yapıldı. Gentamisin olarak Genta® 160mg lık (İ.E. ULAGAY ilaç sanayi) ampul kullanıldı. Her bir ampul gentamisine eşdeğer gentamisin sülfat, Nipagin M, Nipazol M, sodyum metabisülfid, EDTA disodyum içermektedir. Koyun kanlı agarlardan % 7.5 luk gentamisinli ve gentamisinsiz ve %10 luk gentamisinli agar hazırlanarak kullanıldı.

İzole edilen suşların biyokimyasal özelliklerini saptamak için kullanılan besiyerleri ve test kitleri;

1. Sheep Blood Agar
2. MacConkey Agar
3. Endo Agar
4. Triple Sugar Iran Agar (TSIA)
5. Metil Red-Voges Proskauer (MR-VP)
6. Simmon's Sitrat agar
7. Buyyon
8. Jelatin Agar
9. Karbonhidrat fermentasyon test besiyerleri
10. BBL™ Dryslide™ Oxidase

11. BBL™ Dryslide™ Indole
12. BBL™ Oxi/Ferm Tube II test kiti
13. API-20 NE test kiti
14. Antibiyotik Diskler kullanıldı.

3.3. Metod

3.3.1. Uygulama

Laboratuara getirilen tavuklar kesilerek boyunları alındı. Boyunların alt taraflarından trachea çekilerek açığa çıkarıldı ve kesildi. Ortalama 4–6 cm lik trachea örnekleri steril edilmiş topluiğnelerle iki ucu kapatılacak şekilde strafor (köpük) üzerine yerleştirilerek gerdirildi. Gergin halde duran tracheaların orta kısımları spatül yardımıyla dağlandı. Dağlanan bölgede steril bir bistüri ile yaklaşık 2 cm’lik bir bölge açıldı. Steril bir swapla trachea mukozasından sürüntü örneği alındı. Hindilerden ise tracheaları çıkarılmadan steril bir swapla trachea mukozasından sürüntü örneği alındı. Alınan bu örnekler gentamisinli ve gentamisinsiz %7.5luk ve gentamisinli %10’luk defibrine koyun kanlı agara ekildi. Mikroaerobik koşullarda (mumlu kavanoz veya Anaeroculd A), 37 °C de 48 saat inkübe edildi. Kültürlerin ilk kontrolleri 24. saat sonunda yapıldı. 24 saat sonraki kontrollerde şüpheli görülen kolonilere gram boyama yapıldı. Gram boyama özellikleri şüpheli kolonilerden gentamisinli ve gentamisinsiz kanlı agara pasaj yapıldı. Eski ve yeni kültürler tekrar mikroaerobik ortamda inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda üreme göstermeyen kanlı agarlar değerlendirilmeye alınmayarak atıldı. 48 saatlik inkübasyon süresini tamamlayan kültürlerdeki şüpheli kolonilerin morfolojileri incelendi. Morfolojileri uygun olan kolonilere tekrar gram boyama yapıldı. Mikroskopik incelemede gram boyama özelliklerine göre ve pleomorfik gram-negatif çomak yapısına sahip şüpheli kolonilere katalaz ve oksidaz testi yapıldı. Gram boyama özellikleri, katalaz ve oksidaz test sonuçları uygun olan şüpheli kolonilerin 48 saatlik kültürlerinden MacConkey, Endo ve saf kültür elde etmek için tekrar gentamisinli ve gentamisinsiz agara pasajlar yapıldı. Ekim yapılan MacConkey ve Endo agarlar 37 °C de

mikroaerobik koşullarda 72 saat inkübasyona bırakıldı. Mikroorganizmaların üreme durumu kontrol edildi.

Saf kültürleri elde edilen şüpheli izolatların identifikasyonu için biyokimyasal test besiyerlerine ekimler yapıldı.

3.3.2. Laboratuvar Testleri

3.3.2.1. Katalaz Testi

%3'lük hidrojen peroksit hazırlandı. Lam üzerine 1 damla hazırlanan hidrojen peroksitten damlatıldı. 48 saatlik kültürlerden birkaç koloni hidrojen ile süspanse edildi. Gaz kabarcıklarının oluşumu pozitif, kabarcıkların oluşmaması negatif olarak değerlendirildi.

3.3.2.2. Oksidaz Testi

Oksidaz testi için BBL™ Dryslide™ Oxidase kullanıldı. 48 saatlik kültürden öze yardımıyla alınan birkaç koloni BBL™ Dryslide™ Oxidase üzerine sürüldü. 10 saniye içinde mor rengin görülmesi pozitif, mor renk görülmemesi ise negatif olarak değerlendirildi.

3.3.2.3. Sitrat Kullanım Testi

Şüpheli kolonilerden sitrat besiyerine ekimler yapıldı. Mikroaerobik koşullarda 37 °C de 72 saat inkübasyona bırakıldı. Üreme ve renk değışikliğı kontrol edildi.

3.3.2.4. Triple Sugar Iron Agar (TSIA) Testi

Şüpheli kolonilerden TSI agara ekimler yapıldı. Mikroaerobik ortamda 37 °C de 48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. TSIA da üreme, besiyerinin dip ve yüzeyindeki renk değışikliğı kontrol edildi.

3.3.2.5. İndol Testi

Şüpheli kolonilerden Nutrient buyyona ekimler yapıldı. Mikraerobik ortamda, 37 °C de 72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

Ayrıca hazır BBL™ Dryslide™ Indole testi kullanıldı. Şüpheli kolonilerin 48 saatlik kültüründen öze yardımıyla alınan birkaç koloni bu test şeritlerine sürüldü ve renk değişimine göre sonuçlar değerlendirildi.

3.3.2.6. Karbonhidrat Fermantasyon Testleri

O. rhinotracheale şüpheli kolonilerden glukoz, galaktoz, fruktoz, maltoz, laktoz, ksiloz, trehaloz ve rafinoz içeren karbonhidrat fermentasyon besiyerlerine ekimler yapıldı. Mikroaerobik ortamda, 37 °C de 7 gün süre ile inkübe edildi. İndikatörün renk değişimine göre sonuçlar değerlendirildi. Sarı rengin oluşması pozitif, rengin değişmemesi ise negatif olarak kabul edildi.

3.3.2.7. Metil Red–Voges Proskauer (MR-VP) Testi

Şüpheli kolonilerden MR-VP buyyona ekimler yapıldı. Mikroaerobik ortamda, 37 °C de 72 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.

3.3.2.8. Jelatin Hidrolizasyon Testi

Şüpheli kolonilerden jelâtin besiyerlerine ekimler yapıldı. Mikroaerobik ortamda, 37 °C de 72 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. 72 saat sonunda tüpler +4 °C de buzdolabına kaldırıldı. Yarım saat sonunda katılaşmanın olup olmamasına bakıldı.

3.2.2.9. MacConkey Agar'da Üreme

MacConkey agara, mikroorganizmanın 48 saatlik kültüründen ekimler yapıldı. Mikroaerobik ortamda, 37 °C de 72 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. 48 ve 72 saatin sonunda mikroorganizmanın üreme durumu kontrol edildi. Besiyerinde

herhangi bir üreme görülmemesi *O. rhinotracheale* yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Charlton ve ark., 1993).

3.2.2.10. Endo Agar'da Üreme

Endo agara, mikroorganizmanın 48 saatlik kültüründen ekimler yapıldı. Mikroaerobik ortamda, 37 °C de 72 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. 48 ve 72 saatin sonunda mikroorganizmanın üreme durumu kontrol edildi. Besiyerinde herhangi bir üreme görülmemesi *O. rhinotracheale* yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Charlton ve ark., 1993).

3.2.2.11. BBL™ Oxi/Ferm Tube II Testinin Yapılması

Şüpheli izolatların 48 saatlik kültürlerinden BBL™ Oxi/Ferm Tube II hazır test kitine ekimler yapıldı. Daha sonra mikroaerobik ortamda, 37 °C 24–48 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.2.12. Api 20 NE Testinin Yapılışı

Kanlı agarda üremiş 48 saatlik *O. rhinotracheale* şüpheli saf kültürdeki kolonilerden yeterli miktarda Suspension Medium içeren tüpe koyuldu ve homojenize edildi. Bakteri yoğunluğu Mc Farland 0.5'e ayarlandı. Bu süspansiyondan şırınga yardımıyla alınarak test tüplerindeki NO₃, TRP, GLU, ADH, URE, ESC, GEL ve PNPG bölmelerine kabarcık oluşturmayacak şekilde konuldu. AUX mediumu içeren tüp açılarak kalan Suspension mediumdan 200 µl ilave edildi. Bu süspansiyondan kabarcık oluşturmamasına dikkat edilerek GLU, ARA, MNE, NAG, MAL, GNT, CAP, ADI, MNT, CIT ve PAC bölmelerine konuldu. Altı çizili GLU, ADH ve URE bölmelerine üst kısmı konveks olana kadar mineral yağ ilave edildi. Nemli ortam sağlamak için test şeritlerinin kutularına bir miktar distile su ilave edildi. Kapağı kapatılan test şeritleri 30 °C de aerobik koşullarda 48 saat süreyle inkübasyona bırakılarak 48 saat sonunda tüm testlerin sonuçlarına bakıldı ve değerlendirmeye alındı.

NO₃ testi için 1 damla NIT 1 ve 1 damla NIT 2 ayıraçlarından test tüpüne ilave edildi. 5 dakika sonra pembe-kırmızı rengin oluşması pozitif, renk değişmemesi negatif olarak değerlendirildi. (Resim 4.5). Nitrojen üretimi nedeniyle negatif reaksiyon oluşabileceği için bir miktar çinko tozu NO₃ tüpüne ilave edildi. 5 dakika sonra pembe renk negatif, renk oluşmaması pozitif olarak değerlendirildi. (Resim 4.6).

TRP testi için 1 damla James ayırıcı TRP tüpüne damlatıldı. Hemen pembe rengin oluşması pozitif, soluk yeşil, sarı veya renksiz görünümü negatif olarak değerlendirildi.

Asimilasyon Testleri

GLU, MAL, ARA, GNT, MNE, CAP, MAN, ADI, NAG, MLT, CIT, PAC test tüplerinde opak görünüm pozitif, transparent görünüm negatif olarak değerlendirildi.

Api 20 NE Testinin Değerlendirilmesi

Toplam 7 gruptan oluşan ve her biri biyokimyasal özelliği saptayan 3 test sırasıyla 1, 2, ve 4 olarak numaralandırılmış, pozitif reaksiyonlara denk gelen sayı o testin değerini oluşturmuştur (Resim 3.1). Eğer testin sonucu negatif ise verilecek değer “sıfır” olarak belirtilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde her bir grup içindeki sayılar toplandı ve 7 gruba ait bir sayı elde edildi. Değerlendirme cetvelinde 21. reaksiyon olan oksidaz testi ayrı olarak yapılarak sonuca sonradan ilave edildi.

The image shows the Api 20 NE test result chart. It includes a header with the product name 'Api 20 NE', a reference number '07224 A', and the bioMérieux logo. The chart is organized into columns for 21 different biochemical tests: NO₃, TRP, GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNG, IGLU, IARA, IMNE, IMAN, INAG, IMAL, IGNT, ICAP, IADI, IMLT, ICIT, IPAC, and OX. Each test has two rows for results: 24h and 48h. The results are recorded in a grid where each cell contains a number (1, 2, or 4) representing the test result. The OX test is shown separately at the end of the chart.

Test	24h	48h
NO ₃	1	2
TRP	4	1
GLU	2	4
ADH	1	2
URE	4	1
ESC	2	4
GEL	1	2
PNG	4	1
IGLU	2	4
IARA	1	2
IMNE	4	1
IMAN	2	4
INAG	1	2
IMAL	4	1
IGNT	2	4
ICAP	1	2
IADI	4	1
IMLT	2	4
ICIT	1	2
IPAC	4	1
OX	2	4

Resim 3.1. Api 20 Ne değerlendirme cetveli.

3.2.2.13. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testleri %5 koyun kanlı agarda yapıldı. Antibiyotik duyarlılık testlerinde Kanamycin, Ciprofloxacin, Gentamicin, Netilmicin, Tetracycline, Aztreonam, Cefotaxime, Ampicillin, Erythromycin, Streptomycin, Amoxycillin, Lincomycin, Azlocillin, Amoxycillin (Oxoid) disklerinden yararlanıldı. 24 saatlik inkübasyondan sonra petrilerdeki inkübasyon zon çapları cetvel ile ölçüldü ve değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çiftliklerden alınan 30 tavuk ve 20 hindiden çıkarılan trachea örneklerinden 2 tane *O. rhinotracheale* suşu izole ve identifiye edildi. Her iki suş ta tavuklardan izole edildi. *O. rhinotracheale* izole edilen tavukların, yaş, kaynak ve izolasyon zamanı Tablo 4.1 de verilmiştir.

Tablo 4.1. *O. rhinotracheale* izolatların kaynak, adeti zaman ve yaş bilgileri.

Kaynak (Kocaeli)	İzolasyon Sayısı	İzolasyon Zamanı	Hayvanların yaşı
2	2	Mart	48 günlük

İzole edilen tavuklarda klinik incelemede aşırı derecede zayıflık, solunum güçlüğü ve göz çevresinde enfeksiyon oluşumu gözlenmişti.

4.1. Bakteriyolojik İnceleme Sonuçları

Gentamisinli ve gentamisinsiz kanlı agara yapılan ekimlerin 24 saatlik inkübasyonu sonunda iğne ucu biçiminde, çok küçük, gri, gri-beyaz renkte ve yağlı görümlü koloniler *O. rhinotracheale* şüphesi ile ayrıldı. Bu kolonilerden hazırlanan Gram boyalı preparatlar mikroskopta incelendi. Gram negatif ve değişik büyüklükte (pleomorfik) tipik görüntülü kısa basilleri içeren koloniler şüpheli olarak kabul edildi ve bu kolonilerden pasajlar yapıldı. Pleomorfik yapıya sahip olmayan kolonilerden ise pasajlar yapılmadı. Bu şüpheli pleomorfik Gram negatif çomak (PGNR) şeklindeki mikroorganizmalardan %7,5 luk gentamisinli ve gentamisinsiz kanlı agara, MacConkey ve Endo agara ekimler yapıldı. Pasajlanan şüpheli bakteriler 24, 48 ve 72 saat sonunda kontrol edildi. 24 saatlik inkübasyon sonunda pasajlar kontrol edildiğinde iğne ucu büyüklüğünde gri, gri-beyaz koloniler görüldü (Resim 4.1). 48 saatlik inkübasyon süresini tamamlayan pasajlardaki *O. rhinotracheale* şüpheli kolonilerin 1–3 mm çapında, düzgün kenarlı, gri, gri-beyaz renklerde, non-hemolitik olduğu görüldü (Resim 4.2). Bu şüpheli kolonilerden tekrar Gram boyama hazırlandı ve *O. rhinotracheale*'nin tipik görüntüsünü veren pleomorfik Gram negatif çomaklar (PGNR) mikroskobik bakıda tekrar görüldü (Resim 4.3, 4.4). 72

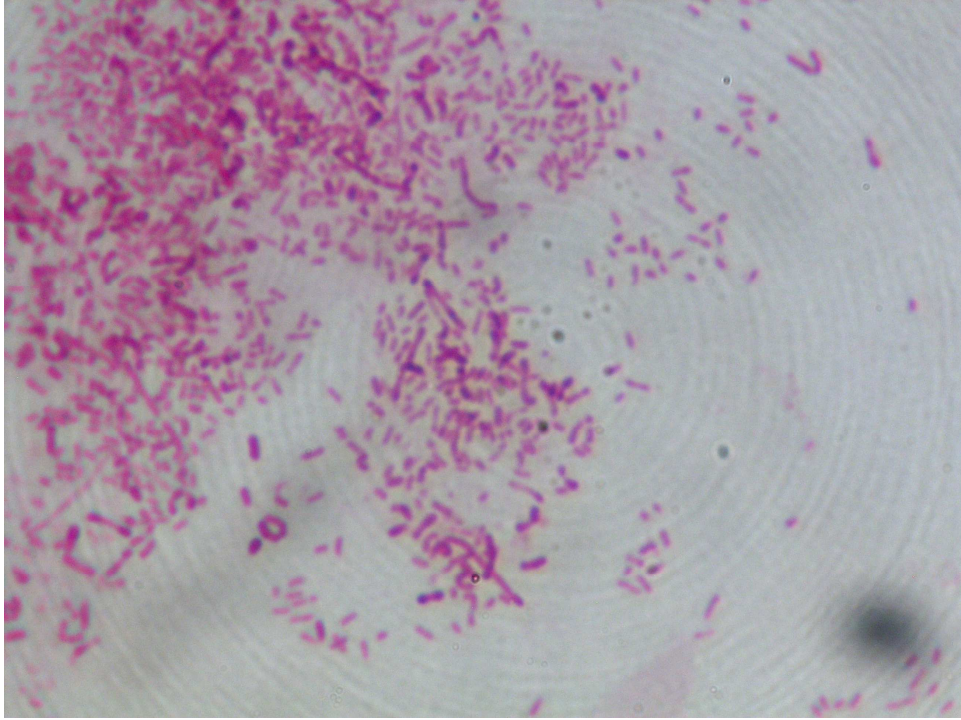
saat sonunda da kontrol edilen MacConkey ve Endo agarda üreme olmaması *O. rhinotracheale* şüphesini arttırdı. Bu özelliklere sahip 2 farklı hayvandan izolasyon yapıldı.



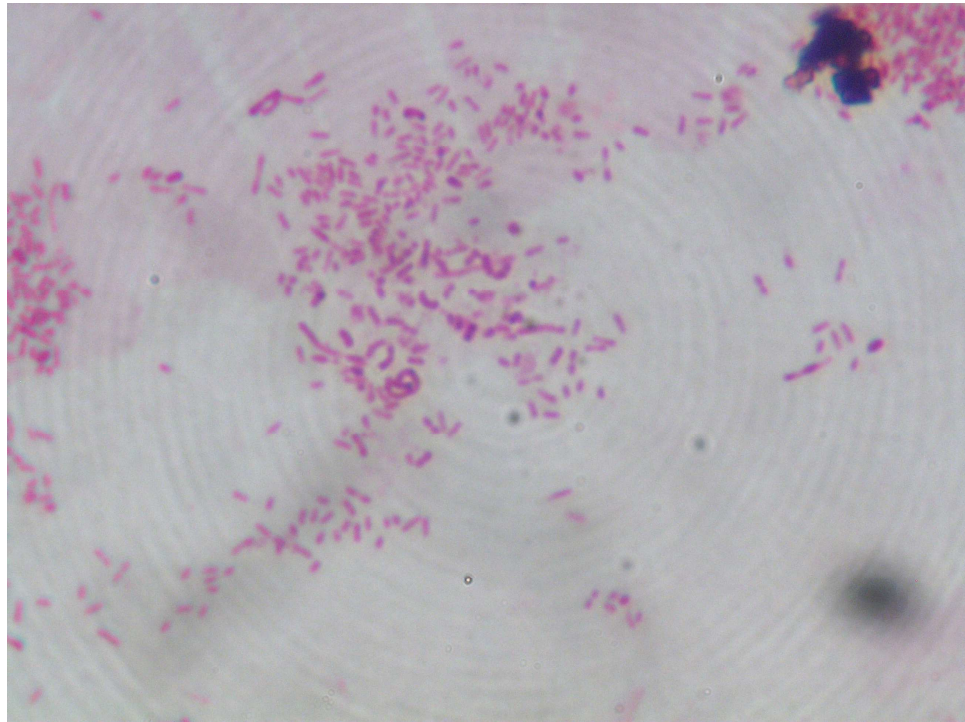
Resim 4.1. *O. rhinotracheale* kolonilerin 24 saatlik inkübasyondan sonraki makroskopik görüntüsü.



Resim 4.2. *O. rhinotracheale* kolonilerin 48 saatlik inkübasyondan sonraki makroskopik görüntüsü.



Resim 4.3. *O. rhinotracheale* kolonilerin tipik plemorfik görüntüsü. (Gram boyama, X1000)



Resim 4.4. *O. rhinotracheale* kolonilerin tipik plemorfik görüntüsü. (Gram boyama, X1000)



Resim 4.5. *Ornithobacterium rhinotracheale*'nin Api 20 NE test kitinde verdiği reaksiyonlar. (NO_3 'e çinko katılmadan önce)



Resim 4.6. *Ornithobacterium rhinotracheale*'nin Api 20 NE test kitinde verdiği reaksiyonlar. (NO_3 'e çinko katıldıktan sonra)

4.2. Laboratuvar Test Sonuçları

4.2.1. Katalaz Test Sonuçları

%3'lük hidrojen peroksit kullanılarak yapılan katalaz testinde kabarcıklar oluşmadı ve sonuç negatif olarak bulundu (Tablo 4.2.).

4.2.2. Oksidaz Test Sonuçları

BBL™ Dryslide™ Oxidase testleri üzerine konulan 2 suş ta kısa sürede koyu mor renk oluşturdu ve kuvvetli pozitif oldukları tespit edildi (Tablo 4.2.).

4.2.3. Sitrat Kullanım Test Sonuçları

Şüpheli kolonilerden sitrat besiyerlerine yapılan ekimler 72 saatin sonunda kontrol edilerek besiyerinde üreme olmadığı görüldü (Tablo 4.2.).

4.2.4. Triple Sugar Iron Agar (TSIA) Test Sonuçları

İzole edilen suşlar TSIA'da çok zayıf üreme gösterdiler. Besiyerlerinde herhangi bir değişikliğe rastlanmadı (Tablo 4.2.)

4.2.5. İndol Test Sonuçları

Şüpheli kolonilerden Nutrient buyyona yapılan ekimler 72 saat sonunda kontrol edildiğinde besiyerinde üreme olmadığı görüldü ve bundan dolayı bu testten de yararlanılamadı. Bunun üzerine hazır BBL™ Dryslide™ Indole testi kullanıldı. Test ortamında herhangi bir renk değişimi olmadı ve sonuç negatif olarak kabul edildi (Tablo 4.2.).

4.2.6. Karbonhidrat Fermantasyon Test Sonuçları

O. rhinotracheale şüpheli kolonilerden glukoz, galaktoz, fruktoz, maltoz, laktoz, ksiloz, trehaloz ve rafinoz içeren karbonhidrat fermentasyon besiyerlerine yapılan ekimler 7 gün sonunda kontrol edildi. İzolatların galaktoz, fruktoz, maltoz ve laktoz ile pozitif, ksiloz, trehaloz ve rafinoz ile negatif sonuç verdiği saptandı (Tablo 4.2.).

4.2.7. Metil Red–Voges Proskauer (MR-VP) Test Sonuçları

Şüpheli kolonilerden MR-VP buyyona yapılan ekimler 72 saat sonunda kontrol edildi. İzolatların bu Besiyerinde de üremedikleri saptandı (Tablo 4.2.).

4.2.8. Jelatin Hidrolizasyon Test Sonuçları

Şüpheli kolonilerden jelatin besiyerlerine yapılan ekimler 72 saat sonunda kontrol edildi. İzolatların bu besiyerinde de üremedikleri saptandı (Tablo 4.2.).

4.2.9. MacConkey Agar'da Üreme

MacConkey agara ekilen şüpheli izolatların 72 saat sonunda yapılan kontrollerinde bu besiyerinde üremedikleri saptandı (Tablo 4.2.).

4.2.10. Endo Agar'da Üreme

Endo agara ekilen şüpheli izolatların 72 saat sonunda yapılan kontrollerinde bu besiyerinde üremedikleri saptandı (Tablo 4.2.).

4.2.11. BBL™ Oxi/Ferm Tube II Test Sonuçları

24 saatin sonunda BBL™ Oxi/Ferm Tube II hazır test kitinde üreme olmaması sebebiyle 24 saat daha inkübasyona bırakıldı. 48 saat sonunda da üreme olmadığı tespit edildi. Bunun üzerine test tekrar edildi. İkinci bir 48 saatin sonunda da *O. rhinotracheale* yine üreme göstermediğinden *O. rhinotracheale*'nin BBL™ Oxi/Ferm Tube II'de üreme gösteremediği kanaatine varıldı ve bu test kitinden yararlanılamadı.

Tablo 4.2. İzole edilen. *O. rhinotracheale* suşlarının biyokimyasal test sonuçları

Testler	İzole edilen suşlar	
	7	11
Katalaz	Negatif	Negatif
Oksidaz	Pozitif	Pozitif
MacConkey'de üreme	Üreme yok	Üreme yok
Endo A.'da üreme	Üreme yok	Üreme yok
TSIA	Çok zayıf üreme	Çok zayıf üreme
Simmon's Sitrat A.	Üreme yok	Üreme yok
İndol (Besiyeinde)	Üreme yok	Üreme yok
İndol	Negatif	Negatif
MR-VP	Üreme yok	Üreme yok
Jelatin Agar	Üreme yok	Üreme yok
Glukoz	Pozitif	Pozitif
Galaktoz	Pozitif	Pozitif
Fruktoz	Pozitif	Pozitif
Maltoz	Pozitif	Pozitif
Laktoz	Pozitif	Pozitif
Ksiloz	Negatif	Negatif
Trehaloz	Negatif	Negatif
Rafinoz	Negatif	Negatif

4.2.12. Api 20 NE test sonuçları

Api 20 NE test kitinde izolatların 48 saat sonunda göstermiş olduğu aktiviteler Tablo 4.3 de verilmiştir. Buna göre her iki izolat ta değerlendirme kriterlerine göre 0-0-2-0-0-0-4 kodlarını vermiş ve ORT oldukları saptanmıştır.

Tablo 4.3. İzole edilen. *O. rhinotracheale* suşlarının Api 20 NE test kitinde saptanan biyokimyasal özellikleri

Testler	İZOLATLAR	
	7	11
NO₃	Negatif	Negatif
TRP	Negatif	Negatif
<u>GLU</u>	Negatif	Negatif
<u>ADH</u>	Negatif	Negatif
<u>URE</u>	Negatif	Negatif
ESC	Negatif	Negatif
GEL	Negatif	Negatif
PNPG	Pozitif	Pozitif
GLU	Negatif	Negatif
ARA	Negatif	Negatif
MNE	Negatif	Negatif
MAN	Negatif	Negatif
NAG	Negatif	Negatif
MAL	Negatif	Negatif
GNT	Negatif	Negatif
CAP	Negatif	Negatif
ADI	Negatif	Negatif
MLT	Negatif	Negatif
CIT	Negatif	Negatif
PAC	Negatif	Negatif
OX	Pozitif	Pozitif

4.2.13. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

İzole edilen iki *O. rhinotracheale* suşunun antibiyotik duyarlılık test sonuçları Tablo 4.4.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. İzole edilen. *O. rhinotracheale* suşlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları.

Antibiyotik	İzole edilen Şuşların Duyarlılıkları
Kanamycin	Dirençli
Ciprofloxacin	Dirençli
Gentamicin	Dirençli
Netilmicin	Dirençli
Streptomycin	Dirençli
Tetracycline	Duyarlı
Aztreonam	Duyarlı
Cefotaxime	Duyarlı
Ampicillin	Duyarlı
Erythromycin	Duyarlı
Streptomycin	Duyarlı
Amoxycillin	Duyarlı
Lincomycin	Duyarlı
Azlocillin	Duyarlı

Şuşların tümünün Kanamycin, Ciprofloxacin, Gentamicin, Netilmicin ve Streptomycin'e karşı dirençli; Tetracycline, Aztreonam, Cefotaxime, Ampicillin, Erythromycin, Streptomycin, Amoxycillin, Lincomycin ve Azlocillin'e karşı ise duyarlı oldukları saptandı.

5. TARTIŞMA

O. rhinotracheale son yıllarda kanatlı hayvanlarda özellikle hindi ve tavuklarda tüm dünyada, bulaşıcı bir solunum sistemi enfeksiyonuna neden olduğu dikkati çekmiştir. Enfeksiyon pek çok ülkede olduğu kadar (Heeder, C. Ve ark., 2001) yurdumuzda da tavuk ve hindilerde (Turan, N., Ak, S. (2002); Türkyılmaz, S., 2001) sağaltım masraflarını artırarak ekonomik kayıplara neden olmuş ve bu nedenle son yıllarda kanatlı hayvan yetiştiriciliğinin ileri olduğu ülkelerde üzerinde durulmakta olan bir hastalık haline gelmiştir. Oldukça yeni bir hastalık olması nedeni ile birçok ülkede daha çok etkenin izolasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

Bu hastalığın oldukça kısa bir zaman içerisinde yayılması araştırmacıları bunu konu üzerinde yoğunlaştırmıştır. *O. rhinotracheale* hem broilerlerde hem de hindilerde primer patojen olarak kabul edilmektedir. *O. rhinotracheale* enfeksiyonunun kanatlı hayvanlarda solunum sistemi semptomları, mortalite, arthriti, büyümede gerileme, sinirsel semptomlara neden olduğu bazen de hiçbir semptom meydana getirmeyerek subklinik olarak seyrettiği bildirilmektedir (van Veen, L. ve ark., 2000b). Broiler damızlıklar ve hindiler hastalığa en duyarlı hayvanlar olup, enfeksiyonun broiler damızlıklarda daha çok verimin pike çıktığı 24–52. haftalarda, hindilerde ise 14. haftadan sonra görüldüğü bildirilmektedir. Sakai ve ark., Japonya' da 7–8 haftalık broylerlerden, Odor ve ark. Amerika'da 46 günlük broylerlerden, Travers (45) Güney Afrika'da 28 günlük broylerlerden etken izolasyonu yapmışlardır. *O.rhinotracheale* enfeksiyonun broylerlerde genellikle yem tüketiminde azalma, solunum bozuklukları, nefes darlığı, burun ve göz akıntısı, büyümede gerilik, depresyon, sinüzit gibi semptomlar gösterdiği, bazı olgularda ise subklinik seyrettiği belirtilmiştir (Travers, A.F. 1996).

Broylerlerde iklim ve hastalık arasındaki ilişki oldukça belirgindir. Özellikle oldukça soğuk geçen kış aylarının sonlarında solunum sistemi enfeksiyonlarında bir artışın olduğu bildirilmektedir (Van Empel P., Hafez H. M (1999). *O. rhinotracheale* enfeksiyonu genellikle kış aylarında daha yüksek oranda görülmektedir. Turan ve Ak (2002), yaptıkları çalışmada izole ettikleri suşların 9

tanisini Ocak, 1 tanisini Mart, 1 tanisini de Nisan aylarında gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir (41). Van Veen ve ark.'da (2000), *O. rhinotracheale* infeksiyonunun daha çok kış aylarında görüldüğünü bildirmektedir. *O. rhinotracheale* infeksiyonlarına yaşlı hayvanların daha duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Yaşlı hindilerde birkaç gün içerisinde ölüm %50 gibi oldukça yüksek düzeylere ulaşabilmektedir (van Empel. 2001).

Araştırmacılar *O. rhinotracheale*'nin identifikasyonunda oksidaz, katalaz, ONPG, MacConkey ağarda üreme, TSIA'da reaksiyonun izlenmesi gibi biyokimyasal ve üreme özelliklerinin önemli olduğunu bildirmişlerdir (Hafez, H. M., 2002). Bu özelliklerin en önemlisinin oksidaz testi olduğu belirtilmiş, *O. rhinotracheale*'nin kuvvetli olarak oksidaz pozitif reaksiyon verdiği ve bunun identifikasyon için önemli bir basamak olduğu vurgulanmıştır. Hinz ve ark. yaptıkları bir saha taraması sonucu izole ettikleri 14 izolattan 13 ünün kuvvetli oksidaz pozitif olduğunu, sadece birinin zayıf bir pozitiflik verdiğini belirtmişlerdir. Buna karşın etkenin 1994 yılında *O. rhinotracheale* olarak isimlendirilmesini yapan Vandamme ve ark. oksidaz aktivitesinin birçok suşta pozitif olduğunu bazı suşların negatif sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Travers ve ark. da *O. rhinotracheale*'nin Güney Afrika' da önceden izole edilen üç suş arasındaki patojenite farklılıklarını inceledikleri deneysel bir çalışmada, kullandıkları üç izolattan bir tanesinin oksidaz negatif olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada izole edilen iki *O. rhinotracheale* suşunun da oksidazlarının kuvvetli pozitif olduğu saptanmıştır.

Araştırmacılar *O. rhinotracheale*'nin izole edilen tüm suşlarının katalaz negatif, ONPG pozitif olduğunu, MacConkey ve Simmon's sitrat agar besiyerlerinde üremediklerini, TSIA' da ise zayıf ürediklerini, tüpün dip ve yüzey kısımlarında bir değişiklik oluşturmadıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen iki *O. rhinotracheale* suşın da katalaz negatif olduğu, MacConkey ve Simmon's sitrat besiyerlerinde üremedikleri, TSIA' da ise çok zayıf üredikleri, tüpün dip ve yüzey kısmında herhangi bir değişiklik oluşturmadıkları saptanmıştır. Saptanan bu bulgular önceden yapılan araştırmalarla benzerlik göstermektedir.

O. rhinotracheale besiyerinde oldukça nazlı üreyen bir bakteridir. Yapılan pek çok araştırmada bakteriyolojik olarak izolasyon sayısı düşüktür (Turan, N. ve Ak, S., 2002; Türkyılmaz, S. 2001). Bu durum, *O. rhinotracheale*'nin tek başına olduğu zaman çok öldürücü olmaması ve bu nedenle de infeksiyonun saha şartlarında gözden kaçma ihtimalinin fazla olmasına bağlanabilir. Ayrıca, etkenin antibiyotiklere karşı duyarlı olması ve ne yazık ki saha koşullarında da sıklıkla hemen hemen pek çok durumda antibiyotik tedavisine başlanması ya da uygun antibiyotik ile tedaviye başlanmaması da önemli faktörlerdendir. Özellikle trachea ve akciğer gibi organlardan saha koşullarında alınan materyallerde *Staphylococcus spp.*, *E. coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.* gibi bakteriyel etkenlerin sıklıkla bulunması, bu bakterilere ait kolonilerin *O. rhinotracheale* kolonilerinden daha çabuk ve bol üreyip onların üzerlerini örtmeleri ve yapılan pek çok pasajlar sonucunda *O. rhinotracheale* etkenlerinin daha kısa sürede ölmelerine rağmen, diğer etkenlerin oldukça dayanıklı olmalarına da dayanabilir. Bu aşamada etkenin serolojik teşhisi oldukça güvenli olması, daha kısa sürede sonuç vermesi, daha kolay olması gibi nedenlerden dolayı tercih edilmektedir. *O. rhinotracheale* infeksiyonlarının serolojik teşhisi ELISA ile başarılı bir şekilde yapılmaktadır (Hafez, H. M., 2002).

Araştırmacılar *O. rhinotracheale* izolatlarının değişmez biyokimyasal özelliklerinin kanlı agarda üreme, oksidaz ve ONPG nin pozitif, katalazın ise negatif olması, MacConkey agar da ürememe, TSIA'da ise zayıf üreme olduğunu bildirmişler, bunların dışında standart biyokimyasal testlerle etkenin iyi reaksiyon vermemeleri nedeniyle identifikasyonda API-20 NE ve API-ZYM nin kullanılması gerektiğini açıklamışlardır. Nitekim yapılan bu çalışmada API-20 NE elde edilemediğinden identifikasyon için önce BBL™ Oxi/Ferm Tube II kullanılmaya çalışıldı. Fakat yapılan iki denemede de *O. rhinotracheale* şüpheli suşlar üreme göstermediğinden bu test kullanılamadı.

van Empel ve Hafez, normalde identifikasyon amacı ile kullanılan sıvı besiyerlerinde *O. rhinotracheale* suşlarının iyi ürememesi nedeniyle, biyokimyasal test sonuçlarının değişken olduğunu, bu değişkenlik nedeniyle laboratuvar çalışmalarında güvenilir bir identifikasyon metodunun kullanılmasının önemini belirtmişler ve

API-20 NE testini önermişlerdir. Araştırmacılar *O. rhinotracheale*'nin API-20 NE' de ki kodlarının 0220004, 020004 olduğunu fakat ADH ve üredaki değişkenliğe bağlı olarak 0320004, 0120004 şeklinde sonuçların alınabileceğini belirtmişlerdir. Dudouyt ve ark. (17), da etkenin identifikasyonunda oksidaz ve ONPG testlerinin pozitifliğinin değişmez kimyasal özellikleri olduğunu, API-20 NE de 0220004 veya 0020004 sonucunu verdiğini belirtmişlerdir.

Van Empel ve ark. , API-20 NE'de 443 oksidaz pozitif *O. rhinotracheale* suşunu, 30°C de inkübe etmişler, tüm suşların 3 saat içinde ONPG testinde pozitif sonuç verdiğini, suşların % 65'inin üreaz pozitif, % 1' inin arjinin dihidrolaz pozitif olduğunu, diğer testlerde ise 72 saat inkübasyona rağmen reaksiyon görülmediğini bildirmişlerdir.

Araştırmacılar *O. rhinotracheale*'nin henüz 18 serotipinin (A-R) ayırt edilebildiğini, fakat bazı suşların serotiplendirilemediğini belirtmişler, serotip A'nın dünyada yaygın olarak görüldüğünü ve tavuklardan daha sıklıkla izole edildiğini bildirmişlerdir (Hafez, H. M., 2002). Güney Afrika ve Hollanda'da broylerlerde serotip A ya, Almanya, Hollanda ve İspanya'da serotip B ye, Amerika'da ise serotip C ye sıklıkla rastlanılmıştır. van Empel ve Hafez , dünyanın çeşitli yerlerinden izole edilmiş olan 1091 tavuk ve hindi izolatının AGP ile serotiplendirilme çalışmaları sonunda, tavuk suşlarının %95 inin serotip A olduğu, hindi izolatlarının ise serotipler arasında daha heterojen olarak dağıldığını bildirmişlerdir. Sakai ve ark. ilk kez 1999 yılında Japonya' da broylerlerden izole ettikleri *O.rhinotracheale* suşunun serotip A olduğunu açıklamışlardır. Odor ve ark. Delmarva Peninsula da 11 ticari broyler sürüsünden izole ettikleri 11 susun tamamının serotip A olduğunu belirtmişlerdir, van Empel ve ark. çeşitli ülkelerden topladıkları 232 *O.rhinotracheale* tavuk izolatının % 94' ünün serotip A olduğunu ve bu serotipin tavuk izolatları arasında çoğunlukta olduğunu, hindilerde de sıklıkla görüldüğünü bildirmişlerdir. Araştırmacılar biri Fransa'dan ve ikisi Hollanda'dan alınan üç tavuk izolatının mevcut antiserumlarla tiplendirilemediğini bildirmişlerdir. Erganiş ve ark. Türkiye'de izole ettikleri 2 suştan birinin serotip B olduğunu diğerinin ise serotiplendirilemediğini belirtmişlerdir.

Hafez (1996), solunum sistemi hastalığı geçiren broiler ve hindilerden aldığı 1096 serumu incelemiş ve broiler damızlıklarda %77,3, yumurtacı tavuklarda %22,2, hindilerde ise %96,2 oranında pozitiflik saptamışlardır. Odor ve ark. (1997), Amerika Birleşik Devletleri'nde saha taraması yapmışlar ve inceledikleri tavukları %20 oranında pozitif olarak bulmuşlardır.

O. rhinotracheale serotip B'nin hava kesesi yangısı yaptığına dair ilk bildirim Hollanda'da yapılmıştır. Daha sonra El-Sukhon ve ark. da *O. rhinotracheale* enfeksiyonu geçiren kanatlılarda hava kesesi yangısı bildirmişlerdir. İzmir ve çevre illerinde Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü tarafından yaptırılan çalışmada da *O. rhinotracheale* izolasyonu yapılan tüm broylerlerde hava kesesi yangısı tesbit edilmiştir. Bu bulgu Türkiye'de *O. rhinotracheale* serotip B suşunun hava kesesi yangısı yaptığına dair ilk bildirim olmakla birlikte diğer araştırmacıların bulguları ile de uyumludur (Mısıroğlu, Ö. Z. 2004)

Şimdiye kadar yapılan araştırmalardaki en dikkat çekici nokta *O. rhinotracheale*'nin oldukça nazlı üreyen bir bakteri olması sebebiyle izolasyonunun çok zor olmasıdır. Ayrıca çok yavaş üreyen bir bakteri olması sebebiyle de kendisinden daha hızlı üreyen *Staphylococcus spp.*, *E. coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.* gibi bakteri kolonileri tarafından örtülmekte ve izolasyonu imkansız hale gelebilmektedir. Bu sebeple yapılan pek çok araştırmada bakteriyolojik olarak izolasyon sayısı düşüktür. Ancak yapılan bu çalışmada elde edilen iki *O. rhinotracheale* suşu da %7.5 lik gentamisinli agara yapılan ilk ekimde saf olarak izole edilmiştir. Bu husus izole edilen bakterinin *O. rhinotracheale* olamayabileceğini düşündürmekle beraber dikkati yapılan diğer çalışmalarda agara katılan saf gentamisin yerine kullanılan Genta® 160mg lık (İ.E. ULAGAY ilaç sanayi) ampul üzerine çekmektedir.

Soğuk kış aylarının etkisini yavaş yavaş kaybettiği Mart aylarında izole edilen iki *O. rhinotracheale* izolatu aslında ORT nin kanatlı hayvan popülasyonunu tehdit ettiği ve ülkemizde de hakkında yapılan çok fazla çalışma olmaması nedeniyle üzerinde çok daha fazla çalışılması gerektiği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Akan, M., Haziroglu, R., Ilhan, Z., Sareyyupoglu, B. and Tunca, R. 2002. A case of aspergillosis in a broiler breeder flock. *Avian Dis.* 46:497-501.
2. Blackall, P.J. 1999. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:627-632.
3. da Rocha, A.C., da Silva, A.B., de Brito, A.B., Moraes, H.L., Pontes, A.P., Ce, M.C., do Nascimento, V.P. and Salle, C.T. 2002. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil. *Avian Dis.* 46:749-753.
4. Alexander, D.J. 2000. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev. Sci. Tech.* 19:443-462.
5. Noormohammadi, A.H., Browning, G.F., Cowling, P.J., O'Rourke, D., Whithear, K.G. and Markham, P.F. 2002. Detection of antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* vaccine ts-11 by an autologous pMGA enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* 46:405-411.
6. Pruijboom, I.M., Rimler, R.B., Ackermann, M.R. and Brogden, K.A. 1996. Capsular hyaluronic acid-mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to turkey air sac macrophages. *Avian Dis.* 40:887-893.
7. Ignjatovic, J., Ashton, D.F., Reece, R., Scott, P. and Hooper P. 2002. Pathogenicity of Australian strains of avian infectious bronchitis virus. *J. Comp. Pathol.* 126:115-123.
8. McFerran, J. and Adair, B. 1977. Avian Adenoviruses. *Avian Pathol.* 6:189-217.
9. Swayne, D.E., Beck, J.R., Perdue, M.L. and Beard, C.W. 2001. Efficacy of vaccines in chickens against highly pathogenic Hong Kong H5N1 avian influenza.

Avian Dis. 45:355-365.

10. van Empel, P. 2002. *Ornithobacterium rhinotracheale*. In: Poultry Diseases, 5th ed. Jordan, F., Pattison, M., Alexander, D. and Faragher, T. (eds.). W.B. Saunders, Hong Kong. p.138-145.

11. Esendal, Ömer M. ve Erdeğer, Jale.2002. Kanatlı Hayvan Hastalıkları. 975-7774-47-2:115

12. Vandamme P, Segers P, Vancanneyt M, van Hove K, Mutters R, Hommez J, Devvhirst F, Paster B, Kersters K, Falsen E, Devriese LA, Bisgaard M, Hinz KH, Mannheim W. *O. rhinotracheale* gen. nov., sp.nov., Isolated from the Avian Respiratory Tract. Int Syst Bacteriol 1994; 44, 24-37.

13. van Beek P, van Empel P, van den Bosch G, Storm P, Bongers J and duPreez J. Ademhalingsproblemen, groeivertraging en gewrichtsontsteking bij kalkoenen en vleeskuikens door een Pasteurella-achtige bacterie : *Ornithobacterium rhinotracheale* of “Taxon 28”. Tijdsch Diergeneesk1994; 119:99-101.

14. Hafez H.M., Kruse W, Emele J and Sting R. Eine Atemwegsinfektion bei Mastputen durch Pasteurella-ähnliche Erreger : Klinik, Diagnostik und Therapie.In *Proceedings of the International Conference on Poultry Diseases*, Potsdam, Germany 1993; 105-112.

15. Cook J, Smith H, Huggins M. Infectious Bronchitis immunity: Its study in chickens experimentally infected with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. *J Gen Virol*; 1986; 67:1427-1434.

16. Hafez H.M., Kruse W, Emele J and Sting R. Eine Atemwegsinfektion bei Mastputen durch Pasteurella-ähnliche Erreger : Klinik, Diagnostik und Therapie.In *Proceedings of the International Conference on Poultry Diseases*, Potsdam, Germany 1993; 105-112.

17. Hinz KH, Hafez HM. The Early History of *Ornithobacterium rhinotracheale*

(ORT). Arch Geflügelkd 1997; 61: 2, 95-96.

18. Dudouyt J, Leorat J, van Empel P, Gardin Y, Dore C. Isolation of A New Pathogenic Agent in Turkeys: *O. rhinotracheale*. anagement. Centre de Congress D'angers.1995; 23-30.

19. Hafez HM, Friedrich S. Isolierung von *O. rhinotracheale*"ORT" aus Mastputen in Österreich. Tierarztl. Umschau 1998; 53, 500-504.

20. Joubert P, Higgins R, Laperle A, Mikaelian I, Venne D, Silim A. Isolation of *O. rhinotracheale* from Turkeys in Quebec, Canada. Avian Dis 1999; 43, 622-

21. Sakai E, Tokuyama Y, Nonaka F, Ohishi S, Ishikawa Y, Tanaka M, Taneno A. *O. rhinotracheale* infection in Japan: Preliminary investigations. Vet Rec 2000;146, 502-503.

22. Tahseen AA. *O. rhinotracheale* Developing into A Serious infection. World Poultry Misset 1997; 3: 8, 47-48.

23. Hafez HM. Current Status on the Laboratory Diagnosis of *O. hinotracheale* "ORT" in Poultry. Beri Münch Tierarztl Wschr 1998; 111, 143-145.

24. Charlton, B.R., Channing-Santiago, S.E., Bickford, A.A., Cardona, C.J., Chin, R.P., Cooper, G.L., Droual, R., Jeffrey, J.S., Meteyer, C.U., Shivaprasad, H.L. and Walker, R.L. 1993. Preliminary characterization of an pleomorphic gram-negative rod associated with avian respiratory disease. J. Vet. Diagn. Invest. 5:47-51.

25. Yamamoto R. Infectious coryza. In *Diseases of Poultry*, 9 ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. 1991p. 186-195.

26. van Empel, P. and Hafez, H. 1999. *Ornithobacterium rhinotracheale*. Avian Path. 28: 217-227.
27. Roepke, D.C., Back, A., Shaw, D.P., Nagaraja, K.V., Sprenger, S.J. and Halvorson, D.A. 1998. Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial turkey flocks in the upper midwest. Avian Dis. 42:219-221.
28. Erganiş O, Ateş M, Hadimli H, Çorlu M. Tavukçuluk İşletmelerinde *O. rhinotracheale*'m Araştırılması. 4. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi 26-28 Eylül 2000 Ankara.
29. Post KW, Murphy SC, Boyette JB, Resseguie PM. Evaluation of A Commercial System for the Identification of *O. rhinotracheale*. J Vet Diagn Invest 1999; 11, 97-99.
30. van Empel P. *O. rhinotracheale*. Isolation, Identification and Experimental Infection Results. Poultry Veterinarian Study Group of the EU, Amsterdam, November, 1994.
31. van Empel P, Van den Bosch H, Loeffen P, Storm P. Identification and Serotyping of *O. rhinotracheale*. J Clin Microbiol 1997; 35 : 2, 418-421.
32. van Empel PCM, Hafez HM. *O. rhinotracheale*. A Review. Avian Pathol 1999; 28, 217-227.
33. Hinz KH, Blome C, Ryll M. Acute Exudative Pneumonia and Airsacculitis Associated with *O. rhinotracheale* in Turkeys. Vet Rec 1994; 135:10, 233-234.
34. Tahseen AA. *O. rhinotracheale* Developing into A Serious infection. World

Poultry Misset 1997; 3: 8, 47-48.

35. Roepke, D.C., Back, A., Shaw, D.P., Nagaraja, K.V., Sprenger, S.J. and Halvorson, D.A. 1998. Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial turkey flocks in the upper midwest. *Avian Dis.* 42:219-221.

36. Mante AP. ORT infection. *Zootechnica International*, 1999; 51-53

37. Travers, A.F. 1996. Concomitant *Ornithobacterium rhinotracheale* and Newcastle disease infection in broilers in South Africa. *Avian Dis.* 40:488-490.

38. van Empel P, Vrijenhoek M, Goovaerts D, Van den Bosch H. Immunohistochemical and Serological Investigation of Experimental *O. rhinotracheale* infection in Chickens. *Avian Pathol* 1999; 28,187–193.

39. van Veen, L., van Empel, P. and Fabria, T. 2000b. *Ornithobacterium rhinotracheale*, a primary pathogen in broilers. *Avian Dis.* 44:896-900.

40. Heeder, C. J., Lopes, V. L., Nagaraja, K. V. Shaw, D. P., Halvarson, D. A. (2001): Seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* Infection in Commercial Laying Hens in the Central Region of the United States, *Avian Diseases*, 45:1064-1067.

41. Turan, N., Ak, S. (2002): Investigation of the Presence of *Ornithobacterium rhinotracheale* in Chickens in Turkey and Determination of the Seroprevalence of the Infection Using the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, *Avian Dis.*; 46 (2): 303-306.

42. Türkyılmaz, S. (2001): Kanatlı Hayvanlardan *Ornithobacterium rhinotracheale*"nin İzolasyonu ve Serotiplendirilmesi, (Doktora Tezi), Ankara

Üniversitesi Veteriner Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

43. Sakai E, Tokuyama Y, Nonaka F, Ohishi S, Ishikawa Y, Tanaka M, Taneno A. *O. rhinotracheale* infection in Japan: Preliminary investigations. Vet Rec 2000; 146, 502-503.

44. Odor EM, Salem M, Pope CR, Sample B, Primm M, Vance K, Murphy M. Isolation and Identification of *O.rhinotracheale* from Commercial Broiler Flocks on the Delmarva Peninsula. Avian Dis 1997; 41 : 257-260.

45. Travers, A.F. 1996. Concomitant *Ornithobacterium rhinotracheale* and Newcastle disease infection in broilers in South Africa. Avian Dis. 40:488-490.

46. Hafez, H. M. (2002): Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale*. The 5th National Congress of Veterinary microbiology (With International Guest Speakers), 24-26 September Konya, Turkey.

47. Hinz, K.H., Blome, C, Ryll, M. (1994): Acute Exudative Pneumonia and Airsacculitis Associated with *Ornithobacterium rhinotracheale* in Turkeys, Vet. Record, 135: 233-234.

48. Hafez, H. M. (2002): Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale*, Int. J. Poult. Sci., 1(5):114-118.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı : AKOVA
Adı : Yasin
Doğum Yeri : Kadıköy
Doğum Tarihi : 02.12.1978
Medeni Hali : Evli

Öğrenim Durumu

<u>Yıllar</u>	<u>Mezun Olduğu Eğitim Kurumları</u>
1984-1989	Pendik Süreyya Paşa İlkokulu
1989-1992	Pendik Kılıçaslan İlköğretim Okulu
1992-1996	Arifiye Anadolu Öğretmen Lisesi
1996-2000	Marmara Üniv. Atatürk Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği

Görevleri

2000 - 2004 yılları arasında Tuzla Barış Manço İlköğretim Okulu'nda sınıf öğretmenliği yapmış olup, 2004 yılından bu yana da Tuzla Tezer Taşkiran İlköğretim Okulu'nda sınıf öğretmenliği görevine devam etmektedir..