



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**TAVUKLARDAN İZOLE EDİLEN *AVIBACTERIUM*
PARAGALLINARUM SUŞLARININ MOLEKÜLER
TANISI VE TİPLENDİRİLMESİ**

Sibel GÜNGÖRDÜ

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet AKAN**

2009- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TAVUKLARDAN İZOLE EDİLEN *AVIBACTERIUM*
PARAGALLINARUM SUŞLARININ MOLEKÜLER
TANISI VE TİPLENDİRİLMESİ**

Sibel GÜNGÖRDÜ

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet AKAN**

2009- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 08/07/2009



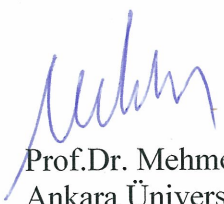
Prof.Dr. Müjgan İZGÜR
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof.Dr. Arif KURTDEDE
Ankara Üniversitesi



Prof.Dr. Hakan YARDIMCI
Ankara Üniversitesi



Prof.Dr. Mehmet AKAN
Ankara Üniversitesi
Raportör



Doç.Dr. Yahya KUYUCUOĞLU
Afyon Kocatepe Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	
1.1. Tarihçe ve Sınıflandırma	1
1.2. Etiyoloji	4
1.2.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri	4
1.2.2. Üreme Gereksinimleri ve Koloni Morfolojisi	4
1.2.3. Biyokimyasal Özellikler	6
1.2.4. Fiziksel ve Kimyasal Ajanlara Dirençliliği	9
1.2.5. <i>Avibacterium paragallinarum</i> suşlarının tiplendirilmesi	9
1.3. Virulens Özellikleri	10
1.4. Antimikrobiyel Dirençlik	12
1.5. Epidemiyoloji	13
1.5.1. Doğal ve DeneySEL Konakçılar	13
1.5.2. İnkubasyon Periyodu	14
1.5.3. Bulaşma	14
1.6. Klinik Belirtiler	15
1.7. Patolojik Bulgular	16
1.8. Ayırıcı Teşhis	16
1.9. Laboratuvar Teşhisi	17
1.9.1. Örnek Alma	17
1.9.2. İzolasyon ve İdentifikasyon	18
1.10. Serolojik Çalışmalar	18
1.11. Moleküler Teşhis	21
1.12. Moleküler Tiplendirme	24
1.13. Sağaltım	26
1.14. Koruma ve Kontrol	26
1.14.1. Bakım-İdare Uygulamaları	26
1.14.2. Aşılama	27
2. GEREÇ VE YÖNTEM	29
2.1. Gereç	29
2.1.1. Örnekler	29
2.1.2. <i>Avibacterium paragallinarum</i> Referans Suşları	30
2.1.3. Solüsyonlar	30
2.1.4. Besiyerleri	31
2.1.5. PCR Testinde Kullanılan Buffer ve Solüsyonlar	33
2.1.6. PCR Testinde Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	34

2.2. Yöntem	34
2.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon	34
2.2.2. PCR ve ERIC-PCR	36
3. BULGULAR	39
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	39
3.2. PCR ve ERIC-PCR Bulguları	41
3.3. İzolasyon ve PCR Bulgularının Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi	43
4. TARTIŞMA	45
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
ÖZET	50
SUMMARY	51
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	59

ÖNSÖZ

İnfeksiyöz Koriza (İK) tavuklarda *Avibacterium paragallinarum* tarafından oluşturulan akut, bir üst solunum yolu hastalığıdır. Hastalık tavuk sürüleri arasında hızlı yayılır ve özellikle yumurtacı tavuklarda yumurta veriminde yaptığı düşüş nedeniyle önemli ekonomik kayıplara neden olur. Hastalık yumurtalacı sürülere ilave olarak broyler damızlık ve broyler tavuklarda da görülebilir. Broylerlerde hava kesesi yangısına bağlı ıskarta oranında artış, baş ve sakallarda selulitis ve diğer infeksiyöz etkenlerle komplikasyon durumunda septisemi ve artiritis bulgularını da içeren ciddi koriza salgınlarına neden olmaktadır. Ülkemizde hastalıkla ilgili çalışmalar bulunmasına karşın hastalığın tavuk sürülerinde neden olduğu ekonomik kayıplarla ilgili bilgi sınırlı düzeydedir.

Hastalıkla ilişkili ekonomik kayıpların azaltılmasında, hastalık etkeninin hızlı ve kesin teşhisi çok önemlidir. İK'nın kesin teşhisi *A. paragallinarum*'un izolasyonu esasına dayanmaktadır. Ancak etkenin yaşama süresinin kısa olması ve üreme gereksinimleri nedeniyle laboratuvarlarda izolasyon çalışmalarında bazı temel zorluklar bulunmaktadır. Bu problemlerin aşılmasında son yıllarda geliştirilen moleküler teknikler yarar sağlamaktadır. PCR esaslı tekniklerin infeksiyöz koriza teşhisinde kullanılması, solunum sistemi infeksiyonlarında bu hastalığın rolünün açık olarak belirlenmesinde yararlı bilgiler sağlamaktadır. Ayrıca *A. paragallinarum* suşları arasındaki farklılıkların belirlenmesinde konvansiyonel teknikler yanı sıra moleküler tiplendirme yöntemleri de kullanılmaktadır. Moleküler tiplendirme tekniklerinin kullanılması sonrasında suşlara ait moleküler benzerlikler ortaya konulabilmektedir.

Bu çalışmada özellikle yumurtacı sürülerde infeksiyöz koriza şüpheli materyaller hastalık etkeninin izolasyon ve identifikasyonu ile moleküler teşhisi gerçekleştirildi. Ayrıca izole edilen suşlarla standart suşların benzerlikleri moleküler tekniklerle araştırıldı. Bu çalışma, hastalığın teşhisinin moleküler yöntemlerle gerçekleştirildiği ilk çalışma olması bakımından önemlidir ve çalışma kapsamında elde edilen bulgular, ülkemizde yumurtacı sürülerde infeksiyöz korizanın bazı yumurtacı sürülerde problem olmaya devam ettiğini gösterdi. Bu bulgu hastalıkla ilgili koruyucu önlemlerin daha detaylı düzenlenmesi gerektiğini ortaya koydu.

Doktora tez çalışmam sırasında büyük desteklerini gördüğüm danışman hocam Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Mehmet AKAN başta olmak üzere, tez izleme komitemde bulunan Prof. Dr. Hakan YARDIMCI ve Prof. Dr. Arif KURTDEDE'ye ve katkılarından dolayı emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Jale PARACIKOĞLU'na, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nejat AYDIN'a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Müjgan İZGÜR, Prof. Dr. K. Serdar DİKER, Prof. Dr. Ömer M. ESENDAL'a, moleküler çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU'na, materyal toplamamda yardımcı olan Veteriner hekim Sibel ÇARIKÇI'ya, Referans suşları sağlamada yardımcı olan Dr. Patrick J. BLACKALL'a ve çalışmamın her aşamasında desteklerini gördüğüm başta Ankara

Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji A.D. Araş. Gör. Bülent BAŞ olmak üzere doktora ve yüksek lisans yapan tüm arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ARDRA	Amplifiye 16 S Ribozomal DNA Restriction Analysis
bp	base pair
B-ELISA	Blocking- Enzyme Linked Immunosorbent Assay
TBA	Tryptose Blood Agar
CBA	Columbia Blood Agar
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Based-PCR
GA	Glutaraldehyt
HA	Haemagglutinin
HI	Haemagglutination Inhibition
HPG	Haemophilus paragallinarum
HMM	Haemophilus Maintanance Medium
İK	İnfeksiyöz Koriza
KCSN	Potasyum Tiyosiyanat
Mab	Monoclonal antibody
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
ml	Mililitre
mg	Miligram
mm	Milimetre
NaCl ₂	Sodyum Klorür
NAD	Nikotinamide dinucleotide
NADH	Reduced Nikotinamide dinucleotide
OMP	Outer Membrane Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
REA	Restriction Endonucleases Analysis
rpm	Revolution per minute
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TM/SN	Supplemented Test Medium Agar
X faktör	Hemin
V faktör	Nikotinamide dinucleotide

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. TM/SN besiyerinde <i>A. paragallinarum</i> kolonilerinin görünümü	39
Şekil 3.2. CBA besiyerinde <i>A. paragallinarum</i> kolonilerinin görünümü	39
Şekil 3.3. BTA’da <i>A. paragallinarum</i> kolonilerinin satelitik ve çiğ damlası şeklindeki görünümü	40
Şekil 3.4. <i>A. paragallinarum</i> Kume referans suşlarının PCR ile doğrulanması	41
Şekil 3.5. İzole edilen <i>A. paragallinarum</i> suşlarının PCR ile doğrulanması	41
Şekil 3.6. PCR ile <i>A. paragallinarum</i> yönünden pozitif olduğu saptanan svap örneklerinden bazıları	41
Şekil 3.7. <i>A. paragallinarum</i> Kume referans suşları ve Bandırma – Çorum izolatlarının ERIC-PCR profili	42

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Pasteurellaceae familyasındaki cinslerin identifikasyonu	7
Çizelge 1.2. Karbonhidrat fermentasyon testlerine göre biyovaryantlar	7
Çizelge 1.3. Avibacterium genusu içindeki türlerin identifikasyonu	8
Çizelge 2.1. İncelenen materyallerin orijini, yetiştirme yönleri ve sayıları	28
Çizelge 3.1. Kültür ve/veya PCR Pozitif Örneklerin Dağılımı	43
Çizelge 3.2. Kültür ve PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması	43

1. GİRİŞ

İnfeksiyöz Koriza (İK) tavuklarda burun akıntısı, aksırık ve yüzde ödemle karakterize bir üst solunum yolu hastalığıdır. Hastalığın etkeni *Avibacterium paragallinarum*'dur. Hastalık infeksiyöz olduğu ve primer olarak burun pasajlarını etkilediği için İK olarak isimlendirilmiştir (Blackall ve Matsumoto, 2003).

İnfeksiyöz Koriza, dünyada tavuk yetiştiriciliğinin olduğu her bölgede görülmekte (Vargas ve Terzola, 2004a); yumurtacı tavuk işletmelerinde yumurta veriminde azalma (%10-40) ve broyler piliçlerde üst solunum sistemi bulgularına bağlı büyümede gecikme, kilo kaybı ve ıskarta oranında artış nedeniyle önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Blackall ve ark., 2005). Hastalık genel olarak yüksek morbidite ve düşük mortaliteye sahiptir (Vargas ve Terzolo, 2004b); esas olarak tavuklarla sınırlıdır ve toplum sağlığı açısından önemsizdir (Blackall ve Matsumoto, 2003). İK akut bir üst solunum yolu hastalığıdır; ancak alt solunum yolu infeksiyonu *A. paragallinarum* ile diğer solunum yolu patojenlerinin sinerjistik etkileri ile ortaya çıkabilir ve hastalık kronik forma dönüşebilir (Reid and Blackall, 1984; Hinz, 2001).

1.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

Etkenin tavuklardan ilk izolasyonunun 1931'de De Blicke tarafından gerçekleştirildiği ve etkenin "*Bacillus hemoglobinus coryza gallinarum*" olarak isimlendirildiği bildirilmiştir. 1930'lu yıllarda yapılan çalışmalara dayanılarak etken, *in vitro* üremesi için hem X (hemin) hem de V (nikotinamid dinükleotid; NAD) faktörlerine ihtiyaç gösteren *Haemophilus gallinarum* olarak tanımlanmıştır (Blackall ve Matsumoto, 2003). McGaughey'in 1932'de *Haemophilus gallinarum* izolatlarının NAD'a bağımlı olduğunu ancak hemine ihtiyaç duymadığını bildirmesine karşın bu bildirim ancak 1960'lı yıllardan sonra farklı araştırmacıların yaptıkları çalışmalarla destek bulmuştur (Bernard, 2001). Biberstein ve White (1968)

tarafından üreme için hemine ihtiyaç göstermeyen bu suşların *Haemophilus paragallinarum* olarak isimlendirilmesi önerilmiştir.

H. paragallinarum tavuklardan izole edilen büyüme-faktör bağımlı tek bakteri değildir; diğer kanatlı *Haemophilus* etkenleri *H. paragallinarum*'un tersine katalaz pozitif ve apatojen özellikte olup, 1930'lu yıllardan beri bilinmektedir. Bu organizmalar birkaç taksonomik değişikliğe uğramıştır (Blackall ve ark., 2005; Blackall, 1988b). Önce Hinz ve Kunjara (1977) bu etkenleri *Haemophilus avium* olarak adlandırmıştır. Mutters ve ark. (1985), DNA-DNA hibridizasyon yöntemiyle *H. avium*'un üç DNA homoloji grubundan oluştuğunu ve *Pasteurella* genusuna genetik olarak daha yakın olması sebebiyle bu üç DNA homoloji grubunun *Pasteurella avium*, *Pasteurella volantium* ve *Pasteurella species A* olarak isimlendirilmesini teklif etmişlerdir.

Blackall ve ark. (2005), Pasteurellacea familyasında bulunan kanatlılarla ilişkili 16S rRNA 18 grubundaki 11 taksonun ve aynı familyadaki diğer 7 taksonun 16S rRNA gen sekanslarının filogenetik analizi sonrasında *Haemophilus paragallinarum*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella avium* ve *Pasteurella volantium*'un % 96.8 sekans benzerliği ile monofiletik bir grup oluşturduğunu ortaya koymuşlardır. Hem fenotipik özellikleri, hem de 16S rRNA genlerinin sekans analizi sonuçlarının ışığında kanatlı hayvanlarla ilişkili bu türlerin tek ve yeni bir genusa transferi yapılarak sırasıyla *Haemophilus paragallinarum*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella avium*, *Pasteurella volantium* ve *Pasteurella* sp. A; Avibacterium genusunda *Avibacterium paragallinarum*, *Avibacterium gallinarum*, *Avibacterium avium*, *Avibacterium volantium* ve *Avibacterium* sp. A olarak tanımlanmıştır (Blackall ve ark., 2005).

Güney Afrika'da 1990'dan bu yana *A. paragallinarum*'un V-faktör bağımsız suşları rapor edilmektedir (Mouhaid ve ark., 1992; Bragg ve ark., 1993a). Bragg ve ark. (1993a) NAD-bağımsızlığın plazmidlerle taşındığını göstermişlerdir. Mouhaid ve ark. (1992) Güney Afrika'da tipik İK semptomları gösteren tavuklardan izole edilen NAD-bağımsız suşları hem fenotipik olarak; hem de moleküler düzeyde DNA

baz kompozisyonu, genom büyüklüğü ve DNA homolojisi yönünden incelemişler ve bu NAD-bağımsız izolatları *A. paragallinarum* olarak tanımlamışlardır. Aynı yıl Horner ve ark. (1992)'da, Güney Afrika'daki tavuklarda NAD-bağımsız organizmaların izolasyonunu rapor etmişlerdir. Bugüne kadar V-faktör bağımsız suşlara Güney Afrika Cumhuriyeti (Bragg ve ark., 1993a; Horner ve ark., 1992) ve Meksika'da (Garcia ve ark., 2004) rastlanmıştır. Böylece bugün İK'nın etkeni V faktör-bağımlı veya bağımsız olabilen *Avibacterium paragallinarum* olarak isimlendirilmektedir (Blackall ve ark., 2005).

Miflin ve ark. (1995) tarafından yapılan çalışmada üreme gereksinimleri dışında NAD-bağımsız suşların tipik *A. paragallinarum* izolatlarıyla aynı biyokimyasal özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Horner ve ark. (1995) NAD-bağımsız ve tipik *A. paragallinarum* suşlarının tüm hücre protein profillerini karşılaştırmış ve NAD-bağımsız suşların protein profillerinin aynı olduğunu göstermişlerdir.

Güney Afrika orijinli NAD-bağımsız suşlar DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları ile tipik *A. paragallinarum* suşları ile % 89 oranında bağlanma göstermiştir (Mouhaid ve ark., 1992). Miflin ve ark. (1995) tarafından bu suşların tek klondan olduğu; HPG-PCR (*Haemophilus paragallinarum*-PCR) ile de hem Güney Afrika hem de Meksika orijinli NAD-bağımsız suşların pozitif olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Güney Afrika orijinli NAD-bağımsız suşlar Miflin ve ark. (1995) tarafından tipik *A. paragallinarum* suşları için kullanılan serotiplendirme şemasıyla ve Meksika orijinli NAD-bağımsız suşlar Garcia ve ark. (2004) tarafından Page şemasıyla tiplendirilmiştir. Bu çalışmalarda elde edilen bulgular Blackall ve ark. (2005) tarafından yapılan 16S rRNA gen sekans analiz çalışmaları ile de desteklenmiş ve bu suşların *A. paragallinarum* türü içinde yer aldığı gösterilmiştir.

1.2. Etiyoloji

1.2.1. Morfoloji ve boyanma özellikleri

A. paragallinarum Gram negatif, hareketsiz, sporsuz bir bakteridir (Hinz, 2001). 24 saatlik agar kültürlerinden yapılan boyamalarda bakteriler 1-3 µm uzunluk ve 0.4-0.8 µm kalınlıkta kısa çomak veya kokobasil şeklinde görülür ve filament formasyonuna eğilimlidir. Virulent suşlarda kapsül bulunabilir. Mikroorganizmalar 48-60 saat içinde dejenerasyona uğrar, fragmentli ve şekilsiz bir görünüm oluşur. Ancak bu aşamada taze besiyerine ekildiğinde bakteri tipik çomak şekilli morfolojisini tekrar kazanmaktadır (Blackall ve Matsumoto, 2003).

1.2.2. Üreme Gereksinimleri ve koloni morfolojisi

NAD bağımsız suşlar hariç *A. paragallinarum* izolatlarının *in vitro* üremesi için NAD'ın indirgenmiş formuna (NADH) (1.56-25 µg/ml besiyeri) veya oksidize formuna (20-100 µg/ml besiyeri) ihtiyaç duyulur. Sodyum klorür (NaCl; % 1-1,5) üreme için gereklidir. *A. paragallinarum*'un bazı suşları için besiyerine tavuk serumu (%1) katılması gerekirken; bazı suşları için serum temel bir bileşen olmayıp katılması durumunda üremeyi arttırıcı bir faktördür (Blackall, 1989; Vargas ve Terzola, 2004a).

Bakterilerin üretilmeleri için gerekli üretim faktörleri ticari olarak sağlanabilmektedir. Üretim faktör gereksinimlerinin belirlenmesinde ticari olarak bulunabilen X/V faktör diskleri ve NAD içermeyen Test Medium Agar (TM/S) kombinasyonunun kullanılmasının uygun olduğu gösterilmiştir. Bazı kanatlı hemofilusları V faktöre daha düşük miktarda ihtiyaç gösterdiğinden, TM/S'den serumun da çıkarılabileceği bildirilmiştir (Blackall ve Farrah, 1985). X faktör ihtiyacının belirlenmesi için Porfirin testi gibi alternatif testler veya tam besiyerine purifiye hemin (X faktör) ve NAD (V faktör)'ın supplement olarak katılması

gerektiği ancak bu işlemlerin tanı laboratuvarları için çok kompleks olduğu ifade edilmiştir (Blackall ve Matsumoto, 2003).

A. paragallinarum çoğunlukla %5 CO₂'li ortamda üremektedir. Bu bakteriler azalan oksijen ve anaerobik şartlarda üreyebildiğinden karbondioksit esansiyel bir gereksinim değildir (Blackall ve Matsumoto, 2003). Tipik olarak, *A. paragallinarum* izolatları oksijenli ortamda üremezken, bazı suşların pasajlarının oksijenli ortamda üreyebildiği belirlenmiştir. *A. avium*, *A. volantium* ve *A. species A* türleri oksijenli ortamda kuvvetli üreme gösterir (Blackall ve Yamamoto, 2006). Bu grup bakterilerin üremeleri için minimum ve maksimum sıcaklıklar sırasıyla 25 °C ve 45 °C olmakla beraber, optimal sıcaklık 34-42 °C'dir (Blackall ve Matsumoto, 2003).

Kanlı agarda 24-48 saatlik inkubasyon sonrası *A. paragallinarum*'un V faktör-bağımlı suşları satellit koloni olarak 0.3 mm çapında çok küçük, çiğ damlası şeklinde koloniler meydana getirir. Satellitik üremenin net görülebilmesi için kültürlerin 24-48 saat içinde incelenmesi gerekir. Lize at kanlı Columbia Blood Agar (CBA)'da *A. paragallinarum* 3-5 mm çapında koloniler oluşturur (Vargas ve Terzola, 2004a). *A. paragallinarum*'un V faktör-bağımsız suşları ise satellitik görünümde olmayan 1-2 mm çapında küçük koloniler oluşturur. *A. volantium*, *A. avium*, *A. species A* türleri satellitik üreme gösterirler ve tipik olarak kolonileri V-faktör bağımlı *A. paragallinarum*'dan daha büyüktür. *A. volantium*'un bazı suşları sarımsı bir pigment oluşturabilir (Blackall ve Yamamoto, 2006).

A. paragallinarum üretilmesinde çeşitli supplementler ilave edilerek hazırlanan Brain Heart infüzyon, Tryptose Agar ve Chicken-Meat infüzyon, Haemophilus Maintenance Medium (HMM), Casman Agar, Gonococcal Agar, Test medium Agar (TM/SN) veya Columbia Agardan yararlanılmaktadır (Vargas ve Terzola, 2004a). Kanlı agar (% 5; Bacto-tryptose-blood-agar base) *A. paragallinarum*'un izolasyonunda yaygın şekilde kullanılmaktadır. İnokulum kanlı agara ekilir ve kanlı agarda V faktör olmadığından, V faktörün ortaya çıkmasını sağlayan başka bir bakteri (feeder kültür) ekim hattına dik olarak ekilir. Bu amaçla en çok tercih edilen bakteri, tavuk derisinin normal florasında bulunan *Staphylococcus hyicus*'tur. *A.*

paragallinarum tipik olarak 37 °C’de ve % 5 CO₂’li ortamda ürer. CO₂ inkubatörleri yoksa mum yöntemi de kullanılabilir (Blackall ve Yamamoto, 2006).

Alternatif bir izolasyon ve saklama besiyeri de Terzola ve ark. (1993) tarafından tanımlanmıştır. Bu besiyeri % 7 lize at kanlı CBA’dır. Bu besiyerine basitracin (5 U/ml), cloxacillin (5 µg/ml) ve vancomycin (25 µg/ml) eklenmesi sonrasında selektif özellik kazandırılmaktadır (Vargas ve Terzola, 2004a).

1.2.3. Biyokimyasal Özellikler

Nitrati nitrite indirgemesi ve gaz oluşturmaksızın glikozu fermente etmesi kanatlı hemofiluslarının ortak özelliğidir. Oksidaz aktivitesi, alkalın fosfataz enziminin varlığı; indol negatif olması, jelatin ve üreyi hidrolize edememesi de genel özellikleridir (Blackall, 1989).

Karbonhidrat fermentasyon özelliklerinin saptanmasında yaygın olarak %1 (w/v) NaCl, 25 µg/ml NADH, %1 (v/v) tavuk serumu ve %1 (w/v) karbonhidrat içeren phenol red broth besiyeri kullanılmaktadır. Ancak, zayıf üremeye bağlı yanlış-negatif sonuçların alınması da önemli bir problemdir. Rutin identifikasyon için phenol red broth besiyerine yoğun inokulasyonların yapılması uygun bir yaklaşımdır (Blackall, 1983). Daha geniş çaplı çalışmalarda agara dayalı metotlar daha uygundur (Blackall ve Matsumoto, 2003). Blackall (1983), TM/F (glukoz ve nişasta içermeyen TM/SN) agar kullanılarak yapılan karbonhidrat fermentasyon testinin doğruluk açısından Phenol red buyyyona dayalı yöntemlere göre daha iyi olduğunu göstermiştir. *A. paragallinarum* L-galaktoz veya trehalozu fermente edememesi ve katalaz aktivitesinin olmaması ile diğer kanatlı hemofiluslarından ayrılır (Çizelge 1.1).

Fernandez ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada Meksika orjinli 40 *A. paragallinarum* izolatının karbonhidrat fermentasyon özelliklerini agara dayalı yöntemle incelemişler; sonuç olarak tüm izolatların glukoz ve mannozu fermente

ederken; arabinoz, dulsitol, galaktoz, inositol, laktoz, rafinoz, riboz, trehaloz ve ksilozu fermente etmediğini; mannitol, maltoz ve sükroz fermentasyonunda değişkenliklerine göre en çok 4 biyokimyasal biyovara ayrıldığını göstermişlerdir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.1: Pasteurellaceae familyasındaki cinslerin identifikasyonu (Blackall ve ark, 2005).

Özellikler	<i>Avibacterium</i>	<i>Pasteurella</i>	<i>Actinobacillus</i>	<i>Haemophilus</i>
Katalaz	d	+	+	+
Simbiotik üreme	+ ^{a*}	- ^b	- ^c	+
Voges-proskaver	-	-	-	ND
Üreaz	-	- ^d	+	+
Ornitin dekarboksilaz	- ^e	D	-	d
İndol	-	+	-	d
Fosfataz	+ ^f	+	+	+
Mc Conkey'de üreme	-	-	-	ND
Asit üretimi				
D-Arabinoz	d	D	-	ND
Dulsitol	-	D	-	-
meso-inositol	- ^g	-	-	-
D-Mannitol	d	D	+ ^h	-
D-Fruktoz	+	+	+	-
D-Mannoz	+	+	d	-
Maltoz	d	- ⁱ	+	+
Sükroz	+	+	+	-
Dekstrin	d	- ⁱ	+	ND
Glikosidler	-	-	d	-
α -Fukosidaz	-	-	-	-
α -Glukosidaz	d	+	-	-
β -Glukorinidaz	-	-	-	-

+; 1-2 gün içinde suşların % 90'ı pozitif reaksiyon; (+); 3-14 gün içinde suşların % 90'ı pozitif reaksiyon; -; 14 gün içinde suşların % 10'undan azı pozitif; d; suşların %11-89'u pozitif; w; zayıf pozitif. a, *Avibacterium gallinarum* ve *Avibacterium paragallinarum*'un NAD-bağımsız suşları negatif; b, *Pasteurella multocida* pozitif olabilir; c, *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovar 1, *Avibacterium volantium* pozitif; f, *Avibacterium paragallinarum* NAD-bağımlı suşları negatif; g, *Avibacterium gallinarum* pozitif; h, *Actinobacillus suis* negatif; i, *Pasteurella dagmatis* ve *Pasteurella sp. B* pozitif.

Çizelge 1.2. Karbonhidrat fermentasyon testlerine göre biyovaryantlar (Fernandez ve ark, 2000)

Biyokimyasal Biyovaryant	Asit Üretimi		
	Mannitol	Maltoz	Sükroz
I	+	+	+
II	+	-	-
III	-	+	+
IV	+	+	-

Blackall ve ark. (1990c) tarafından yapılan bir biyotiplendirme çalışmasında 16 izolat 2 biyotipe ayrılmış ve aynı salgın orijinli izolatların farklı biyotipte oldukları belirlenmiş; ayrıca biyokimyasal tiplendirmenin düşük sensitivitede olmasının yanı sıra epidemiyolojik çalışmalarda kullanılacak kadar stabil olmadığı gösterilmiştir (Çizelge 1.3). NAD bağımlı ve NAD bağımsız *A. paragallinarum*'un biyokimyasal ayrımında temel özelliğin NAD bağımsız etkenlerin β -galaktosidaz aktivitesinin olmaması ve maltozu fermente etmemesi olduğu bildirilmiştir (Mouhaid ve ark., 1992).

Çizelge 1.3. Avibacterium genusu içindeki türlerin identifikasyonu (Blackall ve ark, 2005).

Özellik	<i>A. gallinarum</i>	<i>A. paragallinarum</i>	<i>A. volantium</i>	<i>A. avium</i>	<i>Avibacterium sp. A</i>
Katalaz	+	- (0/51)	+	+	+
Simbiotik üreme	-	+ [+] (8/100)	+	+	+
Hemoliz	-	- (0/100)	-	-	-
Ornitin Dekarboksilaz	-	- (0/9)	d [-] (2/10)	-	-
McConkey'de üreme	-	- (0/9)	-	-	-
Asit üretimi					
Gliserol	+ [-] (61/64)	- (0/9)	-*	-*	-*
L-Arabinoz	-	- (0/100)	-	-	+
D-Arabinoz	d [-] (28/64)	- (0/9)	[+]*	-*	-*
D-Xyloz	d [-] (29/64)	- [-] (8/100)	d [+] (5/10)	d [-] (2/3)	d [-] (2/5)
meso-inositol	d [-] (49/64)	- (0/100)	-	-	-
D-Mannitol	-	+ [(+)] (96/100)	+	-	d [(+)] (3/5)
D-Sorbitol	- (1/64)	+ [(+)] (9/9)	d [-] (4/10)	-	-
L-Fukoz	(+)[w] (62/64)	d [-] (8/9)	[+]*	-*	-*
D-Galaktoz	+	- (0/100)	+	+	+
Laktoz	d [-] (24/64)	- (0/100)	d [-] (5/10)	-	-
ONPG	d [-] (48/64)	- (0/9)	+	-	d [-] (2/5)
Maltoz	+	d [(+)] (71/100)	+	-	d [-] (2/5)
Trehaloz	+	- (0/100)	+	+	+
Raffinoz	+[(+)] (61/64)	- (0/100)	-*	-*	(+)*
Dextrin	+	d[(+)] (1/9)	+*	-*	-*
α -Glukosidaz	+	- (0/51)	+*	+	+
Suşların sayısı	64	100 ^a	10	3 ^b	5 ^b

* sadece referans suşlarla ilgili veriler; ^atüm suşlara testlerin tamamı yapılmamıştır; ^bsayı bildirilmeyenler suşlarda tüm testler yapılmıştır. +, 1-2 gün içinde suşların % 90 ya da daha fazlası pozitif; (+), 3-14 gün içinde suşların % 90 ya da daha fazlası pozitif; -, 14 günde suşların % 10'dan azı; d, suşların % 11-89'u pozitif; w, zayıf pozitif. Kare parantez içinde referans suşların reaksiyonu gösterilmektedir.

1.2.4. Fiziksel ve Kimyasal Ajanlara Dirençliliği

A. paragallinarum konakçı dışında 5 saat gibi kısa sürede canlılığını kaybeden oldukça hassas bir bakteridir. Eksudat veya dokuda 37 °C’de 24 saat hatta bazen 48 saat; 4 °C’deki eksudatlarda birkaç gün infeksiyöz kalır (Blackall ve Matsumoto, 2003). *A. paragallinarum*’un akut İK vakalarından izolasyonu zor olmasa da, üreyen kolonilerin saklanması oldukça zordur. Kültürler kanlı agarda haftalık pasajlarla korunabilir. 37 °C’de 24-48 saatte inkube edilen ve daha sonra 4 °C’de mum yakılarak kapatılan jarda saklanan kültürler 2 haftaya kadar canlı kalmaktadır. İzole edilen suşların saklanmasında en pratik yöntem liyofilizasyondur. İzolatların aktive edilmesinde ve çoğaltılmasında 6-7 günlük embriyolu tavuk yumurtalarının yumurta sarısına ekim yöntemi de kullanılmaktadır. Bu yöntemde embriyolu tavuk yumurtasına sıvı kültürlerden inokulasyon yapıldıktan 24-48 saat içinde çok sayıda bakteri ürer ve bunları içeren yumurta sarıları liyofilize edilerek veya -70 °C’de saklanabilir. İster dondurulmuş ister liyofilize suşun canlandırılması sırasında inokulasyon mutlaka uygun bir sıvı besiyerine veya agara yapılmalı ayrıca yumurta inokulasyonu da tercih edilmelidir (Blackall ve Yamamoto, 2006).

1.2.5. *Avibacterium paragallinarum* suşlarının tiplendirilmesi

Terzolo ve ark. (1993) tarafından yapılan tiplendirme çalışmalarında Arjantin orijinli 24 *A. paragallinarum* izolatının tipik biyokimyasal özelliklere sahip olduğu ve Page şemasına göre sınıflandırılan izolatların içinde en yaygın serovarın serovar B olduğu belirlenmiştir. Zain ve Iritani (1992), Malezya’da izole edilen suşların tamamının serovar A olarak tiplendirmişlerdir. Chen ve ark. (1993) tarafından yapılan tiplendirme çalışmalarında, Çin orijinli 11 *A. paragallinarum* izolatının tipik biyokimyasal özelliklere sahip olduğunu ve hepsinin Page serovar A olduğu gösterilmiştir. Lin ve ark. (1996) ise, Tayvan’dan izole edilen suşları dot-blotting testiyle serovar C olarak belirlemişlerdir. Ok (1996), Türkiye’den izole edilen 16 *A. paragallinarum* suşunu lam aglutinasyon testiyle Page serovar A ve C olarak saptamıştır. Fernandez ve ark. (2000) Meksika’daki salgınlardan izole edilmiş 40

A. paragallinarum izolatını biyotiplendirmek için yaptıkları çalışmada, izolatlar içinde 4 biyokimyasal varyant ve antimikrobiyel dirençlilik yönünden de 5 patern bulmuşlardır. Serogruplar arasında, antimikrobiyel dirençlilik ve karbonhidrat fermentasyon özellikleri yönünden bir korelasyon bulunamamıştır (Fernandez ve ark., 2000).

1.3. Virulens özellikleri

Bragg (2002a) tarafından yapılan çalışmada, Güney Afrika'da bulunan 4 adet *A. paragallinarum* serovarının (A-1, B-1, C-2 ve C-3) virulens özellikleri deneysel çalışmalarla araştırılmış ve oluşturulan klinik semptomlar skorlanarak en virulent serovarın C-3 izolatı olduğu belirlenmiştir. Soriano ve ark. (2004a), tavukları birbirinden bağımsız olarak Kume serovarlarından her biriyle epruvasyona tabi tutmuşlar ve hastalığın en ciddi klinik bulgularının serovar C-1 ve C-3 ile enfekte edilen tavuklarda ortaya çıktığını rapor etmişlerdir.

Bragg (2002b), A serogrubundaki NAD-bağımsız ve NAD-bağımlı izolatların virulenslerinin benzer olduğunu; NAD-bağımsız serovar C-3 izolatlarının ise NAD-bağımlı C-3 izolatlarına göre çok daha az virulent olduğunu göstermiştir. Taole ve ark. (2002) NAD-bağımsız ve tipik *A. paragallinarum* C-3 izolatları arasındaki virulens farkının nedenini araştırmak için tipik bir C-3 izolatını elektroporasyon tekniğiyle NAD-bağımsız hale getirerek, transformasyonun virulens üzerine etkisini ölçmüşlerdir ve transformasyonun virulensi azalttığını göstermişlerdir.

Garcia ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada, Meksika'dan izole edilen NAD-bağımsız *A. paragallinarum* suşlarının patojenite yönüyle tipik *A. paragallinarum* izolatlarından farklılık göstermediği belirlenmiştir.

A. paragallinarum suşlarında, hemaglutininler, kapsül, hemosin (bakteriyosin) üretimi, salgılanan proteinler ve NAD-bağımlılığı gibi faktörlerin virulensle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Soriano ve ark., 2004a).

A. paragallinarum'un virulens özellikleri tam olarak anlaşılamamıştır; ancak *A. paragallinarum*'un tavuk mukoz membranlarına bağlanmasının bu izolatların virulansında önemli olabileceği kabul edilmiştir (Sawata ve ark., 1985a; 1985b). Yapılan çalışmalarda *A. paragallinarum* serotip 1 ve 2 (serotip A ve C) suşlarında ortak olarak bulunan hemagglutininler HL (ısı duyarlı, tripsin dirençli) ve HS (ısı stabil, tripsin dirençli) olarak ortaya konmuş; HA-L (ısı-duyarlı, tripsin duyarlı) antijenlerinin bazılarının ise serotip spesifik olduğu belirlenmiştir (Bernard, 2001).

Page A ve C serovarlarından HA aktivitesi olmayan mutantlar kullanılarak HA antijenlerinin kolonizasyonda anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (Sawata ve Kume, 1983; Yamaguchi ve ark., 1993). Yamaguchi ve ark. (1993), hemagglutinin negatif *A. paragallinarum* serovar A mutantlarıyla tavuklarda yaptıkları deneysel inokulasyon sonrası İK hastalığının oluşmamasına bağlı olarak hemagglutinin antijeninin *A. paragallinarum*'un patojenitesinden sorumlu olduğunu ve koruyucu bağışıklıkta önemli bir rolü olduğunu göstermişlerdir. Yamaguchi ve ark. (1993) yaptıkları çalışmada, C-spesifik HA antijeninin kolonizasyonda önemli olabileceğini iddia etmişlerdir. Takagi ve ark. (1991a) yaptıkları çalışmalarda tavukların peritonel kavitesine uyguladıkları spesifik hemagglutinin monoklonal antikolarıyla, homolog suşla yapılan epruvasyona karşı yüksek düzeyde bir pasif koruma sağlamışlardır. Yapılan bir çalışma ile HA antijenin ve kapsüler antijenin patojeniteden sorumlu olduğu ve HA antijeninin kolonizasyonda rol alabileceği ileri sürülmüştür (Yamaguchi ve ark., 1993).

Hsu ve ark. (2007), 18 *A. paragallinarum* izolatını hemosin (bakteriyosin) aktivitesi yönünden incelemiş ve 5 adedini pozitif bulmuşlardır. Terry ve ark. (2003), hemosin kodlayan kromozomal geni aynı zamanda Avustralya orijinli izolattaki bir plazmidde saptamış ve *A. paragallinarum* tarafından üretilen hemosinin bakterinin kolonizasyonunda önemli olabileceğini; *A. avium*, *A. volantium*, *A. species A* gibi tavukların solunum yollarında bulunan apatojen bakterilerin de bu hemosine duyarlı olduğunu göstermişlerdir.

A. paragallinarum bazı suşlarında bulunan kapsülün konakçıda silia hücrelerine bağlanmada çok önemli bir rol oynadığı ve patojenitede belirleyici bir faktör olduğu saptanmıştır (Sawata ve Kume, 1983; Sawata ve ark., 1985a; 1985b; Bragg, 2002a). Sawata ve ark. (1985b), tavukları intranazal olarak hem kapsüllü hem de kapsülsüz *A. paragallinarum* suşuyla deneysel yolla infekte ettikleri çalışmalarında; kapsüllü suşların burun mukozasında silia ve mikrovillus kaybı, lökosit infiltrasyonu ve mukoprulent bir eksudat birikimine neden olduğunu; kapsülsüz suşların ise burun mukozasında morfolojik olarak önemli bir değişikliğe neden olmadığını belirlemişlerdir.

İn vivo üreme sırasında kapsüllü mikroorganizmalardan salınan bir toksinin hastalıktan sorumlu olduğu düşünülmüştür (Kume ve ark., 1984). Sawata ve ark. (1985a) kapsüllü suşların kapsülsüz olanların aksine seruma karşı dirençli olduğunu ve kapsülün taze tavuk serumunun bakterisidal etkisine karşı doğal dirençte rol oynayabileceğini göstermişlerdir. Bu bulgular, Byarugaba ve ark. (2007a)'nın çalışma bulguları ile desteklenmiştir.

1.4. Antimikrobiyel Dirençlilik

Blackall (1988a) tarafından yapılan çalışmada 75 *A. paragallinarum* izolatının 18 adedi streptomisine ve bir suş tetrasiklin + streptomisin ve diğer bir suş ise neomisin + streptomisine dirençli bulunmuştur. Ayrıca 75 suşun hiçbirinde plazmid tespit edilmemiş ve antimikrobiyel dirençliliğin plazmide bağlı olmadığı ileri sürülmüştür. *A. paragallinarum* suşları arasında streptomisin dirençliliğinin yaygın olduğu; tetrasiklin ve sülfonamidlere de dirençlilik görülebildiği rapor edilmiştir (Blackall, 1989). Blackall ve ark. (1991a), *A. paragallinarum* suşlarında saptanan tek plazmidin Tayvan orijinli bir suştan tesbit edilen p250 olduğunu bildirilmişlerdir. Takagi ve ark. (1991b) Endonezya'dan izole edilen suşların antimikrobiyel duyarlılığını araştırmışlar ve suşların dihidrostreptomisin, kanamisin, spiramisin ve eritromisine karşı dirençli; oksitetrasiklin ve tetrasikline karşı düşük duyarlılıkta bulmuşlardır. Ayrıca suşların hiçbirinde plazmid tesbit edilmemiştir. Poernomo ve ark. (2000)

Arjantin orijinli izolatlarda yaptıkları çalışmada, diğer çalışmaları (Takagaki ve ark., 1991b; Blackall, 1988a) destekler şekilde yaygın eritromisin, neomisin ve streptomisin dirençliliği bulmuşlardır. Hsu ve ark. (2007) Tayvan orijinli 18 *A. paragallinarum* suşlarının çoğunun en az bir antibiyotiğe, % 77.8'inin 3 ya da daha çok antibiyotiğe dirençli olduğunu bulmuşlardır. Bu suşların % 72'sinde plazmid tesbit edilmiş; bu plazmidlerin pYMH5 ve pA14 olduğu belirlenmiştir. pYMH5'in *A. paragallinarum*'da rapor edilen çoklu ilaç dirençliliğini kodlayan ilk plazmid olduğu; plazmidin antimikrobiyel dirençliliğin yayılmasında etkili olabileceği iddia edilmiştir. pA14'ün ise etkenin virulensiyle ilişkili olduğu düşünülmüştür.

1.5. Epidemiyoloji

1.5.1. Doğal ve Deneysel Konakçılar

Hastalık tavuklarla sınırlıdır; ancak sülün, Japon bıldırcını ve beç tavuğundan da bakterinin izole edildiği bildirilmiştir. Fakat bu bildirimler detaylı fenotipik ve genotipik çalışmalarla desteklenmemiştir (Hinz, 2001). Hindi, güvercin, serçe, ördek, tavşan, kobay, fareler deneysel enfeksiyona dirençlidir (Blackall ve Matsumoto, 2003). Byarugaba ve ark. (2007a) yaptıkları çalışmada hindi ve bıldırcınlarda oluşturdukları deneysel enfeksiyonun kısa süreli, hafif semptomlarla seyrettiğini ve bu kanatlıların hastalığın bulaşmasında bir rol oynamadığını göstermişlerdir.

Blackall ve ark. (1997), tüm yaştaki tavukların *A. paragallinarum* enfeksiyonuna duyarlı olduğunu fakat hastalığın genç hayvanlarda daha hafif seyrettiğini bildirmiştir. Bernard (2001) *A. paragallinarum* ile deneysel enfeksiyona tabi tutulan 4-8 haftalık tavukların % 90'ında, 13 haftadan büyük olanların ise % 100'ünde hastalık belirtilerinin görüldüğünü rapor etmiştir.

1.5.2. İnkubasyon Periyodu

İnfeksiyöz Koriza'nın en belirgin özelliği kısa inkubasyon süresidir ve tavukların kültür veya eksudatla deneysel enfeksiyonunu takiben 24-48 saat içinde klinik belirtiler ortaya çıkar. Ergin yaştaki hayvanlarda ise inkubasyon periyodu daha kısadır ve hastalığın seyri daha uzundur. İnfekte kanatlılarla temas sonrası inkubasyon süresi 24-72 saate çıkabilir (Blackall ve ark., 1997).

İnkubasyon periyodu deneysel enfeksiyona maruz kalma yoluna göre intranazal yolda 24 saat; infekte su ile temasta 4 gün; damlacık enfeksiyonunda 6-14 gün olarak belirlenmiştir (Vargas ve Terzolo, 2004b).

1.5.3. Bulaşma

Hastalığın bulaşmasında *A. paragallinarum*'un rezervuarı olan kronik ve sağlıklı taşıyıcı tavuklar önemli rol oynarlar (Vargas ve Terzolo, 2004b; Hinz, 2001). İK salgınları daha çok sonbahar ve kış aylarında görülür (Vargas ve Terzolo, 2004b). Hastalık çoğunlukla farklı yaşlardaki hayvanların bir arada bulunduğu işletmelerde ortaya çıkar. Bakterinin virulensi, kötü havalandırma, kalabalık kümesler gibi faktörler, hastalığın çıkışında ve şiddetinde etkilidir (Sandoval ve ark., 1994). Enfeksiyonun oluşması için az sayıda canlı bakteri yeterli olduğundan, bulaşmanın başlıca burun akıntısıyla kontamine içme suyu ve kısa mesafede aerosol yolla olduğu rapor edilmiştir (Hinz, 2001; Blackall ve ark., 1990c, Bernard, 2001). Direkt temasla horizontal bulaşma da söz konusudur (Hinz, 2001). Yakın zamanda yapılan moleküler tiplendirme yöntemleri İK'nın yayılmasında taşıyıcı kanatlıların rolünü de ortaya koymuştur (Blackall ve ark., 1990e).

1.6. Klinik Belirtiler

Hastalığın tipik klinik bulguları göz ve burunda seromukoid akıntı ve yüzde ödemdir. Daha ciddi hastalık formunda belirgin konjunktivite bağlı gözlerde kapanma, sakallarda şişme ve solunum güçlüğü görülebilir (Hinz, 2001). Azalan yem ve su tüketimine bağlı olarak genç hayvanlarda büyümede gecikme ve yumurtacı sürülerde yumurta veriminde düşüş meydana gelir (Blackall ve Matsumoto, 2003; Hinz, 2001). Diğer enfeksiyonlarla komplikasyon olmadığı durumda, enfeksiyon hafif seyirli ve 10 günden az, daha ciddi formu ise 3 haftaya kadar devam edebilir (Hinz, 2001). Hastalık yüksek % 60-80 morbidite oranıyla hızla yayılır; mortalite oranı % 1-15 arasında değişkenlik gösterir ve diğer enfeksiyonlarla komplikasyon durumunda bu değer artma eğilimindedir (Blackall ve ark., 2005).

M. synoviae, *M. gallisepticum*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. ve *Pasteurella* spp., *İnfeksiyöz Bronşitis virusu* gibi başka enfeksiyöz ajanlarla komplikasyon durumunda ciddi klinik tablolar oluşur (Vargas ve Terzolo, 2004b). Arjantin'deki yumurtacı ve broyler kümeslerinde diğer patojenlerle komplikasyona bağlı olarak artritis ve septisemi gibi farklı klinik bulgular da görülmüştür. *A. paragallinarum*'un solunum sistemi dışında karaciğer, böbrek gibi organlardan ilk izolasyonu da komplikasyon durumundaki salgınlarda rapor edilmiştir (Sandoval ve ark., 1994). Fas'ta yapılan bir çalışmada 10 koriza salgınında % 14-40 arasında yumurta üretiminde düşüş ve % 0.7-10 arasında mortalite bildirilmiştir. Tayland'da köy tavuklarında yapılan başka bir çalışma ile de İK'nın 2 aylıktan küçük ve 6 aylıktan büyük tavuklarda ölümün en yaygın nedeni olarak bildirilmiştir (Blackall, 1999).

Droul ve ark. (1990) Kaliforniya'da broyler kümeslerde görülen biri *M. synoviae* ile komplike iki İK vakasında şişkin baş sendromuna benzer bir klinik tablo geliştiğini ve başlıca hava kesesi yangısına bağlı olarak hayvanlarda ıskarta oranında artış (% 8-15) olduğunu bildirmişlerdir. Çin'de koriza salgınlarda % 20-50 morbidite ve % 5-20 mortalite rapor edilmiştir (Chen ve ark., 1993). Sandoval ve ark. (1994) Hindistan'da kolera ile komplike bir koriza salgınının 14000 kapasiteli bir

yumurtacı çiftliğinde % 50 mortaliteye sebep olduğunu ortaya koymuşlardır. Güney Afrika'da diğer patojenlerle komplike hastalık tablosunda broyler ve yumurtacı sürülerde artritis ve sepsis rapor edilmiştir (Blackall, 1999).

1.7. Patolojik bulgular

Tipik *A. paragallinarum* enfeksiyonunda nadiren görülen bir bulgu olan hava kesesi yangısı, NAD-bağımsız suşların neden olduğu enfeksiyonlarda çok daha fazla görülmekte ve etken hava kesesi lezyonlarından % 44 oranında izole edilebilmektedir (Horner ve ark., 1995).

Adler ve Page (1962) *A. paragallinarum*'dan etkilenen tavukların infraorbital sinuslerinde ve burun kavitelerinde seröz veya muköz eksudat bulmuşlardır. Sawata ve ark. (1985b) bu dokuların mukoz membranlarında akut kataral bir yangı; ayrıca periorbital bölgede ve sakallarda subkutan ödem gözlemlemişlerdir. Sawata ve ark. (1985b) burun boşluğundaki mukoz membranlarında belirgin bir mast hücre infiltrasyonu gözlemlemişler; korizaya yol açan önemli vasküler değişiklikler ve hücre hasardan mast hücreleri, heterofiller ve makrofajlardan salgılanan maddelerin sorumlu olduğunu rapor etmişlerdir.

1.8. Ayırıcı Teşhis

İK'nın kesin teşhisi klinik ve nekropsi bulgularına göre oldukça güçtür. Özellikle Meksika ve Güney Afrika gibi *O. rhinotracheale*'nin ve NAD-bağımsız *A. paragallinarum* suşlarının izole edilebileceği yerlerde kesin teşhis için biyokimyasal testler ve karbonhidrat fermentasyon testleri gereklidir (Blackall, 1999). Ayrıca Bragg ve ark. (1997) koriza benzeri vakalardan NAD-bağımlı ve NAD-bağımsız *A. volantium*, *A. avium* ve *A. species A* suşlarının da izole edilebileceğini bildirmişlerdir.

İK, broylerlerde Hindi Rhinotracheitis (TRT) virusu tarafından oluşturulan şişkin baş sendromu, hipovitaminozis A ve tavuk çiçeği hastalıklarıyla da karışabilir. Artiritis, Korizada nadiren görülen bir semptomdur; ancak bu tür vakalarda da İK göz önünde bulundurulmalıdır (Vargas ve Terzolo, 2004b).

1.9. Laboratuvar Teşhisi

1.9.1. Örnek Alma

Akut hastalık şüphesi görülen hayvanlarda nekropsi sonrası infraorbital sinus bölgesi spatula ile yakılır. Deri ensize edilir ve steril pamuk bir svap sinus kavitesine yerleştirilerek örnek alınır. Tipik olarak erken dönemde *A. paragallinarum* sinüste saf kültür halinde bulunur. Trachea ve hava keselerinden de svaplar alınabilir; fakat mikroorganizmanın bu bölgelerden daha az oranda izole edildiği bildirilmiştir (Bragg ve ark., 2004)

Bragg ve ark. (2004) transport koşullarında *A. paragallinarum*'un canlılığını korumak için en uygun besiyerinin çeşitli supplementlerle zenginleştirilmiş Ames Transport medium (charcoal içermeyen) olduğunu ve bu medyumda tutulan svaplardan 4 °C'de 18 gün ve 25 °C'de 8 güne kadar pozitif kültürler elde etmenin mümkün olduğunu göstermişlerdir. Bragg ve ark. (2004) ayrıca supplement içermeyen Ames transport medium (charcoal içermeyen) içinde 4 °C, 25 °C ve 37 °C'de taşınan svaplardan sırasıyla 9, 8 ve 9 gün sonrada bakterinin izole edilebileceğini bildirmişlerdir.

Canlı hayvanlardan da örnekleme yapmak mümkündür. Bu teknikte sinus bölgesine baskı yapılarak burun deliklerinden çıkan mukustan öze ile veya svapla örnekleme yapılabilir. Bu şekilde alınan svaplar gliserolle-zenginleştirilmiş PBS'te 4 °C veya -20 °C'de saklandığında 180 güne kadar PCR pozitif sonuç verebildiği belirlenmiştir (Chen ve ark., 1998b; Blackall ve Matsumoto, 2003).

1.9.2. İzolasyon ve İdentifikasyon

İdentifikasyonda bakterinin satelitik üreme göstermesi, oksijenli ortamda üreyememesi, Gram negatif, katalaz negatif olması önem taşımaktadır. Satelitezmin görülebilmesi için ekimlerin kanlı agara, üremeyi arttıran bakteriyle (*S. aureus* veya *S. hyicus*) beraber yapılması önemlidir. Bununla birlikte, diğer mikroorganizmaların *A. paragallinarum*'un üremesini baskılamaması için besiyerine antibiyotik ilavesi ve lize olmuş kan eklenmesi, bakterinin izolasyonunu kolaylaştırabilir (Blackall ve Yamamoto, 2006). Bakterinin satelitik şekilde üreyen kanatlı orijinli diğer *Avibacterium* türlerinden ayırımında katalaz negatif olması, galaktoz ve trehalozu fermente etmemesinden faydalanılmaktadır (Çizelge 1.3). Ancak NAD-bağımsız suşların da izole edilebileceği gözardı edilmemelidir. Satelitik üreme göstermeyen NAD-bağımsız suşların *Pasteurella* genusundaki diğer bakterilerden ayırımında başta karbonhidrat fermentasyon testleri ve diğer biyokimyasal testlerin yapılması gerekmektedir (Çizelge 1.2).

1.10. Serolojik Çalışmalar

Page (1962), *A. paragallinarum* organizmalarını lam aglutinasyon testiyle A, B ve C serovarları olarak, Sawata ve ark. (1978) ise serovar 1 ve 2 olarak sınıflandırmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda Page serovar A ve C'nin sırasıyla Sawata'nın serovar 1 ve 2'sine karşılık geldiği gösterilmiştir (Yamaguchi ve ark., 1989). Yamaguchi ve ark. (1991) önceki iddiaların aksine B serotipinin de patojen olduğunu göstermişlerdir. Page şemasına göre tiplendirmede aglutinasyon testleri dışında Hemaglutinasyon İnhibisyon (HI) testi de kullanılabilmektedir (Blackall ve ark., 1990a). HI testlerinin *A. paragallinarum*'un serotiplendirilmesinde aglutinasyon testlerine göre daha yararlı bir metot olduğu belirlenmiştir (Blackall ve ark., 1990a: Yamaguchi ve ark., 1989).

Serotip 1'den elde edilen antijenlerin hemaglutinasyon özelliği olduğu halde serotip 2'den elde edilen antijenlerin potasyum tiyosiyonat (KSCN) ile muameleye

ve sonikasyona tabi tutulduktan sonra Glutaraldehit (GA) ile tespit edilmiş tavuk eritrositlerine karşı hemaglutinasyon özelliği kazandığı gösterilmiştir (Fındık, 2000). Kume ve ark. (1983) KSCN ile muamele edilmiş ve sonike edilmiş hücreler, tavşan hiperimmun serumları ve GA-fikse edilmiş tavuk eritrositleri kullanılarak yapılan HI testine dayanılarak 17 *A. paragallinarum* izolatı için 3 serogrup belirlemişler ve bunların Page'in A, B, C serotipleriyle benzerlik gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca çapraz-absorbsiyon testleri bu üç serogrubun ikisinin de kendi içinde üç serotipe ayrıldığı belirlenmiştir. Böylece Kume şemasında üç serogrup (I, II, III) içinde toplamda 7 serotip (HA-1.....HA-7) gösterilmiştir (Kume ve ark., 1983). Daha sonra Kume şeması içinde 8. (Eaves ve ark.,1989) ve 9. serovarin (Blackall ve ark., 1990b) varlığı bildirilmiştir. Blackall ve ark. (1990b) Kume şeması yerine yeni bir nomenklatur önermiş; I, II, III serogrupları A, B, C olarak yeniden isimlendirilmiş ve her serogrup içindeki serovarlara daha fazla (serovarlara eklenebileceği düşünülerek) sayısal bir düzende gösterilmesini önermişlerdir. Böylece 9 Kume serovarı A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3, C-4 olarak isimlendirilmiştir (Soriano ve ark., 2004a). Kume şeması teknik olarak uzmanlık gerektiren bir yöntem olduğundan, yaygın olarak kullanılmamakta ve alternatif serotiplendirme metotlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Blackall ve Matsumoto, 2003; Eaves ve ark.,1989).

HI testleri tavuklarda *A. paragallinarum*'a karşı antikorların tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Blackall ve ark., 1997). Başlıca üç çeşit olan HI testleri basit HI, ekstraksiyon gerektiren HI ve muamele gerektiren HI testleridir (Blackall ve Yamamoto, 2006). Basit HI testinin uygulaması kolay olup, hem aşıli hem de enfekte tavuklarda sadece serovar A'ya karşı gelişen antikorlar tespit edilmektedir (Blackall ve ark., 1997). Ekstraksiyon gerektiren HI testinde, KSCN ile ekstrakte edilmiş ve sonikasyona tabi tutulmuş *A. paragallinarum* hücreleri ve GA-fikse edilmiş tavuk eritrositleri kullanılır. Bu test Page serovar C ile sadece aşılanan tavuklarda serovar-spesifik antikor yanıtını tespit edebilmektedir. Sonuç olarak, Koriza için seçilecek serolojik test hem tespit edilecek serovara hem de bunun aşıli veya enfekte hayvanlarda uygulanacağına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Tagaki ve ark., 1991a). Muamele gerektiren HI testinde, hyaluronidazla muamele edilmiş *A.*

paragallinarum hücreleri ve formaldehitte sabitlenmiş tavuk eritrositleri kullanılmaktadır (Blackall, 1999). Bu test ile sadece A ve C ile aşılanmış tavuklarda yüksek titreler belirlenmiştir (Yamaguchi ve ark., 1991).

Agar Jel Presipitasyon (AGP) testiyle tespit edilen ısı-dayanıklı antijenlere dayalı başka bir serotiplendirme şeması tanımlanmıştır. Bu şemayla belirlenen 6 serovar immunotiplerle paralellik göstermemekte ve yaygın olarak kullanılmamaktadır (Blackall ve ark., 1997). Bu test ile enfeksiyon veya aşılardan sonra oluşan antikorlar 2. haftadan sonra 11 hafta süreyle tespit edilebildiği bildirilmiştir (Iritani ve ark., 1977; Yardımcı, 2002).

Verschoor ve ark. (1989), 0083 (Page serotip A), 0222 (Page serotip B) aşı suşları ve aşıli sürülerden izole edilen saha suşlarına karşı bir panel monoklonal antikor (Mab) ilk kez üretmişlerdir. Üretilen bu monoklonal antikorların biri sadece aşı suşları A ve B ile, bir başkası da sadece saha suşları ile değişen derecelerde çapraz reaksiyon vermiş ve bu şekilde aşı suşları ile saha suşlarının kesin ayrımı yapılmıştır. Verschoor ve ark. (1989) tarafından geliştirilen Mab'ların *A. paragallinarum* için spesifik olduğu gösterilmiştir. Ancak bu antikorların serogrup spesifik hemagglutininleri tespit etmemesi nedeniyle *A. paragallinarum* suşlarının serotiplendirilmesinde önemli bir değeri olmadığı gösterilmiştir (Bragg ve ark., 1993b).

A. paragallinarum'a karşı başka Mab'lar da geliştirilmiştir (Yamaguchi ve ark., 1990a; 1990b). Bu Mab'lar, yapılan çeşitli çalışmalarda HI ve Dot-blotting testleri kullanılarak değerlendirilmiştir (Blackall ve ark., 1990a; Blackall ve ark., 1991b). Yamaguchi ve ark. (1990a; 1990b) tarafından geliştirilen Mab'lar ile A ve C serogrubundaki tüm serovarlar belirlenmiştir. Ancak bu Mab'lar B serogrubundan hiçbir izolatla reaksiyon vermemiştir (Blackall ve ark., 1990d; 1991e).

Zhang ve ark. (1999) *A. paragallinarum*'a karşı serovar-spesifik antikorları tespit etmek amacıyla sırasıyla Page A ve C serovarlarına karşı hazırlanan Mab'lar kullanılarak iki blocking ELISA (B-ELISA) geliştirmişler; ancak sensitivitelerinin

düşük olması nedeniyle bu testlerin bireysel değerlendirme için uygun olmayıp sürü testi olarak kullanılması gerektiği bildirmişlerdir. Miao ve ark. (2000) geliştirdikleri serovar A B-ELISA kitinin % 95 sensitivite ve % 100 spesifite, serovar C B-ELISA kitinin ise % 73 sensitivite ve % 100 spesifite gösterdiğini bildirmişlerdir. B-ELISA'lar sensitivitesi ve spesifitesi bilinmeyen pek çok teste göre daha güvenilir olduğu ve spesifiteleri yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çok sayıda serumu test etme imkanı ve hızlı sonuç alınabilmesi de testin diğer avantajları olarak bildirilmiştir. B-ELISA'lar için en önemli sınırlamalar kullanılan Mab'ların ticari olarak satılmamasıdır (Miao ve ark., 2000) ve bazı lokal suşların Mab'larla reaksiyon vermemesidir (Blackall ve ark., 1994; Terzolo ve ark., 1993; Blackall ve ark., 1990b). Ayrıca Page serovar B için geliştirilen Mab olmadığından, bu serovar için Mab'a dayalı bir ELISA testi de geliştirilememiştir (Zhang ve ark., 1999; Miao ve ark., 2000).

Sun ve ark. (2007) *A. paragallinarum* A ve C serovar suşlarıyla eprüvasyona tabi tuttıkları tavuklarda antikor titrelerini B-ELISA ve HI yöntemleri ile tespit ederek, bu yöntemleri karşılaştırmışlar ve serotip A ve C spesifik antikorlarını belirlemede B-ELISA'nın saptadığı pozitiflik oranlarının HI ile tespit edilenlere göre çok daha yüksek oranda olduğunu belirlemişlerdir.

1.11. Moleküler Teşhis

A. paragallinarum yavaş üreyen bir bakteri olduğundan, üremesi kontaminantlarla ve besinsel ihtiyacı daha az olan ve tavukların normal florasında bulunan *A. volantium* ve *A. avium* gibi başka mikroorganizmalarla maskelenebilir (Blackall, 1999). Bu nedenle *A. paragallinarum*'un izolasyon ve identifikasyonu birçok laboratuvar için zordur (Chen ve ark., 1996). Kanatlılardan hemofilik bakteriler izole edilse bile *A. paragallinarum*'un kesin identifikasyonu özel besiyerlerinde etkenin saf kültürünün elde edilmesi ve kompleks besiyerlerinde karbonhidrat fermentasyon ve diğer biyokimyasal testlerin uygulanmasını gerektirir. Konvansiyonel kültür metodlarıyla karşılaşılan güçlükler PCR veya DNA probu gibi alternatif yaklaşımları çekici

kılmaktadır (Chen ve ark., 1996). Ayrıca moleküler teşhiste Amplifiye 16 S ribozomal DNA restriksiyon analizi (ARDRA) ve 5' Taq Nuclease Testi geliştirilmiştir (Mendosa-Espinoza ve ark., 2008; Corney ve ark., 2008).

Chen ve ark. (1996) 4 DNA probu ve iki farklı primer çifti kullanarak iki PCR testi geliştirmiştir. Bu DNA problemleri ve PCR testleri ile *A. paragallinarum*'un Güney Afrika, Çin, Avustralya, Amerika, Japonya ve Arjantin orijinli saha suşlarını; Güney Afrika'da rapor edilen NAD-bağımsız suşları; Kume ve Page referans suşları ve varyant özellikteki Page A serovar izolatlarıyla Arjantin orijinli B serovar izolatları dahil 40'in üzerinde *A. paragallinarum* izolatu bu test ile pozitif bulunmuştur. *Pasteurella* ve *Actinobacillus* genusundan yakın ilişkili bakteriler, *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* ile DNA problemlerinden hiçbirisi reaksiyona girmemiş ve bunlar PCR ile de negatif bulunmuştur (Mifflin ve ark., 1999; Chen ve ark., 1996). Konvansiyonel testlerle etkenin izolasyon ve fenotipik karakterizasyonu birkaç gün sürerken (Blackall, 1999) PCR ile 6 saat içinde sonuca ulaşmak mümkündür (Soriano ve Terzola, 2004; Chen ve ark., 1996).

HPG (*Haemophilus paragallinarum*)-1 ve HPG -2 olarak isimlendirilen PCR testleri hem koloni hem de sıvı kültür örneklerinde etkili bulunmuştur. Kırkbir *A. paragallinarum* ve 26 *A. paragallinarum* olmayan bakteri ekstraktları her iki PCR testiyle doğrulanmıştır. Klinik örneklerden alınan svaplara direkt uygulama sonuçları HPG-1 PCR için başarılı olmamıştır; çok sayıda yanlış negatif sonuçlar elde edilmiştir. Fakat amplifikasyon öncesi non-iyonik deterjan ve proteinaz K kullanıldıktan sonra yapılan HPG-2 PCR ile klinik örneklerden alınan svaplarda da başarıya ulaşılmıştır. HPG-2 PCR ile konvansiyonel kültür metodunu karşılaştırmak için 36 adet svabın hem kültürü yapılmış hem de bunlara HPG-2 PCR uygulanmıştır. Bu örneklerden 25 adeti her iki yöntemle pozitif ve 11 adeti de negatif bulunmuştur (Chen ve ark., 1996). Yapılan başka bir çalışmada İK şüpheli bir salgında 8 işletmedeki tavuk kafalarından alınan sinus svaplarına hem *A. paragallinarum* için kültür yapılmış hem de direkt olarak PCR uygulaması yapılmış; 8 işletmenin 6 tanesinden gelen 39 örneğin 15 tanesi PCR ile pozitif bulunurken, kültür yöntemiyle

bu işletmelerin dört tanesinden gelen 39 örneğin sadece 8 tanesi pozitif bulunmuştur (Chen ve ark, 1998a).

Çinde yapılan bir çalışmada 4 veya $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 180 güne kadar gliserollü PBS'te saklanan örneklerin çoğu PCR ile hala pozitif bulunurken; kültür ile aynı sıcaklıklarda 3. günün sonunda *A. paragallinarum* tespit edilememiştir. Antibiyotik tedavisi hem kültür hem de PCR ile *A. paragallinarum*'un tespit edilme oranını azaltmıştır (Chen ve ark., 1998b).

Mendosa-Espinoza ve ark. (2008), *A. paragallinarum*'un identifikasyonunu amplifiye 16S ribozomal DNA restriksiyon analizi (ARDRA) olarak adlandırılan moleküler bir teknik kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. Üniversal bakteri primerleri kullanılarak PCR'la çoğaltılan 16S ribozomal genlerine RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism) uygulanması esasına göre yapılan bu metodun, bakterinin moleküler teşhisinde PCR'a alternatif olduğu öne sürülmüştür. Aynı metod *A. paragallinarum*'a filogenetik olarak yakınlık gösteren veya kanatlıların üst solunum yollarında rastanabilecek *E. coli*, *O. rhinotracheale*, *P. multocida*, *Avibacterium gallinarum* ve *Gallibacterium anatis* için de uygulanmış ve her tür için farklı DNA profilleri elde edilmiştir. Bu da ARDRA tekniğinin sadece *A. paragallinarum*'u değil kanatlılarda solunum sistemini etkileyen diğer bakterilerin de identifikasyonunu sağladığı ve genotiplendirme için uygun bir metod olduğunu göstermiştir. Ayrıca *A. paragallinarum* için ortaya çıkan genetik profilin *O. rhinotracheale* ve *E. coli* gibi bakterilerinkinden tamamen farklı ve bakteriye spesifik olması nedeniyle, ARDRA tekniğinin spesifitesinin yüksek ve güvenilir olduğu öne sürülmüştür (Mendosa-Espinoza ve ark., 2008).

Corney ve ark. (2008), *A. paragallinarum*'un moleküler tanısı için geliştirdikleri yeni bir moleküler yöntem olan 5' Taq Nuclease Testinde kullanılacak primer ve problemlerin dizaynı için HPG-1 amplikonunu referans almışlar; HPG-1'de herhangi bir sekansla benzerlik göstermeyen bir bölge seçilmiş ve bu bölgeye bağlanan işaretli prob teknolojisini kullanmışlardır. Araştırmacılar bu yöntemde, dizayn ettikleri *A. paragallinarum* için spesifik 5' Taq Nuclease testini kullanarak Güney

Afrika NAD-bağımsız suşları da dahil farklı coğrafi bölge orijinli saha izolatlarını, Kume ve Page serovarlarını tespit etmekte başarılı olmuşlardır.

1.12. Moleküler Tiplendirme

Restriksiyon Endonükleaz analizi (Blackall ve ark., 1990e), ribotiplendirme (Miflin ve ark., 1995), ERIC-PCR ile tiplendirme (Soriano ve ark., 2004b) gibi moleküler tiplendirme metotlarının epidemiyolojik çalışmalar için yararlı olduğu gösterilmiştir. *A. paragallinarum* izolatlarında plazmid insidansının çok düşük olması nedeniyle plazmid profillerinin epidemiyolojik çalışmalar için önemli olmadığı sonucuna varılmıştır (Blackall, 1988a; Blackall ve ark., 1990e).

Blackall ve ark. (1990e) tarafından yapılan bir çalışmada *HindIII* enzimi kullanılarak yapılan kromozomal DNA'nın REA'sının İK salgınlarının epidemiyolojisinin çalışılmasında yararlı bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Söz konusu çalışmada 16 İK vakasından REA ile 3 patern tespit edilmiş ve bazı çiftliklerde aynı *A. paragallinarum* suşuyla tekrarlayan bir kronik enfeksiyon olabileceği düşünülmüştür. Böylece bu çalışma ile sürü değişiminin hastalığın asıl kaynağı olduğu gösterilmiştir (Blackall ve ark., 1990b). Blackall ve ark. (1991a) tarafından farklı enzimler (*BamHI*, *EcoRI*, *HindIII* veya *SmaI*) kullanılarak yapılan bir REA çalışmasında *SmaI* enziminin *A. paragallinarum* suşlarına etkisi olmamış, diğer enzimler içerisinde ise izolatları ayırt etmede en yararlı paternler *HindIII* enzimi kullanılarak elde edilmiştir. *HindIII* enzimi kullanılarak ortaya çıkan paternler incelendiğinde dört Avustralya suşuna ait paternlerin çok benzer olduğu, Avustralya orijinli olmayanların ise birbirinden ve Avustralya suşlarından çok farklı olduğu görülmüştür (Blackall ve ark., 1991a). REA profillerinin *in vivo* (Blackall ve ark., 1990e) ve *in vitro* (Blackall ve ark., 1991a) stabil olduğu gösterilmiştir.

Miflin ve ark. (1995) Güney Afrika'dan izole edilmiş 15 adet NAD-bağımsız suşu serotiplendirme, biyotiplendirme, REA ve ribotiplendirme yöntemleriyle incelemişlerdir. Tüm izolatlar serovar A olarak bulunmuş; REA ve ribotiplendirme

ile ortaya çıkan paternler tek tip bulunmuştur, bu da bu suşların ülkedeki NAD-bağımlı suşlar arasındaki farklılığın tersine az derecede genetik farklılık gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (Miflin ve ark., 1995). Miflin ve ark. (1995) bu bulgulara dayanarak NAD-bağımsız suşların klasik bir suş klonuna bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Miflin ve ark. (1997) tarafından yapılan çalışmada Çin’de farklı yıllarda ortaya çıkan 5 salgından izole edilmiş olan 12 Page serovar A izolatının ribotiplendirme profilleri belirlenmiştir. Kromozomal DNA’nın restriksiyonu için 4 enzim (*HaeIII*, *Hind III*, *HpaII* ve *SspI*) kullanılmıştır. 12 izolatın ribotiplendirme profili *Hind III* veya *SspI* kullanıldığında sadece bir adet, *HpaII* kullanılarak üç adet ve *HaeIII* kullanılarak ise dört adet olarak belirlenmiştir. *HpaII* ve *HaeIII* ile oluşturulan profillerin küme (cluster) analizi izolatların bilinen epidemiyolojik geçmişiyle paralellik göstermiştir. Bu 12 izolatın ayrımı biyokimyasal özellikleri veya serolojik karakterizasyonu ile mümkün olmamıştır. Ribotiplendirme çalışması sonucunda ise 1. ve 3. salgının birbiriyle ve diğer 3 salgınla ilişkili olmadığı, diğer üç salgının ise *A. paragallinarum*’un aynı klonuyla oluştuğu ileri sürülmüştür. Ancak REA’nın dezavantajı oluşan fragmentlerin sayısı nedeniyle profiller arasındaki küçük farklılıkların görmekte zorlanılması olarak bildirilmiştir. Ribotiplendirmede yüksek oranda korunmuş bir gene dayanan bir probun kullanımıyla böyle bir kompleksite ile karşılaşmaz. Ribotiplendirmeye oluşturulan profillerin küme (cluster) analizi ile değerlendirilmesi durumunda bu yöntemin yararlı olduğu ileri sürülmüş ve Çin’deki *A. paragallinarum* suşlarının genetik farklılıkları da gösterilmiştir (Miflin ve ark., 1997).

PCR temelli bir tiplendirme metodu olan ERIC PCR *A. paragallinum* izolatlarını tiplendirme kapasitesine sahiptir. ERIC PCR hızlı ve kolay bir yöntemdir; çok az miktarlardaki bakteri kültürlerine uygulanabilir (Soriano ve ark., 2004b). Bir ERIC-PCR tiplendirme çalışmasında *A. paragallinarum*’un 39 suşu ve referans suşlar için 18 ERIC patterni tanımlanmıştır. Yapılan başka bir çalışmada ise 15 adet *A. paragallinarum* izolatı için 8 farklı profil bulunmuştur. (Soriano ve Terzolo, 2004b). ERIC PCR ile yapılan bir tiplendirme çalışmasında aynı patterni gösteren Avustralya orijinli HP14 (A-4) ve HP60 (C-4) suşları dışında tüm *A. paragallinarum* Kume referans suşlarının farklı bir ERIC PCR profili gösterdiği bildirilmiştir

(Soriano ve ark., 2004b). Soriano ve ark. (2004b) ise, Kume referans suşlarının her biri için farklı ERIC paterni bulmuşlardır.

Blackall ve Yamamoto (1989) tarafından yapılan bir çalışmada *A. paragallinarum* izolatlarının eriyebilir tüm-hücre proteinlerine SDS-PAGE uygulanmış ve 15 suş için iki farklı profil belirlenmiş; suşların serolojik sınıflandırılmalarıyla protein profil tipleri arasında bir korelasyon bulunmamıştır. Blackall ve ark. (1990e) 16 *A. paragallinarum* izolatının tüm-hücre protein profilini tek tip bulmuşlardır. Blackall ve ark. (1990c) tarafından yapılan başka bir çalışmada 4 *A. paragallinarum* suşunun dış membran protein (OMP) profillerini SDS-PAGE ile incelenmiş; OMP C olarak isimlendirilen proteinin farklı suşlardaki değişken moleküler ağırlığına göre iki farklı OMP profil tipi olduğu gösterilmiştir.

1.13. Sağaltım

Hastalık görüleri sürülerin antibiyotikle tedavisi yapılmaktadır ve bu amaçla çok sayıda antibiyotik kullanılmaktadır. Tedavide eritromisin ve oksitetrasiklin en yaygın kullanılan antibiyotiklerdir (Blackall ve Matsumoto, 2003). Bu iki antibiyotiğe ilave olarak norfloksasin ve enrofloksasinin hastalığın tedavisinde başarılı sonuçlar verdiği ortaya çıkmıştır (Chen ve ark., 1988a). Huberman ve ark. (2005) *A. paragallinarum*'un horizontal bulaşmasını azaltmak için N-alkil dimetil benzil amonyum klorid (TIMSENTM) dezenfektanın içme suyuyla verilmesi ve her gün çevresel spreylemenin yapılmasının yararlı olduğunu bildirmişlerdir.

1.14. Koruma ve Kontrol

1.14.1. Bakım-İdare uygulamaları

Hastalığın kontrol edilmesinde bakım-idare uygulamaları önemli yarar sağlamaktadır. Bu amaçla hastalık geçiren ve kronik taşıyıcı tavukların, hastalığın

doğal rezervuarı olduğu bilinmeli ve bu sürülerden civciv ve/veya yarka alınması engellenmelidir. Ayrıca çok yaşlı işletmelerde hastalık çıktığında hemen tedavi işlemi uygulanmalı ve hastalık çıkan kümesle diğer kümeslerin personel ve ekipman hareketleri kontrol edilmelidir. Hastalık çıkan sürülerde, altlık çıkarılması, ekipman ve kümes dezenfeksiyonu için temizliğinin ve dezenfeksiyonundan sonra yeni civciv girişinden önce işletmenin 2-3 hafta boş bırakılması gerekir (Vergas ve Terzolo, 2004b).

1.14.2. Aşılama

Son zamanlara kadar aşılarda çoğu sadece Page A ve C serovarlarını içeriyordu. Bu bivalent aşı konseptinin nedeni Page B serovarının gerçek bir serovar olmadığı ve Page A ve C serovarlarının çapraz bağışıklık sağladığı konusundaki görüşe dayanıyordu. Bugün ise serovar B'nin farklı bir serovar olduğu bilinmektedir ve trivalent aşılarda geliştirilmiştir (Jacobs ve ark., 1992).

Bakterinlerin genellikle kanatlılara 10-20 haftalık yaşta enjekte edilmesi ve beklenen bir salgından 3-4 hafta önce yapılmasının uygun olduğu belirtilmiştir. Aşının kas içi veya deri altı yolla uygulanması etkilidir (Blackall ve Reid, 1987). Adjuvant içeren inaktif aşılarda tek doz uygulamasından sonra belirgin bağışıklığın 9 ay, iki doz aşı uygulamasının ise 56 hafta etkili olduğu gösterilmiştir (Blackall, 1995).

İnaktif İK bakterinleri sadece aşıda mevcut bulunan Page serovarlarına karşı koruma sağladığından, bakterinlerin hedef popülasyonda bulunan serovarları içermesi son derece önemlidir. Ayrıca Page B serovarının endemik olduğu bölgelerde, serovar B'nin farklı suşları arasında birbirlerine karşı tam koruma sağlamaması nedeniyle otojen bir bakterinin hazırlanması yarar sağlayabilmektedir (Yamaguchi ve ark., 1991).

Tavuklarda İK'ya karşı aşılama A-1, B-1 ve C-2 serovarlarını içeren trivalan aşılarla yapılması, varyant serovar B salgınlarının görüldüğü bölgelerde tetravalan aşıların kullanımı tavsiye edilmektedir. Bazı durumlarda bu aşılarla lokal izolatların dahil edilmesinin, aşının koruyucu etkisini güçlendirebileceği bildirilmiştir (Vergas ve Terzolo, 2004b).

Bu tez çalışmasında İK şüpheli tavuklardan *A. paragallinarum*'un izolasyon ve identifikasyonu amaçlanmıştır. Ayrıca aynı klinik örneklerden etkenin moleküler yöntemlerle teşhisi ve sonuçların konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırılması hedeflenmiştir. Daha önce bu konuda yapılan az sayıdaki çalışmalardan farklı olarak bu çalışma, Türkiye'de *A. paragallinarum*'un moleküler tanısının yapılacağı ilk çalışmadır. Çalışmada, İK'nın teşhisinde kullanılacak PCR temelli tekniklerin standardizasyonu ile rutin teşhis ve araştırma amaçlı kullanımının sağlanması ve NAD-bağımsız suşların varlığının araştırılması da amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Örnekler

Bu çalışma kapsamında solunum sistemi enfeksiyonu ya da tipik İnfeksiyöz Koriza bulguları gösteren yumurtacı, broyler ve broyler damızlık sürülerden alınan materyaller incelendi. Bu amaçla 49 yumurtacı kümeden 245 adet, 24 broyler damızlık kümeden 130 adet ve 22 broyler kümeden 125 adet tavuk olmak üzere toplam 95 kümeden 500 adet tavuk materyali toplandı (Çizelge 2.1). Solunum sistemi problemlili tavukların infraorbital sinuslarından alınan svaplar etken izolasyonu amacıyla besiyerlerine ekildi. Svap örnekleri alınmadan önce infraorbital sinus bölgesindeki deri spatula ile yakıldı ve steril bistüri yardımıyla açılan sinuslardaki içerik çevresel kontaminasyon olmamasına dikkat edilerek alındı. Ekim işlemini takiben svab örnekleri PCR analizi için % 15 gliserol içeren PBS içinde saklandı.

Çizelge 2.1. İncelenen materyallerin orijini, yetiştirme yönleri ve sayıları

Materyalin orijini	Yetiştirme yönü	Kümes sayısı	Materyal sayısı
ÇORUM	Yumurtacı	18	77
İZMİR	Yumurtacı	2	12
BALIKESİR	Yumurtacı	2	8
KONYA	Yumurtacı	7	40
YOZGAT	Yumurtacı	5	25
AFYON	Yumurtacı	5	30
ANKARA	Yumurtacı	3	20
BOLU	Yumurtacı	7	33
	Broyler damızlık	24	130
	Broyler	22	125
TOPLAM		95	500

2.1.2. *Avibacterium paragallinarum* referans suşları

Çalışmada kontrol amacıyla kullanılan 9 adet *A. paragallinarum* Kume referans suşları, Dr. P. J. Blackall (The Animal Research Institute, Morooka, Avustralya)'dan temin edildi. Liyofilize halde sağlanan suşlar 5-7 günlük embriyolu tavuk yumurtasına ekimleri yapılarak canlandırıldı ve 24-48 saatlik inkubasyon sonrası toplanan yumurta sarıları – 70 °C’de saklandı.

2.1.3. Solüsyonlar

Karbonhidrat Solüsyonları

Karbonhidrat fermentasyon testlerinde kullanılmak üzere glukoz, galaktoz, laktoz, maltoz, mannitol, sorbitol, sükroz, trehaloz ve ksilozun (Merck) distile suda % 10'luk çözeltileri hazırlandı. Sterilizasyon amacıyla milipor filtrelerden (0,2 µm; Acrodisc) geçirildi ve testlerde kullanıldı.

Gliserollü PBS

K ₂ HPO ₄ (Potasyum Hidrojen Fosfat; Merck)	10 g
KH ₂ PO ₄ (Potasyum Dihidrojen Fosfat; Merck)	5 g
NaCl ₂ (Sodyum klorür; Merck)	18 mg
Distile su	1000 ml

Yukarıdaki şekilde hazırlanan PBS solüsyonunun pH'sı 7,2'ye ayarlandı. % 15 oranında gliserol eklenerek, otoklavlandıktan sonra 3 ml'lik steril kapaklı tüplere dağıtıldı.

Oleik Albumin Kompleks

Sodyum oleat solüsyonu, 0,3 ml oleik asit ile 25 ml 0,05 N NaOH (Sodyum hidroksit) karıştırılarak hazırlandı. 23,75 g sığır albumin fraksiyon V (JRH Biosciences), 475 ml FTS içinde çözdürülerek albumin solüsyonu hazırlandı ve 25 ml sodyum oleat solüsyonu albumin solüsyonu ile karıştırıldı. Karışımın pH'sı 6.8'e

ayarlandı ve milipor filtreden (0,2 µm; Acrodisc) geçirilerek sterilize edildi. 37 °C'lik su banyosunda bir gece, ertesi gün 56 °C'lik su banyosunda 30 dk bekletildi ve 4 °C'de saklandı.

NADH Solüsyonu

Kullanılacak miktar göz önüne alınarak toz halindeki NADH (Roche Diagnostics) son hacmi % 1 (w/v) olacak şekilde distile suda çözündürüldü. Sterilizasyon için milipor filtreden (0,2 µm; Acrodisc) geçirildikten sonra küçük hacimlere paylaştırıldı ve 4 °C'de saklandı.

Tiamin Solüsyonu

Toz halindeki 0,05 g tiamin (Merck) 100 ml distile suda çözündürüldü. Sterilizasyon için milipor filtreden (0,2 µm; Acrodisc) geçirildikten sonra küçük hacimlere paylaştırıldı ve 4 °C'de saklandı.

2.1.4. Besiyerleri

İzolasyon amacıyla aşağıda içerikleri verilen Columbia Blood Agar (Oxoid; % 7 lize at kanlı) ve Tryptose Blood Agar (Difco; % 5 koyun kanlı) kullanıldı. İzole edilen bakterilerin identifikasyonunda yapılan biyokimyasal testler için Brain Heart Infusion Broth (Lab M), Phenol Red Broth, Test Medium Broth ve Test Medium Agar'dan yararlanıldı. X/V faktör gereksinimlerini belirlemek için Test Medium Agar, içinden NADH ve serum çıkarılarak (TM besiyeri) kullanıldı.

Columbia Blood Agar (CBA; Oxoid)

Special Peptone	23 g
NaCl ₂	5 g
Starch	1 g
Bacteriological Agar	10 g
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,3'e ayarlandı. Otoklavlandıktan sonra soğutuldu ve petrilere dökülmeden önce içerisine % 7 lize at kanı ve vankomisin (25 µg/ml) ilave edildi. Lize at kanı, defibrine taze at kanının 56 °C'lik su banyosunda 40 dk süreyle bekletilmesiyle hazırlandı ve hazırlanan lize at kanı – 20 °C'de saklandı.

Brain Heart Infusion Broth (BHIB; Lab M)

Calf brain infusion	200 g
Beef heart infusion	250 g
Protease peptone	10 g
NaCl ₂	5 g
Glikoz	2 g
Disodyum phosphate	2.5 g
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra otoklavlanarak sterilize edildi. Soğutulduktan sonra, tüplere paylaştırılmadan önce içine steril at serumu (% 1) ve NADH (% 0,0025) ilave edildi.

Test Medium Agar (TM/SN)

Biosate Peptone (Sigma)	10 g
NaCl ₂ (Sodyum klorür; Merck)	10 g
Starch (Merck)	1 g
Glikoz (Merck)	0.5 g
Yeast extract (Merck)	0.5 g
Bacteriological Agar (Merck)	15 g
Distile su	1000 ml

Suplementler

% 1 NADH (Roche Diagnostics)	2.5 ml
% 0,05 Tiamin HCl	10 ml
Isıyla inaktive (56 °C/30 dk)	10 ml
O-A Kompleks	50 ml

Yukarıdaki şekilde hazırlanan besiyeri otoklavlanıp soğutulduktan sonra petrilere dökülmeden önce filtrasyon (0,2 µm; Acrodisc) sonrasında steril hale getirilen supplementler eklendi.

Test Medium Broth (TM/B)

Yukarıda içeriği açıklanan TM/SN besiyerinden agarın çıkarılması ile hazırlandı.

Phenol Red Broth

Pancreatic Digest of Casein (Sigma)	10 g
NaCl ₂ (Sodyum klorür; Merck)	5 g
Phenol Red (Merck)	18 mg
Distile su	1000 ml

Yukarıdaki şekilde hazırlanan besiyeri otoklavlandıktan sonra, içine % 0,0025 (w/v) NADH ve % 1 (v/v) oranında tavuk serumu eklenerek tüplere dağıtıldı.

2.1.5. PCR Analizinde Kullanılan Buffer ve Solüsyonlar

Nonidet P-40, Tween 20, Proteinaz K Karışımı

□

Svaplardan DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere, her bir örnek için % 0,5 (v/v) Nonidet p-40 (Sigma), % 0,5 (v/v) Tween 20 (Merck) ve 200 mg/ml proteinaz K (Fermentas) içeren 10-20 µl'lik 1x PCR buffer solüsyonu ekstraksiyon öncesinde hazırlandı.

Primerler

Çalışmada materyallerden direkt PCR analizi için ticari olarak sentezlettirilen HPG-2 primerleri (Primer N1 5'-TGAGGGTAGTCTTGACGCGAAT-3'; Primer R1 5'-CAAGGTATCGATCTGCTCTCTACT-3') kullanıldı (Chen ve ark., 1996). İzole edilen ve Kume referans *A. paragallinarum* suşlarının tiplendirilmesi için kullanılan

ERIC-PCR için ERIC-1R (5'- ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') ve ERIC-2 (5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') primerlerinden yararlanıldı (Soriano ve ark., 2004).

2.1.6. PCR Analizinde Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Bu çalışmada, jel elektroforez cihazı (Wealtec elite 3000 plus), hassas terazi (Scaltec sbc41), pH metre (Orion), UV transillüminatörlü bilgisayarlı görüntüleme sistemi (Genius, Syngene, Bio Imaging System), soğutmalı santrifüj (Hettich), steril kabin (laminar flow) (Bioair Instruments, Aura 2000, Mac), thermal cycler (Biometra) ve vorteks (Fine Vortex) kullanıldı.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

Solunum sistemi problemi olan tavukların infraorbital sinuslarından alınan svab örnekleri Tryptose Blood Agar (TBA) ve Columbia Blood Agar (CBA) besiyerlerine ekildi. Ekim işlemini takiben TBA besiyerindeki ekim hattına dikey olarak Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür koleksiyonundan sağlanan *Staphylococcus aureus* ekildi. Besiyerleri gaspak (Oxoid; BR 0038B) içeren jarlarda 37 °C'de 24-48 saat süreyle inkubasyona kaldırıldı. Üreyen bakteriler ilk olarak koloni morfolojisi, satelitik üreme ve Gram boyanma özellikleri yönünden değerlendirildi. İzole edilen şüpheli kolonilerin identifikasyonu, makroskopik ve mikroskopik morfolojileri ve biyokimyasal özelliklerine göre yapıldı (Blackall ve Reid, 1982). İdentifikasyon için katalaz, indol, nitrat ve karbonhidrat fermentasyon testleri yapıldı. Suşların X/V faktör ihtiyaçları belirlendi. İdentifikasyon için kullanılan katı besiyerlerinin inkubasyonu % 5-10 CO₂'li ortamda ve sıvı besiyerlerinin inkubasyonu ise aerobik koşullarda yapıldı. İdentifikasyonda yapılan testlerde kontrol suş olarak Kume referans *A. paragallinarum* 221 suşu kullanıldı.

Katalaz Testi

Bir öze dolusu bakteri bir lam üzerinde % 3'lük hidrojen peroksit ile karıştırıldı ve köpürme pozitif kabul edildi (Blackall ve Reid, 1982).

X ve V faktör gereksinimlerinin belirlenmesi

Bu amaçla bakterinin TM/SN besiyeri veya CBA'da bakterinin saf kültürü üretildi. Bir gecelik bakteri kültürü öze ile alındıktan sonra PBS ile süspanse edildi. TM/SN'den serum ve NAD çıkarılarak hazırlanan besiyerinde birbirine eşit mesafede belirlenen 3 noktaya X, V ve X/V oxoid diskleri yerleştirilmeden önce öze ile bakteri ekimleri yapıldı ve ekim hatlarının ortalarına diskler yerleştirilerek inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrası disklerin etrafındaki üreme durumları incelenerek, üreme için söz konusu maddelere duyulan ihtiyaç belirlendi (Blackall ve Farrah, 1985).

Nitrat Testi

Rutin identifikasyon için kullanılan nitrat besiyerine supplementler (% 0,0025 NADH ve % 1 at serumu) katıldıktan sonra PBS ile sulandırılan bakteri kültürü ile inokule edildi. İnkubasyon sonrası tüplere nitrat ayıraçlarından birer ml ilave edildi. Kiremit kırmızısı rengin oluşması pozitif kabul edildi (Ok, 1996).

Üreaz Testi

Rutin identifikasyon için kullanılan Christensen besiyerine (Oxoid) supplementler (% 0,0025 NADH ve % 1 at serumu) katıldıktan sonra PBS ile sulandırılan bakteri kültürü ilave edildi. İnkubasyon sonrasında besiyerinin pembe renge dönüşmesi pozitif olarak kabul edildi (Ok, 1996).

İndol Testi

İçerisinde % 1 at serumu, %0,0025 NADH ve %0,1 triptofan bulunan BHIB besiyerine bakteri inokulasyonu yapıldı. İnkubasyon sonrasında besiyeri kültürüne indol ayırıcı damlatıldı. Pembe-kırmızı halka pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (Ok, 1996).

Karbonhidrat Fermentasyon Testleri

İdentifikasyon amacıyla yapılan karbonhidrat fermentasyon testleri, phenol red buyyonda yapıldı. Bu besiyerine % 1 oranında test edilen karbonhidrat ilave edildi ve besiyerine PBS ile süspanse edilen bakteri kültüründe 0,1 ml ilave edildi. İnkubasyon sonrasında besiyerinin kırmızıdan sarı renge dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi (Blackall ve Reid, 1982).

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction- PCR) ve ERIC-PCR

Solunum sistemi problemi olan tavuklardan alınan svaplardan direkt *A. paragallinarum* teşhisi; svaplardan izole edilen *A. paragallinarum* suşları ve Kume Referans suşlarının doğrulanması amacıyla HPG-2 primerlerinin kullanıldığı PCR uygulandı. Ayrıca izole edilen saha ve referans suşlardan ekstrakte edilen tüm DNA örnekleri ERIC-PCR ile incelendi. Bu amaçla svap örneklerinden ve izolatlardan ilk aşamada DNA ekstraksiyonu yapıldı. Bu aşamayı takiben amplifikasyon ve nükleik asitlerin görüntülenmesi aşamaları gerçekleştirildi.

DNA Eldesi (Ekstraksiyon)

Svap örneklerinden DNA ekstraksiyonu: Svaplar, içinde 1 ml PBS bulunan ependorf tüplere daldırıldı ve iyice karıştırıldı. Ependorf tüpler 2.000 rpm’de 3-5 dk santrifüj edildi ve üst sıvı başka bir tüpe alındı. Bu işlemi takiben üst sıvı 13.000

rpm'de 15 dk santrifüj edilirdi. Üst sıvı atılarak oluşan pelet DNA ekstraksiyonu için kullanıldı. PCR öncesinde pelet % 0,5 (v/v) Nonidet p-40, % 0,5 (v/v) Tween 20 ve 200 µg/ml proteinaz K içeren 10-20 µl'lik 1x PCR buffer'da süspanse edildi. Örnekler 56 °C'lik su banyosunda 1 saat bekletildi. Proteinaz K'yı inaktive etmek için örnek 98 °C'de 10 dk ısıtıldı. Örnek PCR için kullanılmadan önce buzda 10 dk bekletildi ve elde edilen süspansiyon ekstrakte DNA örneği olarak PCR'da kullanıldı (Chen ve ark, 1996).

Bakteri kültürlerinden DNA ekstraksiyonu: Bu çalışmada izole edilen ve referans suşların DNA ekstraksiyonu, kaynatma metodu ile yapıldı. Ekstrakte edilen DNA'lar hem PCR hem de ERIC-PCR'da ortak olarak kullanıldı. DNA ekstraksiyon işleminde bir-iki adet *A. paragallinarum* kolonisi 0,6 ml'lik bir PCR tüpünde 10-20 µl distile su içine süspanse edildi. Örnekler 98 °C'de 10 dk kaynatıldı ve 10 dk buzda bekletildi ve elde edilen süspansiyon ekstrakte DNA örneği olarak PCR'da kullanıldı (Chen ve ark, 1996).

PCR Amplifikasyon

PCR işlemi Chen ve ark. (1996) tarafından bildirilen metot modifiye edilerek uygulandı. Amplifikasyon için ekstrakte edilen her bir DNA örneği için 50 µl'lik PCR karışımı hazırlandı. PCR karışımı, 5 µl 10 x PCR buffer (Fermentas), 0,2 µl primerler, 0,25 µl Taq polimeraz enzimi (Fermentas), 1 µl dNTP (Fermentas) ve 5 µl MgCl₂ (Fermentas) karışımından oluştu. Bu karışım DNase ve RNase enzimlerinden arı steril su ile 45 µl'ye tamamlandı ve üzerine 5 µl ekstrakte DNA eklendi. Örnekler thermal cyclera yüklendi ve 98 °C'de 2,5 dk'lık ön denaturasyonu takiben 25 siklusa 94 °C'de 1 dk, 65 °C'de 1 dk ve 72 °C'de 2 dk olarak gerçekleştirildi. Bunu takip son siklus ise 94 °C'de 1 dk, 65 °C'de 1 dk ve 72 °C'de 10 dk'da gerçekleştirildi.

ERIC- PCR Amplifikasyon

Soriano ve ark. (2004) tarafından bildirilen metot modifiye edilerek uygulandı. Her bir örnek için 50 µl'lik PCR karışımı 5 µl 10 x PCR buffer (Fermentas), 0,2 µl primerler, 0,2 µl Taq polimeraz enzimi (Fermentas), 1 µl dNTP (Fermentas) ve 7,5 µl MgCl₂ (Fermentas) ile hazırlandı. Bu karışım DNase ve RNase enzimlerinden arı steril su ile 46 µl'ye tamamlanarak üzerine 4 µl ekstrakte DNA eklendi. Örnekler thermal cyclera yüklendi ve 94 °C'de 5 dk'lık ön denaturasyonu takiben 35 siklus 94 °C'de 1 dk, 52 °C'de 1 dk ve 74 °C'de 6 dk olarak gerçekleştirildi ve siklus 74 °C'de 6 dk ile tamamlandı.

Nukleik Asitlerin Görüntülenmesi

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan jelin hazırlanması: PCR ve ERIC-PCR sonucunda amplifiye olan örneklerin elektroforezinde % 1'lik agaroz jel kullanıldı. Bunun için 2 g agaroz (Basica Le Agarose, Prona) tartılarak steril bir erlene konuldu. Üzerine Tris Borate EDTA (TBE; AppliChem) buffer (x 5 konsantrasyonda)'dan 200 ml eklenerek karıştırıldı. Su banyosunda agaroz eriyene kadar tutuldu. Eriyen agaroz soğutulduktan sonra içerisine ethidium bromide (0,5 µg/ml) eklenerek karıştırıldı ve yatay DNA elektroforez cihazının kalıbına döküldü. Hemen tarak yerleştirilerek örnek çukurları hazırlandı.

PCR örneklerinin elektroforezi ve görüntüleme: Agaroz jel hazırlandıktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi ve tanka jelin yüzeyini kaplayacak şekilde 5 x TBE buffer ilave edildi. PCR örneklerine % 20 oranında yükleme boyası (Fermentas) eklenip karıştırıldıktan sonra jeldeki gözlere 10 µl'lik hacimlerde yüklendi. Birinci göze DNA marker eklendi. Elektroforez cihazı güç kaynağına bağlanarak sabit akımda 160 volt'ta 60 dk elektroforeze edildi. Sonuçlar UV-transilluminatorda incelenerek görüntüleme ünitesinden fotoğraflandı.

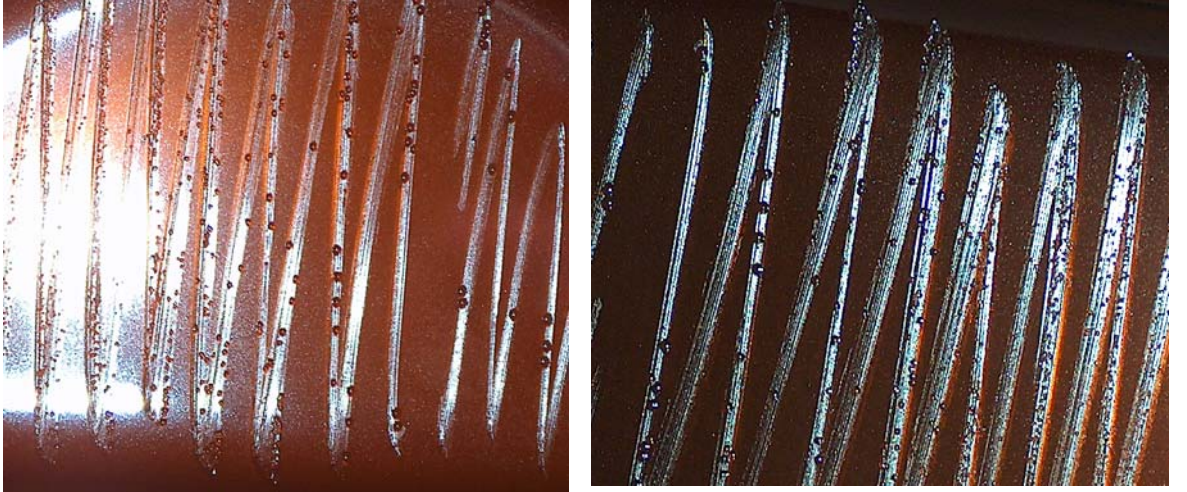
3. BULGULAR

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

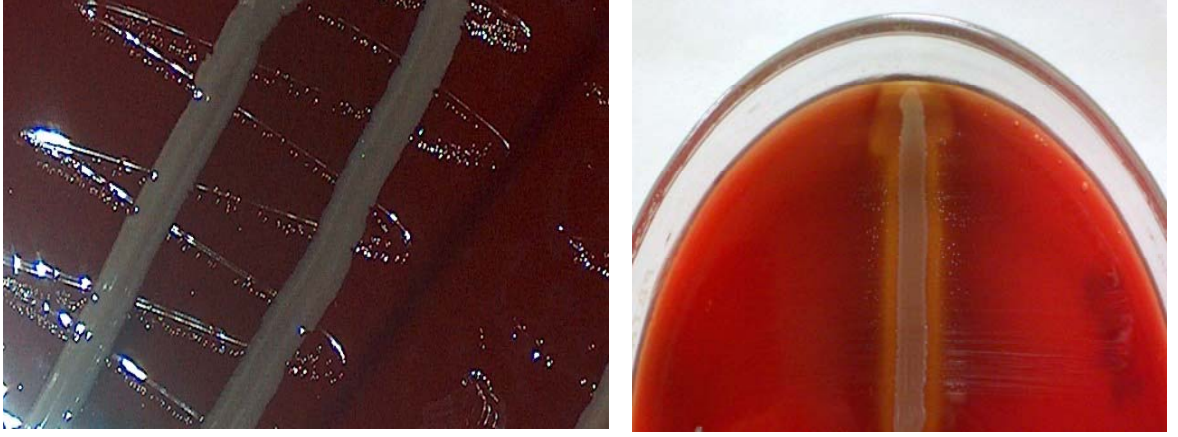
Çalışmada 95 kümeden alınan svap örneklerinden 3 (% 3,15) kümeste *A. paragallinarum* izolasyonu gerçekleştirildi. Çalışma kapsamında izolasyon yapılan 3 kümesin yumurtacı kümes olduğu belirlendi. Broyler ve broyler damızlık kümeslerinden alınan hiçbir materyalde *A. paragallinarum* izolasyonu yapılamadı. Yetiştirme yönüne göre izolasyon oranları değerlendirildiğinde; incelenen toplam 49 yumurtacı kümesin 3 (% 6,12)'ünde İnfeksiyöz Koriza'nın olduğu belirlendi. *A. paragallinarum* izolasyonu, ikisi Çorum'dan ve biri Balıkesir'den sağlanan kümeslerden gerçekleştirildi ve bu kümeslerden farklı hayvanlara ait svablardan olmak üzere Çorum'dan 6 adet ve Balıkesir'den 1 adet *A. paragallinarum* suşu izole edildi. İzolasyon için bütün svaplar % 7 lize at kanlı CBA ve % 5 koyun kanlı TBA'a eşzamanlı olarak ekildi. 7 adet *A. paragallinarum* suşunun 7'si de CBA'da izole edilirken, bunlardan 5 tanesi TBA'da izole edildi. İzole edilen *A. paragallinarum* suşlarının farklı besiyerlerindeki görünümleri Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'de sunulmuştur. İzole edilen tüm suşların Gram negatif, kokobasil morfolojisinde olduğu görüldü ve katalaz, indol, nitrat negatif ve üreaz pozitif reaksiyon verdi. Yapılan karbonhidrat fermentasyon testleri sonucunda suşların glukoz, maltoz, mannitol, sükroz ve sorbitol pozitif olduğu bulunurken; galaktoz, laktoz, trehaloz ve ksiloz negatif olduğu saptandı.



Şekil 3.1. TM/SN besiyerinde *A. paragallinarum* kolonilerinin görünümü



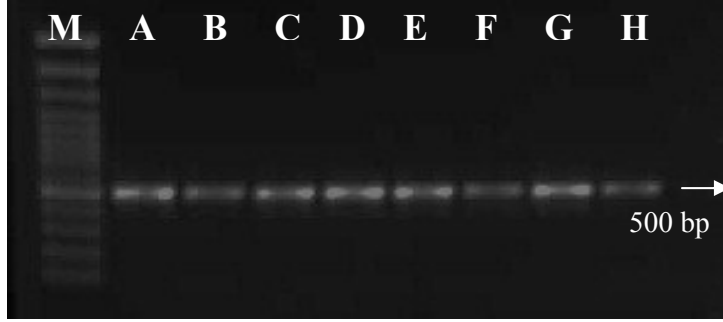
Şekil 3.2. CBA besiyerinde *A. paragallinarum* kolonilerinin görünümü



Şekil 3.3. BTA’da *A. paragallinarum* kolonilerinin satelitik ve çığ damlası şeklindeki görünümü

3.2. PCR ve ERIC-PCR Bulguları

Solunum sistemi problemi olan tavuklardan alınan svaplardan direkt *A. paragallinarum* teşhisi için yapılan PCR işleminde, 95 kümesin 11 (% 11,6)’inde *A. paragallinarum* için spesifik olan 500 pb büyüklüğünde bantlar elde edildi ve bu kümesler pozitif olarak kabul edildi (Şekil 3.6.). PCR ile pozitif bulunan 11 kümesin tamamının yumurtacı kümeslere ait olduğu saptandı ve bu bulgu yetiştirme yönüne göre yapılan değerlendirme ile solunum sistemi problemi olan yumurtacı sürülerin % 22,45’inde İK olduğunu gösterdi. PCR yöntemiyle, saha suşlarının izole edildiği Balıkesir ve Çorum İl’lerinin yanı sıra; Konya, Afyon ve Yozgat’tan gelen swap örneklerinde de 23 adet pozitiflik saptanarak, bu illerde de hastalığın varlığı belirlenmiş oldu. Böylece yumurtacı tavuklarda PCR ile belirlenen toplam pozitif swap örneği sayısı 30 (% 12,24) adet olarak belirlendi (Çizelge 3.1.; 3.2.). Broyler ve broyler damızlık kümeslerden sağlanan örneklerde PCR ile negatif sonuç alındı. Bakteriyolojik yöntemlerle *A. paragallinarum* izolasyonu yapılan üç kümese ait örnekler PCR ile de pozitif sonuç verdi. Bu bulguların, bakteriyolojik yöntemlerle elde edilen bulguları desteklediği belirlendi.



Şekil 3.4. *A. paragallinarum* Kume referans suşlarının PCR ile doğrulanması. M, Marker (3 kb DNA ladder); A, 2403 (Serovar A-2); B, HP60 (Serovar C-4); C, Modesto (Serovar C-2); D, 221 (Serovar A-1); E, HP14 (Serovar A-4); F, E-3C (Serovar A-3); G, 2671 (Serovar B-1); H, SA-3 (Serovar C-3);

İzole edilen saha suşlarının ve Kume Referans suşlarının doğrulanması için yapılan PCR'da, tüm suşların pozitif sonuç vermesi, hem direkt teşhiste hem de izolatların doğrulanmasında PCR analizinin yararlı olduğunu gösterdi (Şekil 3.4.; 3.5.).

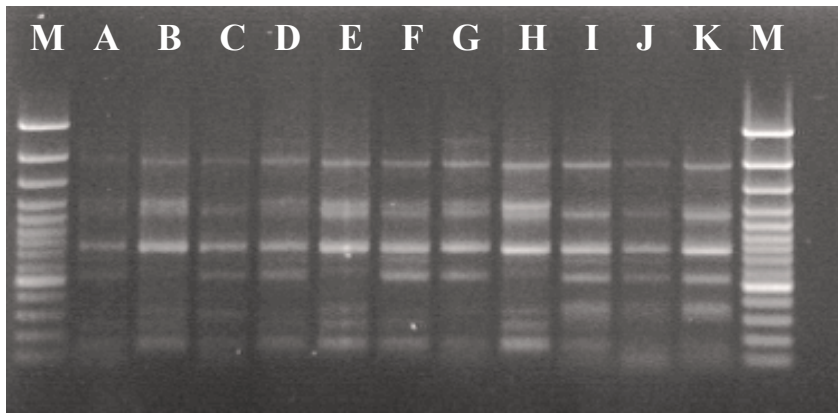


Şekil 3.5. İzole edilen *A. paragallinarum* suşlarının PCR ile doğrulanması. M, Marker (3 kb DNA ladder); A, Bandırma suşu ; B, Çorum 1(1. kümes); C, Çorum 2 (1. kümes); D, Çorum 3 (2. kümes); E, Çorum 4 (2. kümes); F, Çorum 5 (2. kümes); G, Çorum 6 (2. kümes).



Şekil 3.6. PCR ile *A. paragallinarum* yönünden pozitif olduğu saptanan svap örneklerinden bazıları orijinleriyle belirtilmiştir. M, Marker (3 kb DNA ladder); A, Afyon (3. Kümes); C, Konya (1. kümes); D, Konya (1. kümes); E, Konya (1. kümes); G, Konya (1. kümes); I, Bandırma (1. kümes); J, Çorum (3. kümes); M, Marker (3 kb DNA ladder).

Saha suşlarının ve referans suşların yapılan ERIC-PCR analizinde, farklı ERIC-PCR paternlerinin varlığı saptandı. Saha suşlarının izole edildiği kümelere göre, kümes içinde ERIC-PCR paternleri benzer bulunurken, kümesler arası paternlerin farklı olduğu belirlendi (Şekil 3.7.). Bu bulgu, izolasyon yapılan kümeslerdeki *A. paragallinarum* suşlarının moleküler olarak farklı olduğunu gösterdi. Moleküler olarak farklı bulunan bu suşların bu tezde incelenen fenotipik özellikler bakımından aynı bulunması, *A. paragallinarum* suşlarının tiplendirilmesinde moleküler tekniklerin epidemiyolojik olarak yarar sağladığını gösterdi.



Şekil 3.7. *A. paragallinarum* Kume referans suşları ve Bandırma – Çorum izolatlarının ERIC-PCR profili. M, Marker (3 kb DNA ladder); A, HP-60 (Serovar C-4); B, 221 (Serovar A-1); C, SA-3 (Serovar C-3); D, HP-14 (Serovar A-4); E, 2403 (Serovar A-2); F, Modesto (Serovar C-2); G, E-3C (Serovar A-3); H, 2671 (Serovar B-1); I, Çorum 1 (1. kümes); J, Çorum 2 (1. kümes); K, Bandırma (1. kümes); M, Marker (3 kb DNA ladder).

3.3. İzolasyon ve PCR Bulgularının Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi

Solunum sistemi problemi olan kümeslerden *A. paragallinarum* yönünden yapılan izolasyon çalışmaları ile PCR sonuçları karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde; PCR testinin kültür işlemine göre daha yüksek oranda pozitif sonuç verdiği belirlendi (Çizelge 3.1. ve 3.2). İzolasyon çalışmalarında düşük düzeyde pozitiflik saptanması, bu tekniğin her koşulda tek başına teşhis yöntemi olarak kullanılamayacağını ortaya koydu. Altyapısı uygun laboratuvarlarda PCR tekniğinin İK şüpheli materyallerde rutin teşhis amacıyla kullanılmasının hastalıkların etiyolojisini belirlemede daha uygun olduğu, ancak ileri düzeyde analizlerde ve moleküler tiplendirme

çalışmalarında izolasyon tekniğinin kullanılmasının yararlı olduğunu ortaya kondu. Ayrıca bu çalışmada izolasyon ve PCR ile pozitif sonuç bulunan kümeslerin yumurtacı sürüler olması, bu hastalığın yumurtacı sürüler için daha önemli olduğunu gösterdi.

Çizelge 3.1. Kültür ve/veya PCR Pozitif Örneklerin Dağılımı

Orijin	İzole edilen suş sayısı	PCR ile belirlenen pozitif örneklerin sayısı
Bandırma 1. kümes	1	2
Çorum 1.kümes	2	2
Çorum 2.kümes	4	5
Çorum 3. kümes	0	2
Yozgat 4. kümes	0	3
Yozgat 5. kümes	0	4
Afyon 1. kümes	0	1
Afyon 2. kümes	0	2
Afyon 3. kümes	0	4
Konya 1. kümes	0	3
Konya 2. kümes	0	2
TOPLAM	7	30

Çizelge 3.2. Kültür ve PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması

	PCR pozitif		PCR negatif	
	Örnek sayısı	Kümes sayısı	Örnek sayısı	Kümes sayısı
Kültür pozitif	7	3	0	0
Kültür negatif	23	8	470	84

4. TARTIŞMA

Tavuklarda solunum sistemi infeksiyonları, oldukça yaygın görülen ve önemli ekonomik kayıplara neden hastalıklardır. Bu nedenle tavuklarda solunum sistemi hastalıklarının kontrolünün yapılması, bu kayıpları önlemede temel oluşturmaktadır. Solunum sistemi hastalıklarının etiyolojilerinin belirlenmesi ve hastalıkların şiddetini etkileyen diğer faktörlerin ortaya konması, koruma ve kontrol önlemlerinin düzenlenmesi için gereklidir. Ülkemizde özellikle yumurta yönlü yetiştirmelerde İnfeksiyöz Koriza'nın sıklığı ile epidemiyolojik bilgiler oldukça sınırlı düzeydedir ve solunum sistemi hastalıklarında *Avibacterium paragallinarum*'un rolü tam olarak ortaya konamamıştır. Bu çalışmada, İK şüpheli tavuklardan *A. paragallinarum*'un klasik yöntemlerle izolasyonu, moleküler teşhisi ve moleküler tiplendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında incelenen 95 tavuk sürüsünün 3 adedinde *A. paragallinarum* izole ve identifiye edildi. Etken izolasyonu gerçekleştirilen üç sürünün de üretim dönemindeki yumurtacı sürüler olduğu belirlendi. Bu bulgu, ergin tavukların İK'ya daha duyarlı olduğunu bildiren Blackall ve ark. (1997) bulgularını destekler niteliktedir.

Tavuklarda İK'nın ortaya konması için yapılan izolasyon ve identifikasyon çalışmalarında, materyalin önemi farklı araştırmacılarla ortaya konmuştur (Ok, 1996; Chen ve ark., 1998b; Blackall, 1999; Byarugaba, 2007b). Ok (1996), 303 yumurtacı tavuktan aldığı akciğer, karaciğer, dalak, kalp, trakeal svap ve infraorbital sinus svabı örneklerini kültürle incelemiş ve hepsi infraorbital sinus svaplarından olmak üzere 16 adet *A. paragallinarum* izolasyonu gerçekleştirmiştir. Tavuklarda İK şüpheli materyallerden *A. paragallinarum* izolasyonunun düşük olmasının yaygın antibiyotik kullanımı ile ilişkili olabileceği ortaya konmuştur (Chen ve ark., 1998b). İlave olarak uygun örnek alınmaması, materyallerin laboratuvara ulaştırılmasında yaşanan gecikmelerin de izolasyonu zorlaştırdığı bildirilmiştir (Byarugaba, 2007b). Bu tez

çalışmasında materyal olarak sadece infraorbital sinus svabı kullanılmıştır. Pozitif bulunan 3 küme ait alınan svab örneklerinden ayrı ekimler sonrasında 7 adet *A. paragallinarum* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada diğer organlardan izolasyon çalışması yapılmadığından ve tedavi ile ilgili yeterince bilgi alınamadığından diğer çalışmalarla herhangi bir karşılaştırma yapılmamıştır.

Bu tez çalışmasında yumurtacı, broyler ve broyler damızlıklardan alınan materyallerden sadece yumurtacı sürülere ait materyallerden etken izolasyonu yapılmıştır. Ayrıca PCR çalışmasında da sadece yumurtacı sürülerde pozitiflik saptanmıştır. Bu bulgu, *A. paragallinarum* nedenli infeksiyonların öncelikli olarak yumurtacı sürüler için önemli olduğu, broiler ve broiler damızlıklarda ise bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre önemli olmadığı ortaya konmuştur. Bu bulgu infeksiyöz korizanın yumurtacı sürüler için önemini bildiren çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (Blackall ve Yamamoto, 2006; Blackall, 1999; Soriano ve Terzolo; 2004b). Broyler ve broyler damızlıkları ile ilgili daha detaylı çalışmaların yapılması, bu bakteriye bağlı infeksiyonların ne sıklıkta bu yetiştirme yönlerindeki tavuklarda görüldüğünün belirlenmesi için önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, toplanan tüm materyallerden *A. paragallinarum*'un izolasyonu amacıyla % 5 koyun kanlı Blood Tryptose Agar ve % 7 lize at kanı ve vancomycin içeren Colombia Blood Agar eşzamanlı olarak kullanılmıştır. Üç küme ait svap örneklerinden TBA'da 5 adet izolasyon yapılırken CBA'da 7 adet *A. paragallinarum* izolasyonu yapılmıştır. Bu bulgu, CBA'nın etken izolasyonunda daha kullanışlı olduğunu göstermiş ve bu durum CBA'nın antibiyotik içermesi ile açıklanmıştır. Çalışmada elde edilen bu bulgu, Terzola ve ark. (1993)'nın bulgularıyla uyumlu bulunmuştur.

Bu çalışmada izole edilen *A. paragallinarum*'un X, V faktör ihtiyacını belirlemek için TM besiyeri ve Oxoid X, V ve XV faktör diskleri kullanılmıştır. Tüm suşlar, X faktör diski etrafında üremezken; V faktör ve XV faktör diskleri etrafında üreme gözlemlendi. Bu bulgu, izole edilen tüm *A. paragallinarum* suşlarının üremesi için sadece V faktöre ihtiyaç gösterdiğini ortaya koydu ve konu ile ilgili olarak

Blackall (1983), Blackall (1988a), Blackall ve ark. (1990e), Reid ve Blackall (1984) ve Sawata ve ark. (1979) bulgularıyla uyumlu bulundu.

Bu çalışmada izole edilen tüm suşların incelenen biyokimyasal özellikleri benzer bulundu ve suşlar arasında bir farklılık saptanmadı. Farklılığın saptanmaması, izolatların az sayıda olması ve çoğunun aynı kümes orijinli olması ile açıklandı. Bu bulgu, *A. paragallinarum* suşlarının biyokimyasal olarak çok fazla varyasyon göstermediği bildiren araştırmacıların (Page, 1962; Blackall ve Reid, 1982; Chen ve ark, 1993; Terzola ve ark, 1993; Blackall ve ark, 1994; Ok. Ü, 1996) bulgularını destekler niteliktedir.

İK şüpheli hayvanlardan *A. paragallinarum* teşhisi için son yıllarda PCR temelli teknikler geliştirilmiştir. Bu teknikler hastalık etkeninin hızlı ve doğru tanısında izolasyon ve identifikasyon çalışmalarına göre bazı avantajları bulunmaktadır. Bu çalışmada, izolasyon çalışmaları için ekim işlemi takiben aynı infraorbital svap örnekleri PCR ile incelendi. PCR ile incelenen 95 kümeden 11 (% 11,6)'i pozitif bulundu. Kümeslerden alınan svabların ayrı ayrı incelenmesi sonunda 30 svab örneğinde *A. paragallinarum* için spesifik bandlar saptandı. Bu bulgu, PCR testinin kültür işlemine göre pozitif vakaların belirlenmesinde oldukça duyarlı olduğunu gösterdi. İK şüpheli vakalarda etken izolasyonunu ile birlikte PCR tekniğini ile de *A. paragallinarum*'un araştırılmasının, kesin etiyolojinin ortaya konması için gerekli olduğunu gösterdi. Kültür ve PCR ile ilgili yapılan çalışmalarda; Chen ve ark. (1998a), inceledikleri 127 örnekte kültürle 21, PCR ile 29 adet pozitiflik saptamışlardır. Benzer bir çalışmada ise, Byarugaba ve ark. (2007b) 68 örnekten 5'inde *A. paragallinarum* izolasyonu gerçekleştirirken, PCR ile 11 örnekte *A. paragallinarum* için spesifik bandları saptamışlardır. Her iki çalışmada da PCR ile etkenin varlığı kültür işlemine göre daha yüksek oranda saptanmıştır. Bu çalışmada elde edilen bulgular, Chen ve ark. (1998a) ve Byarugaba ve ark. (2007b) tarafından bildirilen bulgularla uyumludur. Ayrıca bu çalışmada Byarugaba ve ark. (2007b)'ın bulgularına paralel şekilde PCR ile pozitifliği saptanan örneklerden dahi etken izolasyonunun az olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada PCR ile pozitif olduğu belirlenen 30 svap örneğinin sadece 7 adedinden izolasyon yapılmıştır.

A. paragallinarum suşlarının moleküler tiplendirmelerinde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmalarla, izole edilen suşların moleküler benzerliklerini belirlemek mümkün olmakta ve moleküler epidemiyolojik bilgiler sağlanmaktadır. ERIC PCR, moleküler tiplendirme için kullanılan yöntemlerden biridir. Soriano ve ark. (2004b) Kume referans suşlarını da içeren 11 *A. paragallinarum* referans suşunun her birinin farklı ERIC PCR profili gösterdiğini; farklı kaynaklardan sağlanan iki Modesto (C-2) suşunun ise aynı ERIC profiline sahip olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışma ile Meksika orijinli 29 *A. paragallinarum* izolatının 17 farklı ERIC profili gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada ise, izole edilen 7 izolatın 3 farklı ERIC PCR paterni gösterdiği saptanmıştır. Aynı kümeden izole edilen suşların ERIC PCR paternlerinin aynı olması dikkat çekicidir. İzole edilen her kümese ait izolatların farklı ERIC PCR paterni göstermesi, diğer araştırmacıların bulgularını destekler niteliktedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnfeksiyöz koriza şüpheli materyallerden *A. paragallinarum*'un izolasyonu, identifikasyonu, moleküler teşhis ve tiplendirilmesi amacıyla yapılan bu tez çalışmasında aşağıdaki sonuçlara varılmıştır.

- İncelenen yumurtacı kümeslerin üçünde *A. paragallinarum* izolasyonu gerçekleştirildi. Broyler ve broyler damızlıklardan alınan örneklerden izolasyon yapılamadı. Bu bulgu *A. paragallinarum*'un özellikle yumurtacı sürüler için problem oluşturduğunu ortaya kondu.
- *A. paragallinarum*'un izolasyonunun yapılabilmesi için antibiyotik içeren selektif besiyerlerinin kullanmasının, izolasyon oranını arttırdığı belirlendi.
- *A. paragallinarum* teşhisi için PCR tekniği Türkiye'de ilk kez kullanıldı. Bu çalışmalar sonunda, incelenen 95 kümesin 11'inde PCR ile pozitiflik belirlendi. Bu bulgu, PCR tekniğinin kültür yöntemine göre *A. paragallinarum*'un teşhisinde pozitif vakaların belirlenmesinde daha güvenilir olduğunu ortaya koydu.
- Tiplendirme çalışmalarında ERIC PCR tekniği kullanıldı ve farklı kümeslerden izole edilen *A. paragallinarum* suşlarında farklı band paternleri saptandı. Bu teknikle ilgili olarak, moleküler tiplendirmede etkin kullanım için daha fazla suşla çalışılması gerektiği düşünüldü.
- Hem kültür hem de PCR ile *A. paragallinarum* pozitifliğinin belirlenmesi ile bu enfeksiyonun kontrolünde özellikle aşılardan dahil olduğu koruma ve kontrol stratejilerinin uygulanması gerektiği sonucuna varıldı.

ÖZET

Tavuklardan İzole Edilen *Avibacterium paragallinarum* Suşlarının Moleküler Teşhisi ve Tiplendirilmesi

Bu çalışmada solunum sistemi problemi olan yumurtacı, broyler ve broyler damızlık sürülerde *A. paragallinarum*'un izolasyonu, identifikasyonu, moleküler teşhis ve tiplendirilmesi amaçlandı. Bu amaçla toplam 95 kümeden toplam 500 adet tavuğun infraorbital sinuslarından alınan svap örnekleri kültür ve PCR ile incelendi. Alınan svap örnekleri izolasyon amacıyla özel besiyerlerine ekildi ve uygun koşullarda inkube edildi. İnkubasyon sonrasında şüpheli koloniler makroskopik ve mikroskopik morfolojileri ile biyokimyasal özellikleri incelenerek identifiye edildi. İzole edilen saha suşlarının ve Kume referans suşlarının PCR ile doğrulanmasından sonra moleküler tiplendirmeleri ERIC-PCR ile gerçekleştirildi.

İncelenen 95 kümesin 3 (% 3,15)'ünden *A. paragallinarum* izole edildi. İzolasyon sadece yumurtacı kümeslerden gerçekleştirilirken, broiler damızlık ve broiler sürülere ait materyallerden izolasyon ve PCR ile etken tespiti yapılamadı. Direct-PCR ile yapılan çalışmalarda 11 yumurtacı sürü/30 hayvanda *A. paragallinarum* pozitifliği belirlendi. ERIC-PCR ile tiplendirilen Kume referans suşları ve *A. paragallinarum* izolatlarının ERIC paternleri arasında farklılıklar saptandı. Aynı kümeden izole edilen *A. paragallinarum* izolatlarının ERIC paternlerinin aynı olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak, İnfeksiyöz Koriza şüpheli tavuklarda PCR ile izolasyona göre daha yüksek oranda pozitiflik saptanması, *A. paragallinarum* infeksiyonlarının rutin teşhisinde PCR tekniğinin kullanılabilirliğini ve yararlılığını ortaya koydu. Ayrıca izolasyon yapılan ve PCR ile pozitif bulunan materyallerin yumurtacı sürülere ait olması, *A. paragallinarum* infeksiyonunun yumurtacılar için daha önemli bir infeksiyon olduğunu gösterdi. Elde edilen bulgular, *A. paragallinarum* infeksiyonuna bağlı kayıpların ortadan kaldırılmasında aşılamalarında yer aldığı koruma ve kontrol önlemlerinin eksiksiz yürütülmesi gerektiğini ortaya koydu.

Anahtar sözcükler: *A. paragallinarum*, izolasyon, PCR, tavuk

SUMMARY

Molecular Diagnosis and Typing of *Avibacterium paragallinarum* Strains Isolated from Chickens

The aim of this study was isolation, identification, molecular diagnosis and typing of *Avibacterium paragallinarum* from broiler, broiler breeder and layer flocks with suspect of a respiratory disease. For this purpose, a total of 500 infraorbital sinus swab samples from 95 farms were examined by both culture and PCR. The swab samples were cultivated on special growth media for isolation and incubated in suitable conditions. After incubation colonies showing typical macroscopic and microscopic morphology were purified and subjected to confirmatory biochemical testing for identification. After confirmed by PCR, Kume reference strains and field isolates of *A. paragallinarum* were tested by ERIC-PCR for molecular fingerprinting.

A. paragallinarum was isolated from 3 (3,15 %) layer flocks of 95 flocks investigated. Therefore, *A. paragallinarum* isolation was accomplished only from layer flocks. Neither culture nor direct PCR detected any positive chicken amongst broiler breeder and broiler flocks. Direct PCR detected 30 chickens/11 layer flocks as *A. paragallinarum* positive. Typing of Kume reference strains and *A. paragallinarum* isolates by ERIC-PCR revealed different ERIC patterns. ERIC patterns of isolates from same farm were found to be same.

In conclusion, higher positive rate obtained by PCR compared with culture from chickens with suspect Infectious coryza, indicated the usefulness and applicability of PCR technique in routine diagnosis of *A. paragallinarum*. The finding that PCR and culture positive samples originated from only layer flocks showed the importance of the infection to be much more in layer chickens. Obtained results showed that to prevent from loses due to *A. paragallinarum* infections, control and prevention measures containing vaccinations must be taken accurately.

Key words: *A. paragallinarum*, isolation, PCR, chicken

KAYNAKLAR

- ADLER, H. E., PAGE, L. A. (1962) Haemophilus infections in chickens II. The pathology of respiratory tract. *Avian Dis*, **6**: 1-6.
- BERNARD, T. G. (2001). Characterization of the putative Haemagglutinin in Haemophilus paragallinarum. Doktora Tezi. University of the Orange Free State.
- BIBERSTEIN, E. L., WHITE, D. C. (1968) A proposal for the establishment of two new Haemophilus species. *J Med Microbiol*, **2**: 75-77.
- BLACKALL, P. J. (1983) An evaluation of methods for the detection of carbohydrate fermentation in avian *Haemophilus paragallinarum*. *J Microbiol Methods*, **1**: 275-281.
- BLACKALL, P. J. (1988a) Antimicrobiol Drug Resistance and the Occurence of Plasmids in *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis*, **32**: 742-747.
- BLACKALL, P. J. (1988b) Biochemical properties of catalase-positive avian haemophili. *J Gen Microbiol*, **134**: 2801-2805.
- BLACKALL, P. J. (1989) The Avian Haemophili. *Clin Mic Rev*, **2**(3): 270-277.
- BLACKALL, P. J. (1995) Vaccines against infectious coryza. *World Poult Sci J*, **51**: 17-26.
- BLACKALL, P. J. (1999) Infectious Coryza: Overview of the Disease and New Diagnostic Options. *Clin Microbiol Rev*, **12** (4): 627-632.
- BLACKALL, P. J., FARRAH, J. G. (1985) An evaluation of commercial discs for the determination of the growth factor requirements of avian haemophili. *Vet Microbiol*, **10**: 125-131.
- BLACKALL, P. J., MATSUMOTO, M. (2003) Infectious coryza. In *Diseases of poultry*, 11 th ed. Ed: Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, D. A. Swayne. Iowa State University Press. p.: 691-703.
- BLACKALL, P. J., REID, G. G. (1982) Further Characterization of *Haemophilus paragallinarum* and *Haemophilus avium*. *Vet Microbiol*, **7**: 359-367.
- BLACKALL, P. J., REID, G. G. (1987) Further efficacy studies on inactivated, Aluminum-Hydroxide-Adsorbed vaccines against infectious coryza. *Avian Dis*, **31**: 527-532.
- BLACKALL, P. J., YAMAMOTO, R. (1989) Whole-cell protein profiles of *Haemophilus paragallinarum* as detected by poyacrilamide gel electrophoresis. *Avian Dis*, **33**: 168-173.
- BLACKALL, P. J., YAMAMOTO, R. (2006) Infectious coryza. In: *A Laboratory Manual for the isolation and identification of Avian Pathogens*. Ed.: Swayne, D. E., Glisson, J. R., Jackwood, M. W. Int Book Distrubuting Co, Chapter 6.

BLACKALL, P. J., EAVES, L. E., AUS, G. (1990a) Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* by the Page scheme: Comparison of the Use of Agglutinating and Hemagglutinating-Inhibition Tests. *Avian Dis*, **34**: 643-645.

BLACKALL, P. J., EAVES, L. E., MORROW, C. J. (1991a) Comparison of *Haemophilus paragallinarum* isolates by restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA. *Vet Microbiol*, **27**: 39-47.

BLACKALL, P. J., EAVES, L. E., ROGERS, D. G. (1990b). Proposal of a New Serovar and Altered Nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume Hemagglutinin Scheme. *J Clin Microbiol*, **28** (6): 1185-1187.

BLACKALL, P. J., MATSUMOTO, M., YAMAMOTO, R. (1997) Infectious coryza. In: *Diseases of Poultry*, 10 th ed. Ed.: Calnek, B. W., Barnes, H. J, Beard, C. W., McDougald, L. R., Saif, Y.M., Iowa State University Pres, Ames, p.: 179-190.

BLACKALL, P. J., ROGERS, D. G., YAMAMOTO, R. (1990c) Outer-Membran Proteins of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis*, **34**: 871-877.

BLACKALL, P. J., SILVA, E. N., YAMAGUCHI, T., IRITANI, Y. (1994) Characterization of Isolates of Avian Haemophili from Brazil. *Avian Dis*, **38**: 269-274.

BLACKALL, P. J., YAMAGUCHI, T., IRITANI, Y., ROGERS, D. G. (1990d) Evaluation of Two Monoclonal Antibodies for Serotyping *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis*, **34**: 861-864.

BLACKALL, P. J., CHRISTENSEN, H., BECKENHAM, T., BLACKALL, L. L., BISGAARD, M. (2005) Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov., and *Avibacterium volantium* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, **55**: 353-362.

BLACKALL, P. J., MORROW, C. J., MCINNES, A., EAVES, L. E., ROGERS, D. G. (1990e) Epidemiological Studies on Infectious Coryza Outbreaks in Northern New South Wales, Australia, Using Serotyping, Biotyping, and Chromosomal DNA Restriction Endonuclease Analysis. *Avian Dis*, **34**: 267-276.

BLACKALL, P. J., ZHENG, Y. Z., YAMAGUCHI, T., IRITANI, Y., ROGERS, D. G. (1991b) Evaluation of a Panel of Monoclonal Antibodies in the Subtyping of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis*, **35**: 955-959.

BRAGG, R. R. (2002a) Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 1: NAD-dependent field isolates. *Onderstepoort J Vet Res*, **69**: 163-169.

BRAGG, R. R. (2002b) Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 2: Naturally occurring NAD-independent field isolates. *Onderstepoort J Vet Res*, **69**: 171-175.

BRAGG, R., COETZEE, L., VERSCHOOR, J. A. (1993a) Plasmid-encoded NAD independence in some South african isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Onderstepoort J Vet Res*, **60**:147-152.

BRAGG, R. R., COETZEE, L., VERSCHOOR J. A. (1993b). Monoclonal antibody characterization of South African field isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Onderstepoort J Vet Res*, **60**: 181-187.

BRAGG, R. R., GREYLING, J. M., VERSCHOOR, J. A. (1997) Isolation and identification of NAD-independent bacteria from chickens with symptoms of infectious coryza. *Avian Pathol*, **26**: 595-606.

BRAGG, R. R., JANSEN VAN RENSBURG, P., VAN HEERDEN, E., ALBERTYN, E. (2004) The testing and modification of a commercially available transport medium for the transportation of pure cultures of *Haemophilus paragallinarum* for serotyping. *Onderstepoort J Vet Res*, **71**: 93-98.

BYARUGABA, D. K., MINGA, U. M., GWAKISA, P. S., KATUNGUKA-RWAKISHAYA, E., BISGAARD, M., OLSEN, J. E. (2007a) Virulence characterization of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Uganda. *Avian Pathol*, **36** (1): 35-42.

BYARUGABA, D. K., MINGA, U. M., GWAKISA, P. S., KATUNGUKA-RWAKISHAYA, E., BISGAARD, M., OLSEN, J. E. (2007b) Investigations of the occurrence of *Avibacterium paragallinarum* infections in Uganda. *Avian Dis*, **51**: 534-539.

CHEN, X., CHEN, Q., ZHANG, P., FENG, W., BLACKALL, P. J. (1998a) Evaluation of a PCR test for the detection of *Haemophilus paragallinarum* in China. *Avian Pathol*, **27**: 296-300.

CHEN, X., MIFLIN, J. K., BLACKALL, P. J. (1996) Development and Application of DNA Probes and PCR Tests for *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis*, **40**: 398-407.

CHEN, X., SONG, C., GONG, Y., BLACKALL, P. J. (1998b) Further studies on the use of a polymerase chain reaction test for the diagnosis of infectious coryza. *Avian Pathol*, **27**: 618-624.

CHEN, X., ZHANG, P., BLACKALL, P. J., FENG, W. (1993) Characterization of *Haemophilus paragallinarum* Isolates from China. *Avian Dis*, **37**: 574-576.

CORNEY, B. G., DIALLO, I. S., WRIGHT, L., HEWITSON, G., DE JONG, A., TOLOSA, X., BURREL, P., DUFFY, P., BOYLE, D. B., BLACKALL, P. J. (2008) Rapid and sensitive detection of *Avibacterium paragallinarum* in the presence of other bacteria using a 5' Taq nuclease assay: a new tool for diagnosing infectious coryza. *Avian Pathol*, **37**(6): 599-604.

DROUL, R., BICKFORD, A. A., CHARLTON, B. R., COOPER, G. L., CHANNING, S. E. (1990) Infectious coryza in meat chickens in the San Joaquin Valley of California. *Avian Dis*, **34**: 1009-1016.

EAVES L. E., ROGERS, D. G., BLACKALL, P. J. (1989) Comparison of Hemagglutinin and Agglutinin Schemes for the Serological Classification of *Haemophilus paragallinarum* and Proposal of a New Hemagglutinin Serovar. *J Clin Microbiol*, **27** (7): 1510- 1513.

FINDIK, A. (2000). Tavuklarda İnfeksiyöz Koriza'nın serolojik teşhisinde aglutinasyon, hemaglutinasyon inhibisyon ve indirekt hemaglutinasyon testlerinin kullanılması ve karşılaştırılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

- FERNANDEZ, R. P., GARCIA-DELGADO, G. A., OCHOA, P., SORIANO, V. E. (2000) Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico. *Avian Pathol*, **29**: 473-476.
- GARCIA, A. J., ANGULO, E., BLACKALL, P. J., ORTIZ, A. M. (2004) The presence of Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Independent *Haemophilus paragallinarum* in Mexico. *Avian Dis*, **48**: 425-429.
- HINZ, K. H. (2001) *Haemophilus paragallinarum* - Fowl Coryza. In *Poultry Diseases*, 5th ed. Ed.: Jordan, F., Pattison, M., Alexander, D., Faragher, T., p.: 146-150.
- HINZ, K. H., KUNJARA C. (1977) *Haemophilus avium*, a new species from chickens. *Int J Syst Bacteriol*, **27** (4): 324-329.
- HORNER, R. F., BISHOP, G. C., HAW, C. (1992) An upper respiratory disease of commercial chickens resembling Infectious Coryza, but caused by a V-factor independent bacterium. *Avian Pathol*, **21**: 421-427.
- HORNER, R. F., BISHOP, G. C., JARVIS, C. J., COETZER, H.T. (1995) NAD (V-factor)-independent and typical *Haemophilus paragallinarum* infection in commercial chickens: a five year field study. *Avian Pathol*, **24**: 453-463.
- HUBERMAN, Y. D., BUENO, D. J., TERZOLA, H. R. (2005) Evaluation of the protection conferred by a disinfectant against clinical disease caused by *Avibacterium paragallinarum* serovars A, B and C from Argentina. *Avian Dis*, **49**: 588-591.
- HSU, Y., SHIEH, H. K., CHEN, W., SUN, T., SHIANG, J. (2007) Antimicrobial susceptibility, plasmid profiles and haemocin activities of *Avibacterium paragallinarum* strains. *Vet Microbiol*, **124**: 209-218.
- IRITANI, Y., SIGUMORI, G., KATAGIRI, K. (1977) Serologic response to *Haemophilus gallinarum* in Artificially Infected and Vaccinated Chickens. *Avian Dis*, **21** (1): 1-8.
- JACOBS, A. A. C., CUENEN, W., STORM, P. K. (1992) Efficacy of a trivalent *Haemophilus paragallinarum* vaccine compared to bivalent vaccines. *Vet Microbiol*, **32**: 43-49.
- KUME, K., SAWATA, A., NAKAI, T. (1984) Clearance of the challenge organisms from the upper respiratory tract of chickens injected with an inactivated *Haemophilus paragallinarum* vaccine. *Jpn J Vet Sci*, **46**: 843-850.
- KUME, K., SAWATA, A., NAKAI, T., MATSUMOTO, M. (1983) Serological classification of a *Haemophilus paragallinarum* with a Hemagglutinin System. *J Clin Microbiol*, **17** (6): 958-964.
- LIN, J. A., SHYU, C., YAMAGUCHI, T., TAKAGI, M. (1996) Characterization and Pathogenicity of *Haemophilus paragallinarum* Serotype C in Local Chickens of Taiwan. *J Vet Med Sci*, **58** (10): 1007-1009.
- MENDOSA-ESPINOZA, A., KOGA, Y., ZAVALITA, A. I. (2008) Amplified 16S Ribosomal DNA Restriction Analysis for Identification of *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Dis*, **52**: 54-58.

MIAO, D., ZHANG, P., GONG, Y., YAMAGUCHI, T., IRITANI, Y., BLACKALL, P. J. (2000) The development and application of a blocking ELISA kit for the diagnosis of infectious coryza. *Avian Pathol*, **29**: 219-225.

MIFLIN, J. K., CHEN, X., BLACKALL, P. J. (1997) Molecular characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from China by ribotyping. *Avian Pathol*, **26**: 119-127.

MIFLIN, J. K., CHEN, X., BRAGG, R. R., WELGEMOED, J. M., GREYLING, J. M., HORNER, R. F., BLACKALL, P. J. (1999) Confirmation that PCR can be used to identify NAD-dependent and NAD-independent *Haemophilus paragallinarum* isolates. *Onderstepoort J Vet Res*, **66**: 55-57.

MIFLIN, J. K., HORNER R. F., BLACKALL, P. J., CHEN, X., BISHOP, G. C., MORROW, C. J., YAMAGUCHI, T., IRITANI, Y. (1995) Phenotypic and Molecular Characterization of V-factor (NAD)-dependent *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis*, **39**: 304-308.

MUTTERS, R., PIECHULLA, H. K., HINZ, K., MANNHEIM, W. (1985) *Pasteurella avium* (Hinz ve Kunjara, 1977) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **3**: 225-229.

MOUHAIID, M., BISGAARD, M., MORLEY, A. J., MUTTERS, R., MANNHEIM, W. (1992) Occurance of V-factor (NAD) independent strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Vet Microbiol*, **31**: 363-368.

OK, Ü. (1996). Enfeksiyöz Koriza şüpheli tavuklardan *Haemophilus paragallinarum*'un izolasyonu, serotiplendirilmesi ve seroepizootiyolojisi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

PAGE, L. A. (1962) *Haemophilus* infections in chickens I. Characteristics of 12 *Haemophilus* Isolates Recovered from Diseased Chickens. *Am J Vet Res*, 85-95.

POERNOMO, S., SUTURMA, RAFIEE, M., BLACKALL, P. J. (2000) Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Indonesia. *Aust Vet J*, **78** (11): 759-762.

REID, G. G., BLACKALL, P. J. (1984) Pathogenicity of Australian Isolates of *Haemophilus paragallinarum* and *Haemophilus avium* in chickens. *Vet Mic*, **9**: 77-82.

SANDOVAL, V. E., TERZOLO, H. R., BLACKALL, P. J. (1994) Complicated infectious coryza cases in Argentina. *Avian Dis*, **38**: 672-678.

SAWATA, A., KUME, K. (1983) Relationships between virulence and morphological or serological properties of variants dissociated from serotype 1 *Haemophilus paragallinarum* strains. *J Clin Microbiol*, **18**: 49-55.

SAWATA, A., KUME, K., NAKASA, Y. (1978) *Haemophilus* infections in chickens 2. types of *Haemophilus paragallinarum* isolates from chickens with infectious coryza, in relation to *Haemophilus gallinarum* strain No: 221. *Jpn J Vet Sci*, **40** (645-652).

SAWATA, A., KUME, K., NAKASE, Y. (1979) Antigenic Structure and Relationship Between Serotypes 1 and 2 of *Haemophilus paragallinarum*. *Am J Vet Res*, **40** (10): 1450-1453.

SAWATA, A., NAKAI, T., KUME, K., YOSHIKAWA, H., YOSHIKAWA, T. (1985a) Lesions induced in the respiratory tract of chickens by encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*. *Am J Vet Res*, **46** (5): 1185-1190.

SAWATA, A., NAKAI, T., KUME, K., YOSHIKAWA, H., YOSHIKAWA, T. (1985b) Intranasal inoculation of chickens with encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*: Electron microscopic evaluation of the nasal mucosa. *Am J Vet Res*, **46** (11): 2346-2353.

SORIANO, V. E., TERZOLO, H. R. (2004) *Haemophilus paragallinarum*: etiology of infectious coryza. *Vet Mex*, **35** (3): 245-260.

SORIANO, V. E., LONGINOS, G. M., FERNANDEZ, R. P., VELASQUEZ, Q. E., CIPRIAN, C. A., SALAZAR-GARCIA, F., BLACKALL, P. J. (2004a) Virulence of the Nine Serovar Reference Strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis*, **48**: 886-889.

SORIANO, V. E., TELLEZ, G., HARGIS, B. M., NEWBERRY, L., SALGADO-MIRANDA, C., VASQUEZ, J. C. (2004b) Typing of *Haemophilus paragallinarum* Strains by Using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Based Polymerase chain Reaction. *Avian Dis*, **48**: 890-895.

SUN, H., MIAO, D., ZHANG, P., GONG, Y., BLACKALL, P. J. (2007) A comparison of a blocking ELISA and a haemagglutinin inhibition assay for the detection of antibodies to *Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum* in sera from artificially infected chickens. *Biologicals*, **35**: 317-320.

TAKAGI, M., HIRAYAMA, N., MAKIE, H., OHTA, S. (1991a) Production, characterization and protective effect of monoclonal antibodies to *Haemophilus paragallinarum* serotype A. *Vet Microbiol*, **27**: 327-337.

TAKAGI, M., TAKAHASHI, T., HIRAYAMA, N., ISTIANANINGSI, M. S., ZARKASIE, K., SUMADI, O. M., OHTA, S. (1991b) Survey of Infectious Coryza of Chickens in Indonesia. *J Vet Med Sci*, **53** (4): 637-642.

TAOLE, M., ALBERTYNE, J., HEERDEN, E. V., BRAGG, R. R. (2002) Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 3: experimentally produced NAD-independent isolate. *Onderstepoort J Vet Res*, **69**: 171-175.

TERRY, T. D., ZALUCKI, Y. M., WALSH, S. L., BLACKALL, P. J., JENNINGS, M. P. (2003) Genetic analysis of a plasmid encoding haemocin production in *Haemophilus paragallinarum*. *Microbiology*, **149**: 3177-3184.

TERZOLO, H. R., PAOLICCHI, A., SANDOVAL, V. E., BLACKALL, P. J., YAMAGUCHI, T., IRITANI, Y. (1993) Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Argentina. *Avian Dis*, **37**: 310-314.

VERSCHOOR, J. A., COETZEE, L., VISSER, L. (1989). Monoclonal Antibody Characterization of Two Field Strains of *Haemophilus paragallinarum* Isolated from Vaccinated Layer Hens. *Avian Dis*, **33**: 219-225.

VARGAS, E. S., TERZOLO, H. R. (2004a) *Haemophilus paragallinarum*: Etiology of Infectious coryza. *Vet Mex*, **35** (3): 245-259.

VARGAS, E. S., TERZOLO, H. R. (2004b) Epizootiology, prevention and control of infectious coryza. *Vet Mex*, **35** (3): 261-280.

YAMAGUCHI, T., IRITANI, Y., HAYASHI, Y. (1989) Hemagglutinating Activity and Immunological Properties of *Haemophilus paragallinarum* Field Isolates in Japan. *Avian Dis*, **33**: 511-515.

YAMAGUCHI, T., BLACKALL, P. J., IRITANI, Y., HAYASHI, Y. (1991) Immunogenicity of *Haemophilus paragallinarum* Serovar B Strains. *Avian Dis*, **35**: 965-968.

YAMAGUCHI, T., KOBOYASHI, M., MASAKI, S., IRITANI, Y. (1993) Isolation and Characterization of a *Haemophilus paragallinarum* Mutant that lacks a Hemagglutinating Antigen. *Avian Dis*, **37**: 970-976.

YAMAGUCHI, T., TAKIGAMI, S., IRITANI, Y., HAYASHI, Y. (1990a) Characterization and Use of Monoclonal Antibodies to Identify *Haemophilus paragallinarum* Serovars. *Avian Dis*, **34**: 52-57.

YAMAGUCHI, T., TAKIGAMI, S., IRITANI, Y., HAYASHI, Y. (1990b) Characterization of two New Monoclonal Antibodies Against *Haemophilus paragallinarum* Serovar C Hemagglutinating Antigen. *Avian Dis*, **34**: 922-927.

YARDIMCI, H. (2002). İnfeksiyöz Koriza. In: *Kanatlı Hayvan Hastalıkları*. 1. Baskı. Ed.: İzgür, M., Akan, M. Medisan Yayınevi. Ankara. s.: 55-60.

ZAIN, Z. M., IRITANI, Y. (1992) Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* Isolated in Malaysia. *J Vet Med Sci*, **54** (2): 363-365.

ZHANG, P., BLACKALL, P. J., YAMAGUCHI, T., IRITANI, Y. (1999) A Monoclonal Antibody-blocking Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of Serovar-specific Antibodies to *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis*, **43**: 75-82.

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı : Sibel
Soyadı : Güngördü
Doğum yeri ve tarihi : Diyarbakır, 14/11/1978
Uyruğu : T.C.
Medeni Durumu : Bekar
İletişim adresi ve telefonu : 590. sok. Kavaklı apt. 11/10 Çankaya/Ankara
0 505 703 78 72

II-Eğitimi

1997 – 2003 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
1994 – 1996 Gazi Anadolu Lisesi
1985 – 1989 Ahmet Vefik Paşa İlköğretim Okulu
1984 – 1985 Çankaya İlkokulu

Yabancı Dili: İngilizce

III-Ünvanları

Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyim

2007 tarihinden itibaren Bolu Tarım İl Müdürlüğü – Veteriner Hekim

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları ve Posterleri

1. ÇİFTÇİ, A., FINDIK, A., İÇA, T., BAŞ, B., ONUK, E. E., **GUNGORDU, S.**,
Tauklarda Artiritis vakalarından izole edilen Enterococcus faecalis suşlarında
Slime faktör üretimi ve Antibiyotik Dirençliliği
J Vet Med Sci, 2009 (yayın aşamasında)
2. SAREYYUPOGLU, B., DİKER, K.S., **GUNGORDU, S.**, CANTEKİN, Z.,
JAHED, R. (2008) Development of multiplex-PCR techniques for
detection of abortive bacterial infections of sheep. World Buiatrics Congress,
July 6-11., Budapest, Hungary, oral presentation no. 183.
3. SAREYYUPOGLU, B., DİKER, K.S., **GUNGORDU, S.**, CANTEKİN, Z.,
JAHED, R., ILHAN, Z. (2008). Detection of abortifacient bacteria in fetal
abomasum contents by polymerase chain reaction. XXV. World Buiatrics
Congress, Budapest, Hungary, poster no. 73.

VII-Bilimsel Etkinlikleri

Seminerleri:

1. Antibiyotiklere alternatif tedavi yöntemlerinin araştırılması (2005)
2. Kedilerde Haemobartonella infeksiyonları (2005)

Yer Aldığı Projeler:

1. Koyunlarda abortif bakteriyel infeksiyonların teşhisinde multipleks-PCR
tekniklerinin geliştirilmesi

Katıldığı Seminer ve Kongreler

1. VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı). 26-28
EYLÜL 2006 SİDE-ANTALYA/TÜRKİYE.
2. XIV. Dünya Veteriner Tavukçuluk Kongresi (Uluslararası katılımlı). 25-26
Ağustos 2005. İstanbul.