

Pnömonili Koyun ve Keçilerin Akciğerlerinden Aerobik Bakteri İzolasyonları ve İzole *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica*'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Saptanması*

Gökben ÖZBEY, Adile MUZ

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 19.08.2002

Özet: Bu çalışmada *Pasteurella*'ların ve diğer aerobik bakteriyel etkenlerin koyun ve keçilerin pnömonili akciğer örneklerinden izolasyonu ve izole *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica*'nın kültür yöntemi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile identifikasyonu amaçlandı. Ayrıca şüpheli *P. multocida* izolatlarına fare patojenite testi yapıldı. Akciğer örneklerinin % 7 koyun kanlı agarda 24-48 saatlik kültürü sonucunda, 350 koyun akciğerinden 15 (% 4,3) *P. multocida* ve 8 (% 2,3) *M. haemolytica* izole ve identifiye edildi. Keçilerden toplanan 150 akciğer örneğinden ise 1 (% 0,7) *P. multocida* ve 6 (% 4,0) *M. haemolytica* izole ve identifiye edildi. Akciğerlerden *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın izolasyon oranlarının karşılaştırılması sonucunda farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlendi (koyunlarda $P = 0,2$ ve keçilerde $P = 0,12$).

Fare patojenite testi ile koyunlarda 15 *P. multocida* izolatından 13 (% 86,7)'ü ve keçilerde ise izole edilen bir *P. multocida* izolatı pozitif bulundu.

P. multocida ve *M. haemolytica* izolatlarının tümünün PZR ile de pozitif olduğu saptandı. Bununla birlikte, *toxA* geninden hazırlanan primerlerin kullanılması ile yapılan PZR ile *P. multocida* izolatlarının hiçbirinde pozitif sonuç elde edilemedi.

Sonuç olarak bu çalışma, *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın doğru ve çabuk identifikasyonu için PZR'nin uygulanabilirliğini ortaya koymuştur.

Anahtar Sözcükler: Pnömoni, koyun, keçi, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, polimeraz zincir reaksiyonu, kültür.

Isolation of Aerobic Bacterial Agents from the Lungs of Sheep and Goats with Pneumonia and Detection of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* by Polymerase Chain Reaction

Abstract: The purpose of this study was to isolate *Pasteurella* spp and other aerobic bacterial agents from the lungs of sheep and goats with pneumonia and to identify *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* by both culture methods and polymerase chain reaction (PCR). In addition, mouse pathogenicity tests were carried out on suspected *P. multocida* isolates. In the examination of lung samples collected from sheep, 15 (4.3%) *P. multocida* and 8 (2.3%) *M. haemolytica* strains were isolated and identified. The numbers of species identified in the goat samples were 1 (0.7%) for *P. multocida* and 6 (4%) for *M. haemolytica*. The differences between the numbers of *P. multocida* and *M. haemolytica* strains isolated from the sheep and goat lung samples were not statistically significant ($P = 0.2$ in sheep and $P = 0.12$ in goats).

Thirteen (86.7%) *P. multocida* isolates were positive in the mouse pathogenicity test in sheep. One *P. multocida* isolate from goats was also positive in the mouse pathogenicity test.

All *P. multocida* and *M. haemolytica* strains that tested positive by culture also tested positive by PCR. However, no toxigenic *P. multocida* were detected in any isolates by PCR using primers derived from the *toxA* gene.

In conclusion, this study showed the feasibility of PCR for the accurate and rapid identification of *P. multocida* and *M. haemolytica*.

Key Words: Pneumonia, sheep, goats, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, polymerase chain reaction, culture.

* Bu çalışma TÜBİTAK (VHAG-1601) ve FÜNAP (470) tarafından desteklenmiştir.

Giriş

Hastalıklar içerisinde hayvancılığımızı olumsuz yönde etkileyen faktörlerden biri olan infeksiyöz etkenlere bağlı pnömoniler, yüksek ateş, iştahsızlık, seröz bir burun akıntısı, nabız ve solunum artışı ile başlayıp bazı vakalarda kendi kendine iyileşme göstererek, bazen de kronikleşerek verim kayıplarına veya ölümlere neden olmakta ve büyük problemlere yol açmaktadır (1). Amerika'da yıllık kayıp bir milyar doların üzerindedir (2,3). Hastalığın oluşumunda birçok faktör (taşıma, sütten kesme, kalabalık, yetersiz beslenme, ani iklim değişiklikleri gibi stres faktörleri ile çeşitli bakteriler, viruslar, mantar, parazit v.s.) etkilidir ve *Pasteurella*'lar hastalığın şiddetlenmesine ve ölümcül seyretmesine neden olurlar (4,5).

Pastörellozun teşhisi kültür, fare patojenite testi ve serolojik testler ile yapılmaktadır. Kültür en güvenilir teşhis metodudur. Ancak, uzun zaman alması, kontaminasyon problemi, saf kültür elde etmenin zor olması gibi dezavantajları vardır (6). Fare patojenite testi diğer mikroorganizmalar ile kontamine örneklerde *Pasteurella multocida*'yı tespit etmek için kullanılmaktadır (7). Bu testin taşıyıcı hayvanları saptamak için sensitif olduğu ve farelerde virulensin değişken olduğu rapor edilmiştir (7,8). Bununla birlikte, test masraflıdır ve pratik değildir, dolayısıyla rutin teşhis için ve geniş epidemiyolojik çalışmalarda tercih edilmez (9). Kan serumu ile yapılan serolojik testlerde ise kros reaksiyonlar meydana gelmektedir (10). Son yıllarda geliştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniği ile, mikroorganizmalar bir gün gibi kısa sürede doğru teşhis edildiğinden geleneksel metotlara göre daha avantajlıdır (9). *P. multocida*'ları tespit etmek için *OMP* ve *toxA* genlerine spesifik olarak hazırlanan primerler kullanılarak yapılan PZR testinin çok sensitif ve etkili bir metot olduğu rapor edilmiştir (11,12).

Bu çalışma ile, koyun ve keçi akciğerlerinden *P. multocida*, *Mannheimia haemolytica* ve diğer aerobik bakterilerin izolasyon sıklığının tespit edilmesi ve bu iki türün bakteriyolojik yöntemler yanısıra PZR ile de tanımlanması amaçlandı.

Materyal ve Metot

Numunelerin toplanması ve izolasyonu

Eylül 2000-Haziran 2001 tarihleri arasında Elazığ'daki bir mezbahadan 350'si koyun ve 150'si keçiye

ait olmak üzere toplam 500 akciğer toplandı. Akciğer örnekleri % 7 koyun kanlı agara ekildi. Selektif besiyeri gereksinimi olan, *Mycoplasma* ve *Haemophilus* türleri yönünden bakteriyolojik ekimler yapılmadı. Petri kutuları 37 °C'de aerobik ortamda 24-48 saat inkube edildi ve şüpheli koloniler seçilerek saf kültürleri yapıldı. Bu kültürlerden mikroskopta Gram negatif ve kokobasil şekilde görülen şüpheli izolatların ve diğer aerobik bakterilerin identifikasyonu amacıyla, Triple Sugar Iron agar, MacConkey agar, Eosin Methylene Blue agarda üreme, İndol, Üreaz, Metil Red, Voges Proskauer, Oksidaz, Katalaz, Koagülaz, Hareket, H₂S, Sitrat, Nitrat redüksiyonu, Glukoz, Trehaloz, Ksiloz, Arabinoz, Fruktoz, Galaktoz, Maltoz, Mannoz, Sukroz, Laktoz, Dulsitol, İnositol, Salisin fermentasyon testleri uygulandı (13,14).

Referans Suşlar

P. multocida ve *M. haemolytica* suşları Dr. L. Fodor (Department of Epizootiology, University of Veterinary Science, Macaristan)'dan ve toksijenik *P. multocida* suşu Dr. E.M. Kamp (The Institute for Animal Science Health, Hollanda)'dan temin edildi.

Fare Patojenite Testi

Deneyde kullanılan 32 adet fare Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Deneme Hayvan Ünitesi'nden temin edildi. *P. multocida* şüpheli izolatlar nutrient broth'a inokule edildi. Nutrient broth besiyerinin 1 ml'sindeki bakteri sayısı, koloni sayım yöntemi ile hesaplandı: 18-24 saatlik taze kültürlerden 1 x 10³ bakteri farelere intraperitoneal verildi. Kontrol olarak 16 adet fare kullanıldı. Kontrol farelere bakteri yerine phosphate buffer saline aynı uygulama ile verildi. Bakteri süspansiyonu inokule edilen farelerde ölümün şekillenip şekillenmemesi gözlemlendi. Ölen farelerin otopsileri yapıldı. İç organlardan kanlı agarlara ekimler yapıldı.

DNA Ekstraksiyonu

Kanlı agarda üreyen *P. multocida*, toksijenik *P. multocida* ve *M. haemolytica* referans kültürlerinden 10⁸ CFU/ml alınarak 300 µl'lik distile su içeren bir ependorf tüpte süspansiyon edildi. Süspansiyon edilen bakteriler bir vorteks vasıtasıyla iyice karıştırıldıktan sonra, bakteri süspansiyonu 56 °C'de 30 dak. süreyle su banyosunda inaktive edildi. Daha sonra süspansiyona 300 µl TNES tamponu (20 mM Tris pH 8,0 + 150 mM NaCl + 10 mM EDTA + % 0,2 SDS) ve 200 µg/ml Proteinase K ilave edildi. Süspansiyon 37 °C'de 2 saat inkube edildi. Daha

sonra 30 dak. kaynatılan süspansiyon vortekslenildi. Süspansiyona (300 µl distile su + kültür + 300 µl TNES tamponu) 600 µl fenol (Tris-HCl ile doyurulmuş) ilave edildi ve süspansiyon 5 dak. süreyle elle iyice çalkalandı, 11.600 g'de 10 dak. santrifüj edildi. Daha sonra ependorfun üst kısmındaki süspansiyon (fenollü tabakaya dokunmaksızın) bir mikropipet yardımıyla yeni bir ependorfa aktarılarak üzerine DNA'nın presipitasyonu amacıyla 30 µl 3 M sodyum asetat ve 750 µl saf etanol ilave edildi ve -20 °C'de 1-2 saat bekletildi: 11.600 g'de 10 dak. santrifüj sonucu elde edilen tortu önce 300 µl miktarındaki % 90'lık ve daha sonra da % 70'lik etanol ile her basamaktan sonra 5 dak. santrifüj işlemi uygulanarak yıkandı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Son olarak elde edilen tortu 50 µl distile su ile sulandırıldı ve bu süspansiyondan 5 µl alınarak PZR'de hedef DNA olarak kullanıldı.

PZR

PZR işleminde *P. multocida*, toksijenik *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın sırası ile, *OMP*, *toxA* ve *ssa* (*subtip spesifik antijen*) genlerine spesifik primerler kullanıldı. *P. multocida* için PMOut1 (5'- AGGTGAAAGAGGTTATG -3') ve PMOut2 (5'- TACCTAACTCAACCAAC -3'), toksijenik *P. multocida* için PMTox1 (5'- GGTCAGATGATGCTAGATACTCC -3') ve PMTox2 (5'-CCAAACAGGGTTATATTCTGGAC -3') ve *M. haemolytica* için PHSSA1 (5'- TTCACATCTTCATCCTC -3') ve PHSSA2 (5'- TTTTCATCCTCTTCGTC -3') (T. Leeb, kişisel görüşme) primerleri kullanıldı (Promega) (11,12).

PZR işlemi toplam 50 µl hacimde gerçekleştirildi. Karışım 5 µl 10 x PZR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, % 1 Triton X-100), 250 µM dNTP, 2U Taq DNA polymerase enzimi (Promega), primer çiftlerinin herbirinden 20 pmol ve 5 µl hedef DNA konduktan sonra karışımın üzeri 100 µl mineral yağ ile kaplandı ve PZR, Touchdown Thermocycler'de (Hybaid, İngiltere) gerçekleştirildi. DNA amplifikasyonu; 94 °C'de 5 dak. ön ısıtma, 94 °C'de 1 dak. denatürasyon, 56 °C'de 1 dak. hibridizasyon ve 72 °C'de 2 dak. sentez olmak üzere 30 siklus halinde gerçekleştirildi: 7 µl PZR ürünü % 1,5 agaroz jel'de elektroforez'e tabi tutulduktan sonra, ethidium bromide (0,5 µg/ml) ile 30 dak. süreyle boyandı ve sonuçlar ultraviyole transilluminatörde değerlendirildi. Bantların moleküler ağırlığını saptamak için 100 bp'lik DNA ladder (Promega) kullanıldı. PZR ürünlerinin jel elektroforezi neticesinde 221 bp, 338 bp ve 327 bp

uzunluklarındaki bantlar sırası ile, *P. multocida*, toksijenik *P. multocida* ve *M. haemolytica* yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

DNA ekstraksiyonu ve PZR aşamasında pozitif kontrol olarak *P. multocida*, toksijenik *P. multocida* ve *M. haemolytica* suşları ve negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

İstatistiksel Analiz

Pnömonili koyun ve keçi akciğerlerinden izole edilen *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın kültür bulgularına göre hesaplanan pozitiflik oranlarının karşılaştırılmasında Yates corrected χ^2 testi kullanıldı. Bu işlemler Epi-Info istatistiksel programda yapıldı (15) ve 0,05'den düşük bir ihtimal istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

Bulgular

İzolasyon Bulguları

Çalışmada incelenen akciğer örneklerinin % 7 koyun kanlı agarda 24-48 saatlik kültürü sonucunda, pnömonili koyun akciğerlerinden 15 (% 4,3)'i *P. multocida* ve 8 (% 2,3)'i *M. haemolytica* olmak üzere toplam 330 (% 94,3) bakteri izole ve tanıya edilirken (Tablo 1), keçi akciğerlerinden 1 (% 0,7)'i *P. multocida* ve 6 (% 4,0)'sı *M. haemolytica* olmak üzere toplam 123 (% 82) bakteri izole ve tanıya edildi (Tablo 2). Ayrıca, koyun akciğerlerinden 62 (% 17,7) *S. aureus*, 49 (% 14) *S. epidermidis*, 29 (% 8,3) *Corynebacterium* spp, 24 (% 6,9) *Maya*, 16 (% 4,6) *Streptococcus* spp, 13 (% 3,7) *Bacillus* spp, 10 (% 2,8) *E. coli*, 9 (% 2,6) *Proteus* spp, 3 (% 0,8) *Pseudomonas* spp ve 90 (% 25,7) saf ya da karışık bakteri izole ve tanıya edildi. Keçi akciğerlerinden ise, 17 (% 11,3) *Corynebacterium* spp, 14 (% 9,3) *S. epidermidis*, 13 (% 8,7) *S. aureus*, 6 (% 4,0) *Maya*, 4 (% 2,7) *Streptococcus* spp, 4 (% 2,7) *E. coli*, 3 (% 2,0) *Pseudomonas* spp, 2 (% 1,3) *Moraxella* spp, 1 (% 0,7) *Klebsiella* spp ve 49 (% 32,7) saf ya da karışık bakteri izole ve tanıya edildi

Fare Patojenite Test Bulguları

Bakteri süspansiyonu inokule edilen farelerden 14 tanesi 24-48 saat içerisinde öldü. Kontrol fareler ölmedi. Ölen farelerin kalp kanı ve karaciğerlerinden sürme preparatlar hazırlanarak Gram ve Giemsa ile boyandı ve % 7 koyun kanlı agarlara ekimleri yapıldı. Bu besiyerleri 37 °C'de aerobik ortamda 24-48 saat inkube edildi.

Tablo 1. Koyun akciğerlerinden elde edilen izolasyon sonuçları.

Bakteriler	n	%
<i>S. aureus</i>	62	17,7
<i>S. epidermidis</i>	49	14
<i>Corynebacterium</i> spp	29	8,3
Maya	24	6,9
<i>Streptococcus</i> spp	16	4,6
<i>P. multocida</i>	15	4,3
<i>Bacillus</i> spp	13	3,7
<i>E. coli</i>	10	2,8
<i>Proteus</i> spp	9	2,6
<i>M. haemolytica</i>	8	2,3
<i>Pseudomonas</i> spp	3	0,8
<i>Moraxella</i> spp	2	0,6
<i>S. aureus</i> + <i>Corynebacterium</i> spp	34	9,7
<i>S. aureus</i> + <i>Streptococcus</i> spp	14	4,0
<i>S. aureus</i> + <i>S. epidermidis</i>	6	1,7
<i>S. epidermidis</i> + <i>Corynebacterium</i> spp	6	1,7
<i>S. epidermidis</i> + Maya	5	1,4
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i>	4	1,1
<i>S. aureus</i> + <i>Klebsiella</i> spp	3	0,8
<i>S. aureus</i> + Maya	3	0,8
<i>S. aureus</i> + <i>A. lignieresii</i>	2	0,6
<i>S. aureus</i> + <i>Bacillus</i> spp	2	0,6
Maya + <i>Corynebacterium</i> spp	2	0,6
<i>Corynebacterium</i> spp + <i>Streptococcus</i> spp	2	0,6
<i>Corynebacterium</i> spp + <i>Bacillus</i> spp	2	0,6
<i>Corynebacterium</i> spp + <i>Pseudomonas</i> spp	1	0,3
<i>Corynebacterium</i> spp + <i>E. coli</i>	1	0,3
Maya + <i>Streptococcus</i> spp	1	0,3
Maya + <i>A. lignieresii</i>	1	0,3
<i>Bacillus</i> spp + <i>Streptococcus</i> spp	1	0,3
Üreme olmayan	20	5,7
TOPLAM	350	100,0

İnkubasyon süresi sonunda identifikasyon için gerekli testler yapıldı (13,14).

Fare patojenite testi ile koyunlarda 15 *P. multocida* izolatından 13 (% 86,7)'ü pozitif sonuç verirken, keçilerde ise izole edilen bir (% 100) *P. multocida* izolatı pozitif bulundu.

PZR Bulguları

P. multocida ve *M. haemolytica* olarak tanımlanmış DNA'ların PZR'de amplifikasyonu sonucunda 221 bp ve 327 bp uzunluğunda pozitif bantlar elde edildi. Ancak izole edilen *P. multocida* izolatlarının hiçbirinde PZR'de toksin geni tespit edilmedi (Şekil).

İstatistiksel Analiz Bulguları

Gerek koyunlardan ve gerekse keçilerden izole edilen *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın kültür bulgularına

Tablo 2. Keçi akciğerlerinden elde edilen izolasyon sonuçları.

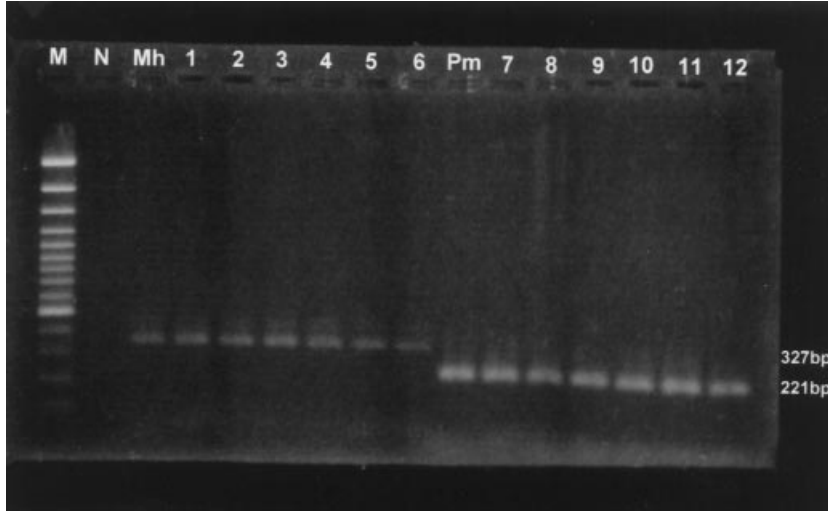
Bakteriler	n	%
<i>Corynebacterium</i> spp	17	11,3
<i>S. epidermidis</i>	14	9,3
<i>S. aureus</i>	13	8,7
<i>M. haemolytica</i>	6	4,0
Maya	6	4,0
<i>Streptococcus</i> spp	4	2,7
<i>E. coli</i>	4	2,7
<i>Bacillus</i> spp	3	2,0
<i>Pseudomonas</i> spp	3	2,0
<i>Moraxella</i> spp	2	1,3
<i>P. multocida</i>	1	0,7
<i>Klebsiella</i> spp	1	0,7
<i>S. aureus</i> + <i>Corynebacterium</i> spp	12	8,0
<i>S. aureus</i> + Maya	5	3,3
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i>	4	2,7
<i>S. aureus</i> + <i>Bacillus</i> spp	4	2,7
Maya + <i>Bacillus</i> spp	4	2,7
<i>Corynebacterium</i> spp + <i>Streptococcus</i> spp	4	2,7
<i>S. aureus</i> + <i>Streptococcus</i> spp	3	2,0
<i>S. aureus</i> + <i>Klebsiella</i> spp	3	2,0
Maya + <i>Streptococcus</i> spp	3	2,0
Maya + <i>Corynebacterium</i> spp	2	1,3
<i>S. epidermidis</i> + <i>Corynebacterium</i> spp	2	1,3
<i>S. aureus</i> + <i>S. epidermidis</i>	1	0,7
Maya + <i>Pseudomonas</i> spp	1	0,7
<i>Corynebacterium</i> spp + <i>Bacillus</i> spp	1	0,7
Üreme olmayan	27	18,0
TOPLAM	150	100,0

göre hesaplanan pozitiflik oranları karşılaştırıldığında, farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlendi (koyunlarda $p = 0,2$ ve keçilerde $p = 0,12$).

Tartışma

Pnömoniler dünyada ve ülkemizde birçok hayvan türünde görüldüğünden önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu çalışma, koyun ve keçi akciğerlerinde aerobik bakteriyel etken dağılımını saptamak ve bu etkenlerin içerisinde *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın bakteriyolojik yöntemler yanısıra PZR ile de tanımlanabileceğini ortaya koymak amacıyla gerçekleştirildi.

Dünyanın farklı bölgelerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, koyunlarda pnömoni oranının % 0,2-42 ve keçilerde ise % 4,4-18,4 arasında değiştiği rapor



Şekil. *P. multocida* ve *M. haemolytica*'dan elde edilen DNA'ların PZR'de analizi. M: DNA ladder, N: Negatif kontrol, Mh: *M. haemolytica*'nın pozitif kontrolü, 1-6: Pozitif *M. haemolytica* kültür örnekleri, Pm: *P. multocida*'nın pozitif kontrolü, 7-12: Pozitif *P. multocida* kültür örnekleri.

edilmiştir (16-19). Bu çalışmada, koyunlarda pnömoni oranı (% 5,2) ile daha önce bu bölgede yapılan çalışmada bildirilen oran (% 6,7) arasında önemli bir farklılığın bulunmaması bölgemizdeki koyun popülasyonlarının iklim, beslenme ve barınak koşulları yönünden benzer özelliklere sahip olmalarından kaynaklanabilir (20). Ancak, pnömoni oranının ülkemizde farklı iklime sahip değişik bölgelerde, örneğin, Konya'da % 1,5-25,2 arasında değiştiği bildirilmiştir (21,22).

Bu çalışmada, keçilerde tespit edilen pnömoni oranı (% 4,8) daha önce Elazığ'da bildirilmiş olan orandan (% 2,4) daha yüksek, Bitlis yöresinde bildirilmiş olan orana (% 4,9) paraleldir (23,24). Keçilerde pnömoni oranı hayvanların duyarlılığına, yaşına, ırkına, yaşadığı bölgeye ve iklime bağlı olarak değişebilir. Metin ve ark. (23) bildirdikleri oranın düşük olmasını, keçilerin ırk özellikleri ve dağlık bölgelerde yaşamaları ile ilgili olabileceğine bağlamışlardır.

Koyun ve keçi pnömonilerinin 10 yıllık (1985-1995) bakteriyolojik incelenmesi sonucunda, pnömonili koyun akciğerlerinden % 24,7 *Escherichia coli*, % 17,3 *P. multocida*, % 14,9 *Corynebacterium (Arcanobacterium) pyogenes* ve % 6,9 *Streptococcus pyogenes*'in ve pnömonili keçi akciğerlerinden % 26,6 *E. coli*, % 13,8 *P. multocida*, % 16,5 *S. aureus*, % 11,9 *A. pyogenes*, % 8,2 *S. pyogenes* ve % 5,5 *P. vulgaris*'in izole edildiği

bildirilmiştir (25). St. George (26) Avustralya'da yaptıkları bir çalışmada pnömonili kuzu akciğerlerinden % 7,57 *M. haemolytica*, % 3,03 *P. multocida* izole ettiklerini rapor etmişlerdir. Konya bölgesinde, yapılan çalışmalarda Baysal ve Güler (27) *M. haemolytica*'yı pnömonili kuzu ve oğlak akciğerlerinin % 25'inden, Güler (28) pnömonili koyun ve keçi akciğerlerinin % 29,7'sinden, Güler ve ark. (29) pnömonili koyun ve keçi akciğerlerinin % 20'sinden izole etmişlerdir. Bu çalışmada, pnömonili koyun akciğerlerinden elde ettiğimiz *P. multocida* ve *M. haemolytica* izolasyon oranları, diğer ülkelerde yapılan çalışmalardan ve ülkemizde ise, yukarıda bahsedilen çalışmalardan düşük, Kaya ve Erganiş (21)'in bildirdikleri orana (% 2,9 *P. multocida* ve % 2,9 *M. haemolytica*) paralel bulunmuştur. Ayrıca, 2 türün izolasyon oranları arasında bir fark olmadığı ($P = 0,2$) gözlenmiştir.

Konya bölgesinde, yapılan bir çalışmada pnömonili koyun akciğerlerinden bakteriyolojik etken olarak *S. aureus*'un % 7,8 oranıyla ilk sırada ve *A. pyogenes*'in ise % 6,8 oranıyla ikinci sırada izole edildiği bildirilmiştir (21). Hazıroğlu ve ark. (30) pnömonili kuzu akciğerlerinden % 51,6 *M. haemolytica*, % 43 *Mycoplasma ovipneumoniae*, % 22,4 *Mycoplasma arginini* ve % 19,6 *P. multocida* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, koyun pnömonilerinden en

fazla *Staphylococcus* spp ve *Corynebacterium* spp izole edilmiştir ve Kaya ve Erganiş (21)'in yaptıkları çalışmaya paralellik göstermektedir. Bu durum, Kaya ve Erganiş (21)'in ifade ettikleri gibi pnömonili akciğer örneklerinin apseli olmasına bağlı olabilir.

Bu çalışmada, pnömonili keçi akciğerlerinden elde ettiğimiz *P. multocida* ve *M. haemolytica* izolasyon oranları, diğer ülkelerde, Obasi ve ark. (25)'inin yaptıkları çalışmalardan elde ettikleri orandan (% 13,8 *P. multocida*) ve ülkemizde ise Bitlis yöresinde, Yener ve ark. (24)'nin bildirdikleri oranlardan (% 2,4 *P. multocida* ve % 38,1 *M. haemolytica*) düşük bulunmuştur. Ayrıca, *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın izolasyon oranları arasında önemli bir fark olmadığı ($P = 0,12$) gözlenmiştir.

Ülkemizde koyun ve keçi pnömonileri ile ilgili çalışmalarda (21,27-31). *M. haemolytica* saf veya diğer bakterilerle birlikte yaygın olarak izole edilmesine rağmen, bu çalışmada *M. haemolytica*'nın izolasyon oranının düşük bulunması, alınan materyallerin enfeksiyonun akut döneminde alınmamış olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca, *M. haemolytica*'nın antibiyotiklere karşı duyarlı olması ve ülkemizde, hemen hemen pek çok durumda antibiyotik tedavisine başlanması da önemli bir faktördür. Yetiştiriciler arasında antibiyotik kullanımı bilinçsiz bir şekilde yapılmakta ve bir çok tedavi yöntemlerini uyguladıktan sonra veterinerlere başvurmakta veya hayvanlarını kesime göndermektedirler.

Pasteurella'ların teşhisinde konvansiyonel metotların bazı sınırlamalarını gidermek amacıyla, son yıllarda geliştirilen alternatif metotların başında PZR testi gelmektedir. PZR spesifik primerlerin kullanılması ile özellikle suş, tür ve cins tayininde faydalı olmuştur (32). Bu çalışmada, *P. multocida*, toksijenik *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın sırası ile, OMP, *toxA* ve *ssa* genlerinden hazırlanan primer çiftlerinin kullanılması ile farklı bakterilerin yanlış pozitif reaksiyon vermesi önlenmiştir.

Pnömonili köpek akciğerlerinden ve domuz tonsillerinden izole edilen *P. multocida* hem kültür hem de PZR ile başarılı bir şekilde identifiye edilmiştir ve bu çalışmalarda PZR'nin kültürden daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (6,11). Aynı araştırmacılar bazı izolatların farelerde patojenik olmadığı için PZR'nin *P. multocida*'nın tespit edilmesinde daha başarılı olduğunu ileri

sürmüşlerdir. Bu çalışmada, kültür ile pozitif *P. multocida* ve *M. haemolytica* izolatları PZR ile de pozitif bulunmuştur. Fare patojenite testi ile, kültür ile pozitif 15 *P. multocida* izolatından 13 (% 86,7)'ü pozitif ve 2 (% 13,3)'si negatif ve keçilerde ise izole edilen bir *P. multocida* izolatı pozitif sonuç verdi. % 13,3'ünün negatif bulunması bu izolatların patojen veya apatojen olması ile ilgili olabilir.

Toksijenik *P. multocida*'nın saptanmasında *toxA* geninden hazırlanan primerlerin kullanıldığı PZR testi (12) diğerleri tarafından tanımlanan PZR testlerinden (33-35) daha sensitif ve etkili bir metot olduğu için bu çalışmada, Kamp ve ark. (12) tarafından tanımlanan yöntem kullanılmıştır. Koyun ve keçi akciğerlerinden elde edilen *P. multocida* izolatlarının hiçbirinde toksin geni tespit edilememiştir. Böylece, toksin oluşturan *P. multocida*'nın bu çalışmada incelenen pnömonili koyun ve keçi akciğerlerinde bulunmadığı kanısına varılmıştır.

ToxA, OMP ve *ssa* genlerini tespit etmek için kullanılan primerlerin serotipler ile ilişkisi incelendiğinde, OMP geninin *P. multocida*'nın bütün serotiplerinde (36), *toxA*'nın kapsüler tip D suşlarında bulunduğu bildirilmiştir (37). Ayrıca tip A ve tiplendirilmeyen suşların da D tipine benzer olduğu sanılan bir toksin salgıladığı belirtilmektedir (38). *M. haemolytica* A1'in serotip-spesifik antijeni olan, *ssa1*'in diğer *M. haemolytica* serotipleri ile ilişkisi henüz açıklanmamıştır (3). Böylece çalışmada elde ettiğimiz *P. multocida* izolatlarında D serotipinin bulunmadığı sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile koyun ve keçi akciğerlerinden *P. multocida* ve *M. haemolytica* dışında diğer aerobik bakterilerin de izole edilmesi, bölgemizdeki subklinik pnömonilerde bakteriyel etiyojinin karışık enfeksiyon karakterinde olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, *Pasteurella*'ların identifikasyonunda PZR tekniğinin uygulanabilirliği ortaya konmuştur ve kullandığımız PZR yöntemi ve *Pasteurella*'lara spesifik primerlerle diğer yöntemlere göre daha kısa sürede enfeksiyonların teşhis edilebileceği gösterilmiştir.

Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK (VHAG-1601) ve FÜNAP (470) tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Davies, D.H.: Aetiology of Pneumonia of Young Sheep. *Preg. Vet. Microbiol. Immun.* 1985; 1: 229-248.
2. Brogden, K.A., Lehmkuh, I.H.D., Cutlip, R.C.: *Pasteurella haemolytica* Complicated Respiratory Infections in Sheep and Goats. *Vet. Res.* 1998; 29: 233-254.
3. Highlander, S.K.: Molecular Genetic Analysis of Virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Fron. Biosci.* 2001; 6: 1128-1150.
4. Yates, W.D.G.: A Review of Infectious Bovine Rhinotracheitis, Shipping Fever Pneumonia and Viral-Bacterial Synergism in Respiratory Disease of Cattle. *Can. J. Comp. Med.* 1982; 46: 225-263.
5. Frank, G.H.: Pasteurellosis of Cattle. In "Pasteurella and Pasteurellosis" edited by Adlam C. and Rutter J.M., Academic Press Inc., New York, 1989.
6. Townsend, K.M., Hanh, T.X., Boyle, D.O., Wilkie, I., Phan, T.T., Wijewardana, T.G., Trung, N.T., Frost, A.J.: PCR Detection and Analysis of *Pasteurella multocida* from the Tonsils of Slaughtered Pigs in Vietnam. *Vet. Microbiol.* 2000; 72: 69-78.
7. Kasten, R.W., Carpenter, T.E., Snipes, K.P., Hirsh, D.C.: Detection of *Pasteurella multocida*-specific DNA in Turkey Flocks by the Use of the Polymerase Chain Reaction. *Avian Dis.* 1997; 41: 676-682.
8. Muhairwa, A.P., Christensen, J.P., Bisgaard, M.: Investigations on the Carrier Rate of *Pasteurella multocida* in Healthy Commercial Poultry Flocks and Flocks Affected by Fowl Cholera. *Avian Pathol.* 2000; 29: 133-142.
9. Townsend, K.M., Frost, A.J., Lee, C.W., Papadimitriou, J.M., Dawkins, H.J.S.: Development of PCR Assay for Species and Type-Specific Identification of *Pasteurella multocida* Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 1096-1100.
10. Fodor, J., Penzes, Z., Varga, J.: Coagglutination Test for Serotyping *Pasteurella haemolytica*. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 393-397.
11. Neumann, S., Leeb, T., Brenig, B.: Vergleich Zwischen PCR und Kultureller Untersuchung zum Nachweis von Infektionen mit *Pasteurella multocida* beim Hund. *Kleintierpraxis.* 1998; 43: 69-74.
12. Kamp, E.M., Bokken, G.C.A.M., Vermeulen, T.M.M., de Jong, M.F., Buys, H.E.C.M., Reek, F.H., Smits M.A.: A Specific and Sensitive PCR Assay Suitable for Large-Scale Detection of Toxigenic *Pasteurella multocida* in Nasal and Tonsillar Swabs Specimens of Pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1996; 8: 304-330.
13. Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Kahraman, M., Akay, Ö., Ilgaz, A., İzgür, M., Diker, K.S.: Fakültatif Anaerobik Gram Negatif Çomaklar. *Özel Mikrobiyoloji. N. Aydın (Ed.). No. 26, Medisan Yayın Serisi, Ankara, 1999.*
14. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R.: *Pasteurella* Species. *Clin. Vet. Microbiol. Wolfe Publ., Dublin, 254-259, 1994.*
15. Dean, A.G., Dean, J.A., Coulombier, D., Brendel, K.A., Smith, D.C., Burton, A.H., Dicker, R.C., Sullivan, K.M., Fagan, R.F., Arner, T.G.: Epi-Info, Version 6: A Word Processing, Database and Statistics Program for Epidemiology on Microcomputers. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA, 1994.
16. Hancock, R.D., Fallaneva, L.C.B., Riberio, L.A.O.: Pneumonic Pasteurellosis due to *Pasteurella multocida* in a Flock of Lambs in Brazil. *Vet. Rec.* 1991; 128: 154-155.
17. Ball, H.J., Connolly, M., Cassidy, J.: *Pasteurella haemolytica* Serotypes Isolated in Northern Ireland during 1989-1991. *Br. Vet. J.* 1993; 149: 561-570.
18. Dheerandra, N., Charan, K., Chattopadhyay, S.K.: Pathological Studies on Caprine Pneumonia in Goats. *Ind. Vet. J.* 1991; 68: 216-220.
19. Sharma, R.K., Boro, B.R., Borah, P.: Incidence of Caprine Pneumonia and Associated Bacterial Species. *Ind. J. Anim. Sci.* 1991; 61: 54-55.
20. Özer, H.: Elazığ Yöresi Koyunlarında Görülen Pneumonia Şekilleri Üzerine Patolojik İncelemeler. *F.Ü. Sağ. Bil. Derg.* 1990; 4: 15-25.
21. Kaya, O., Erganiş, O.: Koyun ve Kuzu Pnömonileri Üzerinde Etiyolojik Survey. *Veterinarium.* 1991; 2: 27-29.
22. Kıran, M.M., Berkin, Ş., Kaya, O., Dinçer, Z.: Konya Bölgesi Koyun Pnömonilerinde Patolojik ve Etiyolojik Araştırmalar. *Selçuk Üniv. Vet. Fak. Derg.* 1993; 9: 3-9.
23. Metin, N., Özer, H., Çiftçi, M.K.: Elazığ ve Çevresi Keçilerinde Pnömonilerin Yayılışı Üzerine Patolojik İncelemeler. *Selçuk Üniv. Vet. Fak. Derg.* 1988; 4: 231-237.
24. Yener, Z., Gürtürk, K., Gülbahar, Y., Solmaz, H.: Bitlis Mezbahasında Kesilen Keçilerde Pnömoni Olguları Üzerine Patolojik ve Bakteriyojik Çalışmalar. *Vet. Bil. Derg.* 2001; 17: 13-20.
25. Obasi, O.L., Raji, M.A., Adogwa, T., Natala, A.J.: The Effect of Climatic Factors on the Occurrence and Gross Pathological Lesions in Bacterial Pneumonia of Ovine and Caprine Hosts in Zaria, Nigeria. *Global J. Pure Appl. Sci.* 2001; 7: 57-60.
26. St. George, T.D.: Investigations of Respiratory Disease of Sheep in Australia. *Aust. Vet. J.* 1972; 48: 318-322.
27. Baysal, T., Güler, L.: Konya Yöresindeki Kuzu ve Oğlakların Enzootik Pnömonilerinden Bakteriyelel Etken İzolasyonu. *Veterinarium.* 1992; 3: 1-5.
28. Güler, L.: Pnömonili Koyun ve Keçilerden Mikoplazmaların İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Belirlenmesi. *S.Ü. Sağ. Bil. Enst., Doktora Tezi, 1993, Konya.*
29. Güler, L., Baysal, T., Gündüz, K., Erganiş, O., Kaya, O., Orhan, G.: Koyun ve Keçilerden İzole Edilen *Pasteurella haemolytica* Suşlarının Biyotip ve Serotiplendirilmesi. *Veterinarium.* 1996; 7: 5-12.

30. Haziroğlu, R., Diker, K.S., Gülbahar, M.Y., Akan, M., Güvenç, T.: Studies of the Pathology and Microbiology of Pneumonic Lungs of Lambs. Dtsch. Tierarztl. Wschr. 1994; 101: 441-443.
31. Diker, K.S., Akan, M., Kaya, O.: Evaluation of Immunogenicity of *Pasteurella haemolytica* Serotypes in Experimental Models. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 2000; 24: 139-144.
32. Relman, D.A., Persing, D.H.: Genotypic Methods for Microbial Identification. In D.H. Persing (Ed.), PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases: a Supplement to Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. ASM Press, Washington, D.C., 3-31, 1996.
33. Lichtensteiger, C.A., Steenbergen, S.M., Lee, R.M., Polson, D.D., Vimr, E.R.: Direct PCR Analysis for Toxigenic *Pasteurella multocida*. J. Clin. Microbiol. 1996; 34: 3035-3039.
34. Hotzel, H., Erler, W., Schimmel, D.: Detection of Dermonecrotic Toxin Gene in *Pasteurella multocida* Strains Using Polymerase Chain Reaction. Berl. Munch. Tierarztl. Woch. 1997; 110: 139-142.
35. Nagai, S., Someno, S., Yagihashi, T.: Differentiation of Toxigenic from Nontoxigenic Isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 1004-1010.
36. Kasten, R.W., Hansen, L.M., Hinojoza, J., Bieber, D., Ruehl, W.W., Hirsh, D.C.: *Pasteurella multocida* Produces a Protein with Homology to the P6 Outer Membrane Protein of *Haemophilus influenzae*. Infect Immun. 1995; 63: 989-993.
37. Nakai, T., Sawata, A., Tsuji, M., Kume, K.: Characterization of Dermonecrotic Toxin Produced by Serotype D Strains of *Pasteurella multocida*. Am. J. Vet. Res. 1984; 45: 2410-2413.
38. Foged, N.T.: *Pasteurella multocida* Toxin. The Characterization of the Toxin and Its Significance in the Diagnosis and Prevention of Progressive Atrophic Rhinitis in Pigs. 1992; APMIS 100 (Suppl. 25): 1-56.