

TAVUKLARDAN HAREKETLİ AEROMONASLARIN İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONLARI İLE FAJ DUYARLILIKLARI TOKSİJENİTE VE PATOJENİTE TESTLERİ*

Belgin Erdem**

Isolation and identification of motile aeromonas strains from chickens and their pathogenicity, toxigenicity and phage sensitivity.

Summary: In this study, 205 internal organs (intestine, liver, spleen, gall-bladder) and 178 only intestine of chickens from slaughterhouses in Ankara and its counties and the chickens brought to Microbiology Department for diagnosis were used to isolate the motile aeromonas strains.

Seventy (30.14%) motile aeromonas from 205 chickens internal organs were isolated. Of these 53 *A. hydrophila*, 14 *A. sobria* and 3 *A. caviae* were identified whereas 45 (25.8%) motile aeromonas were isolated from 178 intestines and identified as *A. hydrophila* 34 (19.10%), *A. sobria* 8 (4.5%) and *A. caviae* 3 (1.68%).

Isolated motile aeromonas were characterised by using standard biochemical tests. Besides these, slide agglutination, coagglutination, phage sensitivity and toxigenicity tests for chicken embryos and pathogenicity test for chickens (two day old) were also included into identification procedure. Thirty-five of 115 strains gave positive reactions at both agglutination and coagglutination tests.

Six and 5 strains from internal organs gave positive reaction with Aeh1 and Aeh2 phages, respectively, whereas 9 and 5 strains from intestine origin were positive with Aeh1 and Ae2 phage, respectively.

In toxigenicity test, the culture filtrate of the 7B isolate was used to detect toxic effect in 9 days old embryonated eggs. In 24 hours incubation, all embryos were died of severe hemorrhagic lesions.

In pathogenicity test, the same isolate 7B was used in 2 days old chickens. Microorganism in a concentration of 1×10^9 cells/ml, 5×10^8 cells/ml, and 2.5×10^8 cells/ml were injected subcutaneously into chickens in three groups, respectively. According microorganism counts 5, 2 and 1 chickens were died in groups, in 30 hours, respectively.

Key Words: Motile aeromonas, chicken, bacteriophages, toxigenicity, pathogenicity, agglutination, coagglutination.

Özet: Bu çalışmada, Ankara ili ve civarındaki mezbahar ile A.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na muayene için getirilen 205 tavuğun iç organları (barsak, karaciğer, dalak, safra kesesi) ve 178 tavuğun da sadece barsakları hareketli aeromonas türleri yönünden incelendi.

İç organları alınan 205 tavuktan 70 (%34.14) hareketli *Aeromonas sp.* izole edildi. Bunların da 53'ü *A. hydrophila*, 14'ü *A. sobria* ve 3'ü de *A. caviae*

* Bu çalışma, A.Ü. Araştırma Fonu Desteği ile (Proje No: 94 30 00 22) yapılmış olup aynı adlı doktora tezinden özetlenmiştir.
** Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

olarak tanımlanmıştır. Barsaklardan 58, karaciğer ve dalak süspansiyonundan 9 ve safradan da 3 *Aeromonas sp.* ayrıldı. Sadece barsakları alınan 178 tavukta da 45 (%25.28) hareketli *Aeromonas sp.* saptandı. Bunların da 34'ü (%19.10) *A. hydrophila*, 8'i (%4.5) *A. sobria* ve 3'ü de (%12.68) *A. caviae* olarak izole ve tanımlanmıştır.

İzole edilen hareketli aeromonas suşlarının biyokimyasal testler ile tanımlanmaları yapıldı. Ayrıca lam aglutinasyon, koaglutinasyon, faj duyarlılık testleri ile embriyolarda toksijenite ve civcivlerde patojenite testleri de denemeye dahil edildi.

Lam aglutinasyon ve koaglutinasyon testlerine tabi tutulan 115 suşun 35'i (17+18), hem lam aglutinasyon hem de koaglutinasyon testlerinde pozitif sonuç verdiler.

İç organlardan izole edilen suşların 11'i Aeh 1 faji ile ve bunlardan 5'i de Aeh2 faji ile pozitif reaksiyon verdi. Sadece barsaklardan izole edilen suşların da 9'u Aeh 1 faji ve bunlardan 5'i Aeh2 faji ile pozitif bulundu.

Denemede, *A. hydrophila* olarak saptanan izolatlardan biri(7B) ile 9 günlük embriyolarda yapılan toksijenite testinde, embriyolarda 24 saat içinde şiddetli hemorajilerle birlikte ölümler görüldü. Aynı izolat 2 günlük civcivlere 1×10^9 , 5×10^8 ve 2.5×10^8 mikroorganizma/0.5 ml miktarında deri altı verildiğinde mikroorganizma sayısına göre sıra ile 5, 2 ve 1 civcivde (%10-50) 30 saat içinde ölümler görüldü.

Anahtar Kelimeler: Hareketli aeromonaslar, tavuk, bakteriyofaj, toksijenite, patojenite, aglutinasyon, koaglutinasyon.

Giriş

Aeromonas'lar insan ve hayvanların sindirim sistemi florasında bulunan oportunist patojenik mikroorganizmalar arasında yer alırlar. Son yıllarda, insanlarda rastlanan akut barsak infeksiyonlarından izole edilmesi bu mikroorganizmaların önemini artırmış ve araştırmacıları bu konu üzerinde çalışmaya sevk etmiştir (21).

Hareketli aeromonas türleri insan ve hayvanlarda (memeli, kanatlı ve soğukkanlılarda) çeşitli yara infeksiyonları yanı sıra menenjit, septisemi, endokardit, pnemoni ve osteomyelit gibi hastalıklara da neden olduklarından patojenik olarak kabul edilmektedir (9, 18, 29).

Aeromonas türlerinin hem klorlanmış hem de klorlanmamış sulara bulunması ve aynı zamanda, buzdolabı ısısında üreyebilmeleri bunların insan sağlığı yönünden önemli bir hastalık ajanı olabileceklerini ortaya koymaktadır (14, 17, 19) Hareketli aeromonas'ların patojenik özelliklerini, sentezledikleri enterotoksinler (sitotik ve sitotoksik) ve çeşitli virulens faktörleri (fimbri, hemaglutininler, hemolizinler, toksik metabolitler ve çeşitli enzimler) oluşturmaktadır (3, 8, 13).

Kanatlıların sindirim sisteminin normal florasında hareketli aeromonas'lar bulunmakla beraber, bazen evcil ve yabani kanatlılarda ağırlık kaybı, hemorajik septisemi, ishal, enteritis,

konjunktivitis, mide ve barsakta ülserlere yol açtıkları bildirmektedir (11, 12, 15, 22, 24). Panigrahy ve ark. (22), klinik olarak iştahsızlık, durgunluk, tüylerin kabarması ve ishal görülen ergin kanaryaların organ ve barsaklarından; Shane ve ark. (25), sağlıklı yarıcık kuşların karaciğerlerinden saf beta hemolitik Gram negatif mikroorganizmalar izole etmişler ve bunları da *A. hydrophila* olarak tanımlamışlardır. Shane ve Gifford (24), yarıcık kuşların kalp, karaciğer, akciğer ve beyin segmentlerinden %14 oranında *A. hydrophila* izole etmişler ve bu izolatların 2-4 günlük civciv, hindi ve ördeklere değişik dozlarda subkutan, intramuskular, sarı kesesi ve intraserebral yolla verdiklerinde 24 saatte %80-100 oranında ölümlerin görüldüğünü bildirmişlerdir. Garcia ve ark. (10), evde beslenen 3 yaşındaki bir muhabbet kuşunda bilateral konjunktivitis, anoreksi, kaşeksi ve depresyonun ve Glünder (12, psittacine ve ispinoz kuşlarında *A. hydrophila*'ya bağlı pnemonilerin varlığını açıklamışlardır. Ocholi ve Kalejaiye (20), hemorajik septisemiden ölen kuşların (*Bucorvus abyssinicus*) akciğer, dalak, böbrek ve barsaklarından ayırdıkları *A. hydrophila*'nın, içorganlarda hemorajilere, mide ve barsaklarda ülserlere yol açtığını belirtmişlerdir. Akan (2), Ankara bölgesindeki 74 tavuğun dışkılarından 7 *A. hydrophila*, 5 *A. sobria* ve 1 *A. caviae* olmak üzere 13 hareketli aeromonas izole ettiğini açıklamıştır.

Türkiye'de bu konu üzerinde yapılan çalışmalar çok sınırlıdır. Balıkların, memeli hayvan-

ların ve kanatlıların dışkı ve karkaslarından etken izolasyonuna ilişkin araştırmalar yapılmış olmasına karşın, organlardan izolasyon ve identifikasyon çalışmaları bulunmamaktadır. Özellikle kanatlılardaki faj duyarlılık, toksijenite ve patojenite özellikleri de incelenmemiştir.

Yukarıda açıklanan boşlukları doldurmak üzere bu çalışmada, kanatlı barsaklarından ve diğer iç organlardan (karaciğer, dalak ve safra kesesi) hareketli aeromonas'ları (*A. hydrophila* ve diğerleri) izole ve identifiye etmek, etkenlerin identifikasyonunda çabuk lam aglutinasyon, koaglutinasyon, faj duyarlılık testlerini denemek, 9 günlük embriyolarda toksijenite ve 2 günlük civcivlerde patojenite özelliklerini araştırmak amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada, değişik zamanlarda (1994-1995, Ankara ili civarındaki kamu ve özel sektöre ait olan kanatlı mezbahalarından alınan ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na muayene için getirilen tavukların iç organları (barsak, karaciğer, dalak ve safra kesesi) materyal olarak kullanılmıştır.

Etken izolasyonu amacı ile değişik yaş ve ırklardaki 205 tavuğun barsak, karaciğer, dalak ve safralarından, 178 tavuğun da sadece barsaklarından materyal alınmış ve toplam olarak 383 tavuk materyali araştırmada kullanılmıştır. Karaciğer ve dalak birlikte süspanse edilerek, safra ve barsakların da ayrı olarak ekimleri yapılmıştır.

Besiyerleri

Çalışmada, ön zenginleştirme amacı ile ampisilinli alkali peptonlu su (AAPS), izolasyon amacı ile ampisilinli kanlı agar (AKA) ve ampisilinli dekstrin agar (ADA) kullanılmıştır. Bu besi yerlerinden başka trypticase soy agar (TSA), brain heart infusyon buyyon (BHB) ve nutrient buyyon'dan (NB) da yararlanılmıştır.

Standart suşlar

Denemede, Kanada Laval Üniversitesi, Tıp Fakültesi'nden temin edilen *A. hydrophila* Her1209 C-1 ve *A. hydrophila* Her1210 (ATCC7966) suşlarından antiserum hazırlanmış ve testlerde (kontrol suş olarak) yararlanılmıştır. Aeromonas fajları Kanada Laval Üniversitesi'nden, biri *A. hydrophila* Her1209 C-1 suşuna ait Aeh1 ve diğeri de *A. hydrophila* Her1210 (ATCC 7966) suşuna ait Aeh2 fajları temin edilmiş olup, bunlar izolatların teşhis ve faj duyarlılık testlerinde kullanılmıştır.

Tavşanlar

Hiperimmün serum elde etmek için herbiri

yaklaşık 2 kg ağırlığında 2 Yeni Zelanda tavşanı kullanılmıştır.

Civcivler

Hayvanlardan izole edilen ve *A. hydrophila* olarak karakterize edilen 7B suşunun patojenitesinin saptanmasından 60 adet 2 günlük civciv kullanılmıştır. Denemeye *A. hydrophila* Her1210 (ATCC 7966) suşu da dahil edilmiştir.

Embriyolar

İzole edilen bir *A. hydrophila* (7B) suşunun toksijenitesinin belirlenmesi için 9 günlük, embriyolu 30 adet beyaz yumurtadan yararlanılmıştır. Denemede *A. hydrophila* Her1210 (ATCC 7966) suşu da kullanılmıştır.

Cowan suşu

Koaglutinasyon testi için *S. aureus* (ATCC 12958) Cowan suşu kullanılmıştır.

Hiperimmün serum

A. hydrophila Her1210 (ATCC 7966) suşuna karşı tavşanlardan hazırlanan antiserum, izolatların serodiagnozisinde (çabuk aglutinasyon) ve koaglutinasyon testlerinde kullanılmıştır.

Fajların rutin test dilüsyonlarının (RTD) saptanması

A. hydrophila'ya ait Aeh1 ve Aeh2 fajları aktive edilerek, sıvı ortamda kendi konakçılarında üretilmişlerdir. Kültürler önce kuvvetli santrifüje edilmiş, üst sıvıları milipor filtreden geçirilmiş, filtratların kontaminasyon kontrolleri yapıldıktan sonra kendi konakçılarına karşı titreleri (RTD) tayin edilmiştir. Aeh1 fajı kendi konakçı suşu *A. hydrophila* Her1209 ie 1/64 (1xRTD) ve Aeh2 fajı da kendi konakçısı *A. hydrophila* Her1210 (ATCC 7966) ile 1/64 (1xRTD) dilüsyonlarında titre vermiş ve her iki fajdan da 32xRTD hazırlanarak denemelerde kullanılmıştır.

İzolasyon Çalışmaları

Barsak içeriği: Hareketli aeromonas'ların izolasyonu amacı ile değişik tavuk mezbahalarından toplanan barsaklar, aseptik koşullarda açılmış ve barsak mukozası kazınarak yaklaşık 1 g içerik alınmış ve 9 ml AAPS'ye ampisiline 20 mg/ml) konularak homojenize edilmiş ve 30 °C'de inkubasyondan sonra AKA'ya ekim yapılmıştır.

Karaciğer-dalak: Karaciğer ve dalağın üzerleri spatül ile yakıldıktan sonra bu iki organdan yaklaşık birer gram kadar alınarak AAPS ile iyice ezilmiş ve kendi halinde çöktük-

ten sonra üst kısımdan 1 ml alınarak 9 ml AAPS'ye ilave edilerek 30°C'de 24 saat inkube edildikten sonra AKA'ya ekim yapılmıştır.

İdentifikasyon Çalışmaları

AKA'da üreyen beta hemolitik ve non-hemolitik Gram negatif, hareketli ve kendine özgü bir kokuya sahip, gri renkli kolonilerden birer tanesi seçilerek 5 ml AAPS'de 6 saat üretilmiştir. Bu sürenin sonunda buradan bir öze dolusu alınarak ADA'ya ekilmiş ve 30 °C'de 24 saat inkubasyondan sonra üreyen parlak sarı kolonilerden birkaç tane alınarak saf kültürleri yapılmış ve sonra biyokimyasal özellikleri incelemek için identifiye edilmişlerdir.

Biyokimyasal testler: İzolatların identifikasyonunda oksidaz, glikoz, sukroz ve mannitol fermentasyonu, 37°C'de nutrient buyyon'da üreme, %6 NaCl'lü buyyon'da üreme, NaCl içermeyen buyyon'da üreme, O/F (Oksidasyon/Fermentasyon), 0/129'lu (2,4-diamino-6, 7-diisopropyl pteridine) (Sigma) buyyon'da üreme, indol, ornitin dekarboksilaz (ODC) testleri kullanılarak hareketli aeromonas'ların cins düzeyinde ayrımları yapılmıştır (6, 23).

Lam aglutinasyon testi: İzolatların teşhisi amacı ile kullanılan bu test, 0.05 ml 1/5 sulandırılmış pozitif serum ile, kanlı agarda üreyen aeromonas şüpheli 2-3 adet koloninin bir lam üzerinde karıştırılması ile yapılmıştır. Yavaşça hareket ettirilen lamda 2-3 dakika sonra kümeleşmenin görülmesi pozitif, homojen bulanıklık ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

Koaglutinasyon testi: Koaglutinasyon reagenti Sövenyi'nin (26) bildirdiği yöntemle hazırlanmıştır. Temiz bir lam üzerine bir damla koaglutinasyon reagenti ile bir damla da şüpheli A. hydrophila'nın 18 saatlik taze buyyon kültüründen ilave edilerek öze ile iyice karıştırılmış ve nemli ortamda, 30., 60. ve 120. dakikalarda kontrol edilmiştir.

Bu süreler içinde gözle görülebilir bir aglutinasyon kuvvetli pozitif, mikroskop altında bakılarak aglutinasyon orta derecede pozitif ve hiçbir aglutinasyon yoksa negatif olarak değerlendirilmiştir.

Faj duyarlılık testi: İzole edilen şüpheli aeromonas suşları, içerisinde 400 µg/ml CaCl₂ bulunan TSA'da yapılmıştır. Taze kültürden 0.1 ml miktarında ekim yapılmış ve steril bagetle yayıldıktan sonra 3-4 saat 30°C'de bekletilerek bakterilerin agara yapışması sağlanmıştır. Daha sonra Aeh1 ve Aeh2 fajlarının her ikisinden de 0.05 ml miktarında ayrı ayrı yerlere damlatılmış

ve sıvının kuruması beklendikten sonra inkube edilmiş ve lizis alanlarının görüldüğü suşlar faj duyarlılık yönünden pozitif olarak kabul edilmiştir. Lizis alanları görülmeyen suşlarda negatif olarak değerlendirilmiştir.

Denemede Aeh1 ve Aeh2 fajlarının her ikisinden de 32xRTD hazırlanarak kullanılmıştır.

Patojenite ve toksijenite testleri

Tüm izolatların patojenite testlerini yapmak mümkün olmadığından bunun yerine tüm karakterleri ile A. hydrophila olduğu saptanan ve barsaktan izole edilen 7B kodlu suş, Kanada'dan getirilen standart A. hydrophila Her 1210 (ATCC 7966) suşu ile birlikte hem embriyolarda toksijenite ve hem de civcivlerde infeksiyon testlerinde kullanılmıştır.

Patojenite testi: İzolatlardan tipik A. hydrophila karakteri gösteren 7B suşundan 0.5 ml'sinde 1x10⁹, 5x10⁸ ve 2.5x10⁸ mikroorganizma bulunan 3 ayrı süspansiyon hazırlanmıştır. Bunlardan 10 adet 2 günlük civcive deri altı olarak 0.5 ml verilmiştir. Ayrıca 0.5 ml buyyon verilen 10 adet civciv ve hiçbir şey verilmeyen 10 adet civciv de kontrol olarak kullanılmıştır. Civcivler 10 gün süre ile gözlemlenerek klinik belirtiler izlenmiş ve ölenlerin otopsi yapılarak makroskopik lezyonlar yönünden incelenmiş, iç organlarından izolasyon çalışmaları yapılmıştır.

Kontrol olarak da A. hydrophila Her 1210 (ATCC 7966) suşunun 1x10⁹ mikroorganizma/0.5 ml'lik konsantrasyonundan 10 civcive 0.5 ml deri altı verilmiştir.

Toksijenite testi: A. hydrophila olarak saptanan 7B suşunun filtratı 10 adet 9 günlük embriyolu yumurtaya 0.1 ml miktarında korioallantoik boşluğu şırınga edilmiştir. Bunun yanı sıra, 5 adet yumurtaya sadece AAPS'den 0.1 ml verilmiş, 5 taneye de hiçbir inokulasyon yapılmayarak kontrol olarak kullanılmıştır.

Kontrol suş olarak da A. hydrophila Her 1210 (ATCC 7966) suşunun ayrı ayrı tarzda filtratı hazırlanarak 10 adet 9 günlük embriyolu yumurtaya 0.1 ml miktarında korioallantoik boşluğa verilmiştir.

Embriyolar hergün sabah akşam kontrol edilmişler ve ölen embriyoların ölüm günleri saptanmıştır. Embriyolarda saptanan makroskopik değişimler kontrol embriyolarla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Bulgular

İzolasyon Sonuçları

Tüm organları alınarak incelenen 205 tavuktan 70 adet hareketli *Aeromonas* spp. (%34.14) izole ve tanımlanmıştır. En fazla izolasyon barsaktan 58 adet (%28.29) ve en az izolasyon safradan 3 adet (%1.46) yapılmıştır. Karaciğer ve dalak süspansiyonundan 9 adet (%4.39) *Aeromonas* spp. ayrılmıştır.

Sadece barsakları alınan 178 tavuktan 45 adet *Aeromonas* spp. (%25.28) izole edilmiştir. Sadece barsaktan izole edilen 45 hareketli aeromonas arasından, 34 *A. hydrophila* (%19.10), 8 *A. sobria* (%4.5) ve 3 *A. caviae* (%1.68) izole ve tanımlanmıştır.

Hareketli *Aeromonas* Türlerinin İdentifikasyon Sonuçları

İzole edilen bütün hareketli aeromonas suşları ADA'da 18-24 saatte 30 °C'de dekstrini fermente ederek parlak sarı renkte koloniler oluşturdu. AKA'da ise çoğu beta hemolitik, S-karakterinde, gri beyaz renkli, yuvarlak, düzgün kenarlı, hafif kabarık, kendine özgü balık kokusunda koloniler görüldü.

Lam aglutinasyon test sonuçları: Tüm iç organların (barsak, karaciğer, dalak, safra kesesi) alındığı 205 tavuktan izole edilen 70 izolatin 17'si (%24.28) aglutinasyon testinde pozitif bulunmuştur. Bunların da 15'i *A. hydrophila* ve 2'si de *A. sobria* olarak belirlenmiştir.

Sadece barsakları alınan 178 tavuktan izole edilen 45 izolatin 18'inde (%40) pozitif reaksiyon görülmüştür. Bu suşların 18'i de *A. hydrophila* olarak saptanmıştır.

Koaglutinasyon test sonuçları: Tüm iç organların (barsak, karaciğer, dalak, safra kesesi) alındığı 205 tavuktan izole edilen 70 izolatin 17'sinde (24.28) koaglutinasyon pozitif bulunmuş ve bunların 15'i *A. hydrophila* ve 2'si de *A. sobria* olarak belirlenmiştir.

Sadece barsakları alınan 178 tavuktan izole edilen 45 izolatin 18'inde (%40) koaglutinasyon pozitif olarak saptanmış ve bu suşların 18'i de *A. hydrophila* olarak tespit edilmiştir.

Standart fajların RTD sonuçları: *A. hydrophila* 129 ve 1210 suşlarına ait olan Aeh1 ve Aeh2 fajlarının RTD'si 1/64 (1xRTD) olarak saptanmış ve denemelere de her iki faj da 32XRTD olarak kullanılmıştır.

Faj duyarlılık test sonuçları: İç organlardan izole edilen 53 *A. hydrophila* suşunun 11'i Aeh2 fajı ile pozitif reaksiyon vermiştir. Faj duyarlılık testinde pozitif bulunan 11 suşun tümü *A. hydrophila* olarak belirlenmiştir.

A. sobria ve *A. caviae* olarak saptanarak faj duyarlılık testinde negatif bulunmuştur. Barsaklardan izole edilen 34 *A. hydrophila* suşunun 9'u Aeh1 ve 5'i de Aeh2 ile pozitif reaksiyon vermiş ve suşların hepsi *A. hydrophila* olarak tanımlanmıştır.

Patojenite test sonuçları: *A. hydrophila* olduğu saptanana bir izolattan hazırlanan 3 süspansiyonun (1×10^9 , 5×10^8 ve 2.5×10^8 mikroorganizma/0.5 ml) her birinden 10'ar adet 2 günlük civcive subkutan olarak 0.5 ml verilmiş ve enjeksiyondan 18 saat sonra tüylerde kabarma, iştahsızlık ve düşüklük görülmüştür. İlk grupta enjeksiyon yapıldıktan 30 saat sonra 5 civcivde, ikinci grupta 2 civcivde ve üçüncü grupta da 1 civcivde ölüm görülmüştür. Ölen civcivlerin yapılan otopsilerinde karın ve sırt derisi altında yaygın hemorajiler gözlenmiştir. Organlardan yapılan ekimler sonucunda enjekte edilen izolat (7B) tekrar izole edilmiştir. Kontrol suş olarak standart, *A. hydrophila* Her 1210 (ATCC 7966) suşunun tek enjeksiyonu (1×10^9 mikroorganizma/0.5 ml) kullanılmıştır. Şırınga edilen 10 civcivde 6'sında 30 saat içinde ölüm saptanmış ve ölenlerin otopsilerinde benzer tablo gözlenmiştir.

Toksijenite test sonuçları: Patojenite testinde kullanılan 7B izolatu ile standart *A. hydrophila* Her 1210 (ATCC 7966) suşlarının taze kültürleri (24 saatlik) ayrı ayrı santrifuj edilerek, üst sıvı milipor filtreden geçirilmiş ve sterilite kontrolü yapıldıktan sonra filtratın her birinden 9 günlük embriyolu yumurtaların korioallantoik boşluğuna, 0.1 ml miktarda inokule edilmiştir. Denemenin sonunda 7B izolatu ve *A. hydrophila* 1210 suşuna ait olan üst sıvıların verildiği tüm embriyoların 24 saat içinde öldüğü ve ölen embriyoların korioallantoik membranında orta derecede kalınlaşma, embriyolarda şiddetli hemorajiler görülmüştür. Embriyoların iç organlarından ve sıvılarından kanlı agar'a yapılan ekimlerde üreme görülmemiştir.

Tartışma ve Sonuç

Hareketli aeromonas'lar insan, memeli ve kanatlıların özellikle sindirim sisteminde değişik klinik belirtilerle ortaya çıkan infeksiyonlara yol açarlar. Kanatlılardaki çalışmalar, daha ziyade gıda hijyeni ağırlıklı olup, yaptığı infeksiyonların karakterine yönelik değildir.

Çok değişik gıdalarda (kırmızı-beyaz et, sebze, çig süt ve dondurma), klorlanmamış ve klorlanmış içme sularında bulunmasından dolayı aeromonas'lar insanlarda bir çok hastalıktan primer patojen olarak izole edilmiş ve bu konu üzerinde yapılan araştırmalar daha da yoğunlaştırılmıştır (4, 5).

Kanatlılardan özellikle, hastalık olgularından *A. hydrophila* izole edildiğine dair çalışmalar az sayıda olup, daha çok yabani ve süs kuşlarına ait literatürler bulunmaktadır. Hareketli aeromonas'lar kanatlıların sindirim sisteminde de herhangi bir klinik belirti oluşturmadan bulunabileceği gibi, bazen de primer patojen olarak, ekonomik kayıplara yol açan infeksiyonlara da neden olmaktadır. Hareketli aeromonas'ların sebep olduğu ölüm olgularından yapılan otopsilerde organlarda hemorajiler, akciğer ve karaciğerde beyaz odaklar, mide ve barsakta ülserler ve peteşiyal kanamalara rastlanmıştır. Aguirre ve ark. (1), enterit tablosu gösteren yetişkin ördeklerden aldıkları kloakal svabtan ve Panigrahy ve ark. (22), hemorajik enteritis ve diare ile birlikte ölümlerin görüldüğü ölü kanaryaların karaciğeri ve kalplerinden *A. hydrophila* izole ettiklerini açıklamışlardır. Stern ve ark. (27), sığır, domuz ve koyunlardaki aeromonas insidensinin hindilere göre az olmasının nedeni olarak büyükbaş hayvanların kesildiği mezbahaların kanatlı mezbahalarına göre daha kontrollü olduğunu ve buna bağlı olarak da kırmızı ette mikroorganizmaların daha az oranda olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Türkiye'de tavuklardan hareketli aeromonas izolasyonuna yönelik bir çalışmada da barsaklar ve karkaslar kullanılmış ve buna karşın diğer iç organlardan (karaciğer, dalak ve safra kesesi) izolasyon çalışması yapılmamıştır (2).

Bu çalışmada tüm iç organları alınan (karaciğer, dalak, safra kesesi ve barsak) 205 tavuktan 53'ü *A. hydrophila*, 14'ü *A. sobria* ve 3'ü de *A. caviae* olmak üzere toplam 70 (%34.14) hareketli aeromonas ayrılmıştır. Sadece barsakları alınan 178 tavuktan 34'ü *A. hydrophila*, 8'i *A. sobria* ve 3'ü de *A. caviae* olmak üzere toplam 45 (%25.28) hareketli aeromonas izole ve identifiye edilmiştir. Barsaklardan ayrılan aeromonas'lar diğer iç organlara göre daha fazla sayıda bulunmuştur. Bu araştırmada barsakta bulunan hareketli aeromonas'ların az da olsa iç organlara geçebileceği ve özellikle, tamamıyla kapalı olan ve dışardan kontaminasyon riski bulunmayan safra kesesine de ulaşabileceği belirlenmiştir.

Bu çalışmada izole edilen toplam 115 suşun patojenite ve toksijenite testlerini yapmak mümkün olamadığından bütün özellikleri ile *A.*

hydrophila olduğu saptanan ve barsaktan izole edilen 7 B suşu kullanılarak 9 günlük embriyolarda toksijenite ve 2 günlük civcivlerde infeksiyon testleri yapılmıştır. Embriyoların korioallantoik boşluğuna 0.1 ml miktarında verilen 24 saatlik steril kültür filtratı 24 saat içinde embriyoların hepsini öldürmüş ve açılan yumurtularda, embriyolarda şiddetli hemorajiler gözlenmiştir. Aynı durum *A. hydrophila* (ATCC 7966) suşunda da görülmüştür. Bu durum *A. hydrophila*'nın oluşturduğu toksik substansların embriyolar için letal etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

İki günlük civcivlerde yapılan infeksiyon denemesinde de ölümler 30 saat içinde meydana gelmiş, deri altında ve sırtta yaygın hemorajiler ve karaciğerde ileri derecede solgunluk gözlenmiştir. Bu deneme, Shane ve Gifford'un (24) yaptığı benzer çalışma ile paralellik göstermektedir. Bu araştırmacılar, civciv, ördek ve hindilere izole ettikleri *A. hydrophila*'yı subkutan, intraserebral, intramuskular ve yumurta sarısına 1.5×10^9 mikroorganizma/0.1 ml verdiklerinde 24 saatte %80-100 oranında ölümlerin olduğunu saptamışlardır.

Bu araştırmada 2 günlük civcivlere 1×10^9 , 5×10^8 ve 2.5×10^8 mikroorganizma/0.5 ml olacak şekilde hazırlanan süspansiyonlardan 0.5 ml deri altına verildiğinde sıra ile gruplarda %50, %20 ve %10 oranlarında ölümlere rastlanılmıştır. Kalp, karaciğer, safra, dalak ve barsaktan yapılan ekimlerde 7B suşu tekrar izole edilmiştir. Benzer tablo standart *A. hydrophila* (Her 1210 ATCC 7966) ile de elde edilmiştir. Bu çalışmadaki civcivlerde görülen ölüm oranlarının Shane ve Gifford'un (24) yaptıkları denemeden farklı olmasının nedenleri arasında, izolatın virulens özelliği ve civcivlere verilmiş yollarının değişik olmasından kaynaklanacağı kanısına varılmıştır.

Araştırmacılar özellikle, O-antijeni ve H-antijenleri ile yaptıkları gruplandırma çalışmalarında aglutinasyon testi ile aeromonas'ları serogruplara ayırmışlardır. Ancak, bazı suşlar arasında da (*A. hydrophila* ve *A. sobria*) kros reaksiyonların bulunduğunu belirtmişlerdir (16, 23, 28).

A. hydrophila'ya ait olan Aeh1 ve Aeh2 fajlarından özellikle Aeh2'nin konakçı spektrumunun çok dar olması nedeni ile gerek izolatların teşhisinde ve gerekse faj duyarlılıklarına göre sınıflamadaki etkinlikleri beklenenden çok daha az olmuştur. Chow ve Rouf'un (7) bildirdikleri bu fajlar (Aeh1 ve Aeh2) arasındaki plak formasyonu farkları bu çalışmada gözlenmiştir.

Sonuç olarak, kanatlıların normal barsak florasında bulunan aeromonas'lar, kesim ve diğer işlemler sırasında tavuk etine bulaştığından insanlar için potansiyel bir risk oluşturmaktadır. Bu nedenle kanatlı mezbahalarında hijyenik koşullara çok dikkat edilmesi gerekmektedir.

Kanatlıların normal barsak florasında bulunan aeromonasların karaciğer, dalak ve safra-dan izole edilmesi ve ayrıca bazılarının kanlarında antikora rastlanması bu etkenin özel koşullar altında vücut içerisine girerek yayılabileceğini ve organlara yerleşebileceğini göstermektedir.

İdentifikasyonda ise çeşitli biyokimyasal testler başta olmak üzere çabuk aglutinasyon ve koaglutinasyon testlerinden de yararlanılabileceği ortaya konulmuştur. Ancak bu son iki testin sonuçlarının aynı çıkması nedeni ile çabuk aglutinasyon testinin, daha pratik olması ve sonuçlarının daha iyi değerlendirilmesi açısından pratikte koaglutinasyona tercih edilebileceği anlaşılmıştır.

Bu denemede kullanılan Aeh1 ve Aeh2 fajlarının konakçı duyarlılığının çok sınırlı olmasından dolayı teşhiste yeterli olamayacağı görüşüne varılmıştır.

Bu çalışma ile aynı zamanda hareketli aeromonas'ların civcivler için patojenik (belli dozlarda) ve kültür filtratlarının da embriyolar için toksik olduğu (ekzotoksin) ortaya konulmuştur.

Kaynaklar

1. Aguirre, A.A., Quan, T.J., Cook, R.S., McLean, R.G. (1992). Cloacal flora isolation from wild black-bellied whistling ducks (*Denrocygna autumnalis*) in Laguna La Nacha, Mexico. Avian Dis., 36: 459-462.
2. Akan, M. (1993). Hayvanlardan ve çevresel kaynaklardan izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinin biyokimyasal, toksijenik, enzimatik ve yüzey özellikleri. AÜ Sağlık Bilimleri Enst. Doktora Tezi, Ankara.
3. Aoki, T., Hirano, I. (1991). Cloning and characterization of the hemolysin determinants from *Aeromonas hydrophila*. J. Fish Dis. 14: 303-312.
4. Aytaç, S.A., Özbaş, A. (1982). *Aeromonas*'lar: Gıda kaynaklı yeni patojenler. Türk Hij. Biyol. Derg., 49: 169-180.
5. Barnhart, H.M., Parcorbo O.C., Dreesen, D.W., Shotts, E.B. (1989). Recovery of *Aeromonas hydrophila* from carcasses and processing water in broiler processing operation. J Food Protect, 52: 6466-649.
6. Borrego, J.J., Morinigo, M.A., Martinez-Manzanarez, E., Bosca, M., Castro, D., Barja, J.L., Toranzo, A.E. (1991). Plasmid associated virulence properties of environmental isolates of *Aeromonas hydrophila*. J. Med. Microbiol. 35: 264-269.
7. Chow, M.S., Rouf, M.A. (1993). Isolation and partial characterization of two *Aeromonas hydrophila* bacteriophages. Appl. Environ. Microbiol, 45: 1670-1767.
8. Chrichton, P.B., Walter, J.W. (1985). Methods for the detection of haemagglutinins in *Aeromonas*. J Med Microbiol 19: 273-277.
9. Freij, B.J. (1987). Extraintestinal *Aeromonas* and *Plesiomonas* infections of humans. Experienta, 43: 359-360.
10. Garcia, M.E., Domench, A., Dominguez, L. Ramiro, F., Fernandez-Garayzabal, J. (1992). *Aeromonas hydrophila* conjunctivitis in a pet parrot (*Amazilia versicolor*). Avian Dis., 36: 1110-1111.
11. Glünder, G. (1988). Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in birds. J Vet. Med. B, 35: 331-337.
12. Glünder, G. (1989). Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in finches and psittacines. Kleintierpraxis, 34, 33-37.
13. Gray, S.J., Stickler, D.J., Bryant, T.N. (1990). The incidence of virulence factors in mesophilic *Aeromonas* species isolated from farm animals and their environment. Epidemiol. Infect., 105, 277-294.
14. Havelaar, A.H., During, M., Versteegh, J.F.M. (1987). Ampicillin dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. J Appl. Bacteriol, 62: 279-287.
15. Jindal, N., Garg, S.R., Kumar, A. (1993). Comparison of *Aeromonas* spp. isolated from human, livestock and poultry faeces. Isr. J Vet. Med. 48, 80-83.
16. Leblanc, D., Mittal, K.R., Olivier, G., Laliler, R. (1981). Serogruping of motile *Aeromonas* species isolated from healthy and moribund fish. Appl. Environ. Microbiol, 42: 56-60.
17. Majeed, K.N., Egan, A.F., Mac Rae, I.C. (1990). Production of exotoxins by *Aeromonas* spp. at 5°C. J Appl. Bacteriol, 69: 332,337.
18. Megruad, F. (1986). Incidence and virulence of *Aeromonas* species in feces of children with diarrhea. Eur. J. Clin. Microbiol, 5: 311-316.
19. Monfort, P., Balex, B. (1990). Dynamics of *A. hydrophila*, *A. sobria* and *A. caviae* in a sewage treatment pond. Appl. Environ. Microbiol, 56: 1999-2006.
20. Ocholi, R.A., Kalejaiye, O. (1990). *Aeromonas hydrophila* as cause of hemorrhagic septicemia in a ground-hornbill (*Bucovius abyssinicus*). Avian Dis., 34, 495-496.
21. Palumbo, S.A., Steigerwalt, A.G., Altwegg-Bissig, R., Lüthy-Hottonstein, J., Brenner, D.J. (1990). Biochemical identification of *Aeromonas* genospecies isolated from humans. J Clin Microbiol. 28, 258-264.
22. Panigrahy, M., Mathawson, J.J., Hall, F.C., Grunbles, L.C. (1981). Unusual disease condition in pet and aviary birds. JAVMA, 178, 394-395.
23. Popoff, M. (1984). Genus III *Aeromonas*. In: Krieg N.R. Holt, J.G. (eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. p. 545-548, Williams and Wilkins. Baltimore/London.
24. Shane, S.M., Gifford, D.H. (1985). Prevalence and pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. Avian Dis., 29, 681-689.
25. Shane, S.M., Harrington, K.S., Montrose, M.S., Roebuck, R.G. (1984). The occurrence of *Aeromonas hydrophila* in avian diagnostic submissions. Avian Dis., 28, 804-807.

26. **Sovenyi, J.F.** (1986). *Applicability of coagglutination test for detecting Aeromonas salmonicida antigens from extracts of bacterial cultures and experimentally infected tissues of the common carp (Cyprinus carpio L.)* Acta Hug., 34: 151-158.
27. **Stern, N.J., Drazek, E.S., Joseph, S.W.** (1987). *Low incidence of Aeromonas sp. in livestock feces.* J. Food Protect, 50, 66-69.
28. **Thomas, L.V., Gross, R.J., Cheasty, T., Rowe, B.** (1990). *Extended serogrouping scheme for motile, mesophilic Aeromonas species.* J. Clin. Microbiol. 28: 980-984.
29. **Turnbull, P?C., Lee, J.V., Miliotis, M.D., Van de Walle, S., Koorhof, H.J., Jeffery, L., Bryant, T.N.** (1984). *Production in relation to taxonomic grouping and source of isolation of Aeromonas species.* J Clin Microbiol, 19, 175-180.