

NORMAL VE PNÖYMONİLİ SIĞIR AKCİĞERLERİNDEN HAEMOPHILUS SOMNUS İSOLAZYONU ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Vüdan ÖZDEMİR (*)

GİRİŞ VE LİTERATÜR BİLGİSİ

Son yıllarda önemi anlaşılan Haemophilus somnus ilk kez 1960 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde sığırların tromboembolik meningoensefalomyelitisi (TEME) olaylarından izole edilmiştir (31). Özellikle Amerika ve Avrupa'da bu konuda yapılan araştırmalarda H.somnus'un sebep olduğu enfeksiyonların sıklığı tespit edilmiştir. Ancak, Türkiye'de metritisli iki ineğin uterusundan etkenin izolasyonu (17) ve serolojik olarak H.somnus'a karşı oluşan antikörlerin sığır popülasyonundaki dağılımını ve sıklığını belirlemek için yapılan bir diğer çalışmanın dışında literatüre rastlanmamıştır (3).

Taksonomisi ve nomenklatürü üzerinde halen tartışılan mikroorganizma ilk olarak izole edildiğinde "Haemophilus-like" (Haemophilus benzeri) olarak tanımlanmıştır (31). Daha sonra bazı araştırmacılar mikroorganizmanın Actinobacillus türü olarak kabul edilmesini önermişler ve actinobacillus actinoides-like olarak adlandırmışlardır (25). Bazı özellikleri gözönüne alınarak mikroorganizmanın Haemophilus cinsine dahil edilmesi ve Haemophilus somnus olarak adlandırılması önerilmiştir (6). "Haemophilus taksonomisi alt komitesi" ve öneri sahipleri bu sınıflamanın geçersiz olduğunu bildirmişlerdir (29). Ancak, şüpheli durum giderilmediği ve bir yenilik kazandırılmadığı için literatürlerde Haemophilus somnus ismi kullanılmaktadır.

Üremek için "X" ve "V" faktörlerine gereksinim göstermemesi, DNA homolojilerindeki farklılık, bazı ko-enzim benzeri maddelere sahip olmaması gibi özellikleri ile H.somnus klasik Haemophilus cinsinden ayrılmaktadır (24). Buna karşın, sığır ve koyunlardan izole edilen ve Histophilus ovis ve Haemophilus agni olarak adlandırılan iki tür, fenotipik özellikleri yönünden H.somnus'a çok benzerlik göstermektedirler (40). Son yıllarda yapılan araştırmalarda bu üç türün DNA homolojilerinin çok yüksek düzeyde bulunduğu

(*) Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Leptospira Lab. Şefi.

ve genetik olarak homojen bir grup oluşturdıkları ileri sürülmüştür (43). Bu araştırmacılar H.somnus suşlarının DNA Guanin + Sitozin oranlarını % 37-38.8 mol, Histophilus ovis'inkini ise % 38.1 mol düzeyinde belirlemişlerdir. Ayrıca koyunlardan izole edilen Haemophilus somnifer ve insan ve koyunlarda bulunan HB-5 grubu mikroorganizmalar daha sonra H.somnus türü kapsamına alınmışlardır (29).

Haemophilus somnus gram negatif, küçük pleomorfik, kokobasil şeklinde, karboksifilik, hareketsiz ve sporsuz bir bakteridir (29). H.somnus küçük ve kısa zincirlerden uzun filamentöz formlara kadar değişebilen uzunlukta olabilir. Ultrasükrüktürel incelemelerde, H.somnus'un diğer gram negatif bakterilere benzer bir hücre duvarına sahip olduğu gösterilmiştir. Gerek ışık ve gerekse elektron mikroskopu ile yapılan çalışmalarda, bakterinin çevresinde polisakkarit yapıda bir kapsül bulunmadığı ve ayrıca pilusa sahip olmamasına rağmen çeşitli sığır doku kültürü hücrelerine yapışma özelliğinin bulunduğu bildirilmiştir (38).

H.somnus % 10 sığır kanı ve % 0.5 maya özeti eklenmiş beyin kalp infüzyon agarında optimal üreme gösterir (29). Mikroorganizma canlı ortam olarak embriyolu tavuk yumurtasının sarısında iyi üremektedir (20). Diğer ve ark. (19)'ın yaptığı bir çalışma ile H.somnus'un 37°C'de kan ve serum içinde uzun süre canlı kaldığı bildirilmiştir. H.somnus uygun koşullarda 2-3 gün içinde 1-2 mm çapa ulaşan konveks, düzgün ve yuvarlak kenarlı, yağ kıvamında ve gri sarı renkli koloniler oluşturur (29). H.somnus suşları genellikle hemolitik değildir. Bazılarında vasatın rengini hafifçe yeşile döndüren, dar bir zona sahip hemoliz görülmüştür (29). H.somnus'un birçok koloni varyantının bulunduğu bildirilmiştir. Oluşan koloni tiplerinin smooth (S), mukoid (M), rough (R) ve intermedier (I) karakterde olduğu ve patojeniteleri arasında ilişki bulunmadığı bildirilmiştir (11). H.somnus'un yarı saydam küçük, saydam olmayan küçük ve saydam olmayan büyük koloni formu gösterdiği; yarı saydam kolonilerin düzensiz pleomorfik ve hücre duvarı ince suşlar tarafından, saydam olmayan büyük ve küçük koloni varyantlarının ise daha kalın hücre duvarına sahip suşlar tarafından oluşturulduğu gözlenmiştir (44).

Özellikle ilk izolasyonlarında suşların hemen hepsi % 10 karbondioksit içeren atmosfere ihtiyaç duyarlar (29). Suni vasatlara pasajlarından sonra kültürlerin aerobik ortama adapte oldukları bildirilmiştir (31). Thiamin pyrofosfat (cocarboxylase) ve thiamin monofosfatın üremeyi artırdığı (5) amino asit analizlerinden aspartik asidin üreme boyunca faydalı olan tek amino asit olduğu bildirilmiştir (13).

H.somnus suşları "X" ve "V" faktörlerine bağımlı değildir. Ayrıca amino lovulinik asit'ten porfirinlerin sentezlenebilmesiyle H.somnus'un "X" faktörüne bağımsızlığı ortaya konmuştur (29).

H.somnus'un bütün suşları glukoza fermente ederler. Diğer karbonhidratların fermentasyonu için değişik araştırmacılar farklı sonuçlar bildirmişlerdir (29). Oksidaz, nitrat, glukoz ve mannoz pozitif bulunmuştur (42). Fakat katalaz, üreaz ve sitrat negatif sonuç vermiştir. İndol, hidrojen sülfür ve lizin dekarboksilaz gibi biyokimyasal testlerde ise araştırmacılar değişik sonuçlar bildirmişlerdir (26). Dezenfektanların H.somnus üzerine etkileri incelenmiş ve önerilen standart konsantrasyonlarının H.somnus'u öldürmeğe yeterli olduğu belirlenmiştir (18).

Siğirilerde H.somnus enfeksiyonu önce tromboembolik meningoencephalitis (TEME) gibi sentral sinir sistemini etkileyen enfeksiyöz bir hastalık olarak tanıdı (35). Fakat siğirilerde respiratör sistem hastalığı, polyarthrit, tendonitis, abortus, infertilite, sepsis ve zayıf buzağı sendromu gibi diğer birçok sendrom, bu organizm tarafından olan enfeksiyonla ilişkili bulunmuştur (22,23). Bütün bu sistemleri etkileyebildiği için, bu mikroorganizmanın oluşturduğu enfeksiyonların genel tanımlanmasında "Haemophilus somnus kompleksi" terimi kullanılmaktadır (8).

Tromboembolik meningoensefalit olaylarında ani ölüm ve hayvanların koma halinde bulunmaları akut ve perakut dönemlerinin karakteristik belirtileridir. Çok genç ve çok yaşlılar etkilenebildiği gibi genellikle 1-2 yaş arası hayvanlarda görülür (31). Hastalığın akut döneminde durgunluk, iştahsızlık ve yüksek ateş gibi genel belirtilerin yanısıra ataksi, paresis, paralis, kas tremorları, hassasiyet ve dairesel dönme gibi nörolojik bulgulara da rastlanmıştır. Bazen, strabismus ve nistagmus ile birlikte görülebilen unilateral ve bilateral körlük de hastalığın tipik bulguları arasında sayılmıştır. Ayrıca oftalmolojik muayenede fokal retinal kanamalar görülmüştür (29). Hastalık daha çok besi siğirilerinde bazen de süt siğirilerinde görülür. Genellikle sonbahar ve kışın nemli dönemlerde daha çok rastlanır (37).

Bir TEME salgınından 1-2 gün veya birkaç hafta sonra eklem ile ilgili topallık ortaya çıkabilir. Bu perakut veya akut sendromla ilgili olabilir veya bağımsız olarak şekillenen topallık ve kasılma ile karakterize subakut sendromda görülür. Topallığın şekillenmesinden birkaç gün sonra etkilenen eklemelerde şişkinlikler görülür. Bu gelişen arthrit birkaç haftadan birkaç aya kadar uzayabilir (13).

Genital sistemi ile ilgili olarak normal boğaların prepusyumundan, distal üretra ve semeninden H.somnus izole edilmiştir. Bazı H.somnus suşlarının prepusyumun ve distal üretranın irinli yangısına sebep olabileceği ve sperm kalitesini bozabileceği ileri sürülmüştür (10,13).

H.somnus ineklerin endometritisinin önemli bir etkenidir. Mikroorganizma infertil ineklerin uterusundan, endometritis ve metritis olaylarından izole edilmiştir (13,17). H.somnus, abortlara sebep olduğu olaylarda fetusun dokularından veya mide içeriğinden izole edilmiştir (10). Atık etkeni ola-

rak önemi gittikçe artan mikroorganizmayı araştırmacılar atık sığır fetuslarından % 3-13 oranında izole ettiklerini bildirmişlerdir (37). Deneysel çalışmalar ile de H.somnus'un sığırlarda abortusa neden olabileceği gösterilmiştir (10).

H.somnus sığır pnömonisinin önemli bir sebebidir (1). H.somnus ile ilişkili solunum sistemi enfeksiyonlarının iki şekilde geliştiği bildirilmiştir (29). Saunders ve ark. (37) solunum sistemi hastalığının TEME ile birlikte ortaya çıktığını ve TEME'nin bir sürüde solunum sistem hastalığı geliştikten sonra, sıklıkla buzağılarda oluştuğunu ve septiseminin solunum sistemi dokularının primer enfeksiyonunun bir sonucu olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Buna karşın bir çok araştırmacı H.somnus ile ilişkili pnömoni olgularını ayrı bir hastalık olarak değerlendirmişler ve H.somnus'u bu olguların primer patojenik etkeni olarak kabul etmişlerdir. Son raporlara görede buzağılarda H.somnus enfeksiyonu, bilhassa alt solunum sistemi hastalığını meydana getirmektedir (1,13). H.somnus, saf kültür halinde ya da Pasteurella haemolytica, Pasteurella multocida ile hemen hemen aynı oranda görülür (1,10). Pnömonik bir akciğerden bu üç bakteriden ikisini bir arada izole etmek oldukça rastlanan bir olaydır (10). H.somnus'tan ileri gelen solunum sistemi hastalığı akut fibrinli pnömoni ve pleuritis ile karakterizedir(22). H.somnus ayrıca laryngitis, tracheitis, konjunktivitis, otitis media olgularından ve sağlıklı sığırların üst solunum yollarından da izole edilmiştir (8,32,33).

Hastalık daha çok besi sığırlarında sonbahar ve kış ayları süresince soğuk, nemli ve değişken hava ve fazla sayıda hayvanın bir arada bulunmasının verebileceği stres ile şekillenir (7). Hayvanların besi durumlarının da etkili olabileceği düşünülmektedir. Uzun süreli yapılan bir taramada kilosunu 200 kg'dan daha az olan besi ve süt danalarında etkene sıklıkla rastlanmıştır (1,2).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda buzağılarda deneysel yolla H.somnus kökenli pnömoni oluşturulmuştur (22,30). Pnömoni birçok yollarla meydana getirilmiştir. Intratracheal inokulasyon; nasla instillasyon, aerosola maruz bırakma ya da intravenöz enjeksiyondan daha başarılı olarak kullanılmıştır (12). Gerek deneysel yolla meydana getirilen, gerekse doğal olarak şekillenen H.somnus kökenli pnömonilerden (H.somnus) mikroorganizma yüksek oranda izola edilmiştir. Andrews ve ark. (1,2), yaptıkları iki ayrı çalışmada % 89 ve % 87.6 oranında, Stastova (42) % 23.7 oranında H.somnus'u pnömonik akciğerlerden izole etmişlerdir. Corbeil ve ark. (10), Gogolewski ve ark. (22), Jackson ve ark. (30) ve yine bir başka çalışmasında Gogolewski ve ark. (23), deneysel yolla oluşturulan H.somnus kökenli pnömonilerdeki lezyonlarla, doğal yolla oluşan H.somnus kökenli pnömonilerdeki akciğer lezyonlarının aynı olduğunu bildirmişlerdir.

H.somnus ineklerin perakut ve akut mastitislerinden spontan olarak izole edilmiş ve mastitis deneysel olarak gerçekleştirilmiştir (4).

TEME'de merkezi sinir sisteminde 4 cm'ye varan çok sayıda kırmızı-kahverengi hemorajik nekrozlar karakterizedir. İskelet kaslarında, idrar kesesi, kalp, böbrek, optik sistem ve retina dahil diğer dokularda sık sık septik infarksiyon, vaskulitis ve tromboza bağlı lezyonlar meydana gelir. Diğer belirgin lezyonlar perikarditis, hydroperikardium, cystitis, fibrino prulent veya suppurativ polyarthritis ve synovitis, lymphadenitis, hemorajik enteritis, perihepatitis, peritonitis ve polyserositis'dir (31,36). Üst solunum yollarının lezyonları sık sık TEME ile ilişkili olarak bildirilir. Rhinitis, prulent frontal sinusitis ve pharyngitis olguları, nekroze veya ulseratif laryngitis sık sık bildirilmektedir (29).

H.somnus'un tek olarak izole edildiği danaların pnöymonik lezyonlarının TEME ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir. Corboz (13), çok şiddetli pronköp-nöymoni gözlemiştir. P.multocida, P.haemolytica, Mycoplasma spp.'nin sık olmamakla beraber H.somnus ile birlikte izole edildiği olaylarda akut fibrinöz pleurapnöymoni ve fibrinöz bronkopnöymoni bildirilmiştir (1).

Genital sistemde ise kotiledonların nekroz ve hemorajileri, metritis mevcuttur. Atık fötusta extremitelerde yaygın ödem görülmektedir (29).

H.somnus'un deneme hayvanlarındaki patojenitesi üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmış, fare dışındaki laboratuvar rodentlerinin H.somnus'a genellikle az duyarlı oldukları bulunmuştur (15). Farelerde periton içi, intrase-rebral ve intrakranial yollarla enfeksiyon oluşturmayı başaran Kennedy ve ark. (31), embriyolu tavuk yumurtasının H.somnus'la kolayca infekte edilebildiğini ve embriyonun çeşitli lezyonlar sonucu öldüğünü belirtmişlerdir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda H.somnus'un suşlarının virulans farklılıkları hakkında bilinenler çok azdır. Corboz ve Pohlenz (12), beyin ve akciğer izolatlarının oluşturdukları enfeksiyonların şiddetleri arasında farklılıklar bulunduğunu bildirmişlerdir. Corboz ve Wild(13) ise değişik kaynaklı H.somnus izolatlarının morfolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeydeki özellikleri arasında fark bulunmadığını açıklamışlardır. Yapay besiyerlerindeki pasajların patojeniteyi azalttığı, embriyolu tavuk yumurtalarında yapılan pasajların ise patojeniteyi artırdığı bildirilmiştir (16,31).

H.somnus'un hücre duvarı antijenik özelliğe sahip proteinleri ve lipopolisakaritleri içerir (29). Yapılan ilk çalışmalarda H.somnus'un birçok suşunun antijenik bakımdan homojen olduğu bildirilmiştir (16,20). Fakat son yıllarda yapılan bir çalışmada kros adsorbsiyon aglutinasyon yöntemi kullanılarak suşlar arasında antijenik farklılıklar belirlenmiştir (9). H.somnus enfeksiyonlarının serolojik teşhisi için aglutinasyon, agar-jel immun diffuzyon, hemaglutinasyon, komplement fiksasyon ve ELISA testleri kullanılmaktadır (3,16,39).

In-vitro çalışmalarla H.somnus'un neomycin, lincomycin ve sulfonamid hariç genelde diğer antibiyotiklere duyarlı olduğu bildirilmiştir. Ancak,

TEME'den etkilenmiş hayvanları tedavide nörolojik gelişme başarısız olmuştur (6). Çok erken klinik sendrom gösteren olaylarda antimikrobiale tedaviye değişik cevaplar alınmıştır (31). Solunum ve genital sistem ile ilişkili H.somnus'un tedavisi hakkında bilgi bulunmamaktadır.

H.somnus kökenli pnömoni ve TEME'de serum antikorlarının koruyucu olacağı düşünülerek çeşitli aşular hazırlanmaktadır. Alüminyum hidroksit adjuvanlı H.somnus bakterinin iki doz uygulandığında buzağuları deneysel enfeksiyondan koruduğu bildirilmiştir (29). Groom ve Little (27), Stephens ve ark. (41) etkili koruma sağlamak için iki doz aşı uygulamasının gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Ancak, deneysel enfeksiyonlarda serum antikor titreleri yükseldiği halde H.somnus'a spesifik serum IgG ve IgM düzeyleri yüksek olan sığırların bazı enfeksiyonlara duyarlı olabildiği ve ölümlerin şekillendiği bildirilmektedir (29,39). Son yıllarda yapılan çalışmalar H.somnus'un intraselüler bir patojen olabileceği varsayımını ortaya çıkarmıştır (14).

MATERYAL VE METOT

Örneklerin toplanması : İzolasyonda kullanılmak üzere 1989-1990 yılında Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Genel Teşhis Laboratuvarına getirilen pnömonik buzağı ve dana akciğer materyallerinden toplam 11 adet toplandı. Bu toplanan materyaller Ankara Şeker Fabrikası (4 adet), Eskişehir Şeker Fabrikası (1), Atatürk Orman Çiftliği (1), Ankara, Kayseri ve Çankırı İl Tarım Müdürlükleri (5) tarafından Enstitümüze gönderilmiştir. Ayrıca, örneklerin toplandığı 4 ay süresince 10 defa Ankara Et ve Balık Kurumu mezbahasına gidilerek 209 adet normal ya da pnömonili akciğer materyali temin edildi. Bu materyaller de Ankara (150), Yozgat (6) ve Konya (53) bölgelerinde beslenen besi sığırlarına aittir (Tablo-1). İncelenen bu 220 materyalden 10 tanesi buzağı, 210 tanesi 1,5-2 yaş arası erkek sığırdır. Toplam 220 materyalin, 90 tanesi dış bakıda normal görünüşlü akciğer, 130 tanesi ise pnömonili akciğer olarak ayrıldı. Alınan örnekler aynı gün laboratuvara getirilerek incelendi.

Tablo-1 : Toplanan materyallerin kaynakları

Materyalin alındığı yer	Materyal sayısı
Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü	11
Ankara E.B.K. (Ankara)	209 (150)
(Yozgat)	(6)
(Konya)	(53)
TOPLAM	220

Besiyerleri

Brain-Heart Infusion Besiyeri (Difco)

H.somnus'un izolasyonu amacı ile kullanılan bu temel besiyerinin formülü aşağıda belirtilmiştir.

Calf Brains	200 g
BeefHearts	250 g
Proteose Peptons	10 g
Bacto Dextrose	2 g
Sodium Chloride	5 g
Disodium Phosphate	2,5 g
Bacto Agar	15 g

Bu temel besiyerine % 0.5 maya özeti, % 0.5 Cocarboksilaz ve % 10 defibrine koyun kanı katıldı (BHIBYE). H.somnus'un sıvı besiyerlerinde pasajının yapılması amacı ile % 0.5 maya özeti ve % 10 at serumu içeren Brain-Heart Infusion buyyonu kullanıldı. Besiyerleri otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra petrilere dökülerek buzdolabında saklandı.

Standart Suşlar

İzolasyon ve identifikasyon çalışmalarında kullanılmak üzere A.Ü. Vet. Fak. Bakt. kürsüsünden sağlandı. Bu suş Kanada'dan TEME'li bir geyiğin beyninden izole edilmiş olan H.somnus 43826 suşu olup Dr. S.C.Groom'dan (Ontario Veterinary Collage, University of Guelph, Ontario, Canada) temin edilmiştir.

H.somnus'un İzolasyonu Çalışmaları

Alınan materyaller en seri ve uygun koşullarda laboratuvara getirildi. Bu materyallerden besiyerlerine, aşağıda belirtildiği şekilde ekimler yapıldı.

Akciğerin üzeri kızgın bir spatül ile dağıldı. Steril bir makas ile steril swabın rahatça girebileceği kadar bir yer kesildi. Bu kesilen yerden içeriye steril swab değişik yönlerde sokularak akciğer sıvısı emdirildi. Bu swab direk olarak daha önce petrilere hazırlanmış olan BHIBYE agar üzerine sürülerek ekildi. % 10 CO₂'li ve nemli ortamda 37°C'de 48-96 saat inkube edildi.

İdentifikasyon Çalışmaları

İzole edilen mikroorganizmalar Humphrey ve Stephens'e göre (29)'de tarif edildiği şekilde koloni morfolojileri ve biyokimyasal karakterleri yönünden incelendi. Pasajların yapılması ve biyokimyasal testler için koloni-

lerden % 0.5 maya özeti ve % 10 at serumu içeren Brain-Heart Infusion buyyona ekimler yapıldı. İzolatların H.somnus olduğu, standart bir H.somnus suşuna karşı Arda ve ark. (3) tarafından hazırlanan hiperimmün serum kullanılarak yapılan aglutinasyon testi ile doğrulandı. İzolatların üreme kabiliyetleri kanlı agar, Mac Conkey agar ve nutrient buyyonda ve aerobik koşulda kontrol edildi.

H.somnus'un Biyokimyasal Özelliklerinin Saptanması

a - **Katalaz testi** : Agar üzerindeki taze üremeden bir 1-2 koloni alınarak lâm üzerindeki bir damla % 0.5'lik H₂O₂ içinde suspanse edildi. Gaz kabarcıklarının görülmesi pozitif kabul edildi.

b - **Karbonhidrat fermentasyonu** : Glukoz, maltoz, laktoz ve arabinoz içeren besiyerlerine (durhaim tüplü) 0.1 cc miktarında mikroorganizma ekildi ve 37°C'de inkubasyona bırakıldı. Asit ve gaz teşekkülü yönünden hergün kontrol edildi. 14 gün içinde besiyerinin renginin açılması asit meydana geldiğini, durhaim tüplerinde gaz toplanması gaz teşekkülünü gösterdi.

c - **Oksidaz testi** : Bu aktivitenin saptanması amacıyla M-N-dimetil-1-4 fenilen diamonyum diklorid ve 1-naftol içeren Bactident Oxidase (Merck) hazır kağıt şeritleri kullanıldı. Kağıt şeridin normalde pembe olan renginin 20-60 saniye içinde mor renk alması pozitif, rengin sarıya dönmesi veya değişmemesi negatif olarak değerlendirildi.

d - **İndol deneyi** : 5 cc peptonlu su içine mikroorganizma ekilip 37°C'de 2 gün inkube edildi. Kültürün üzerine Kovac yaracından 0.5 cc ilave edildi ve karıştırıldı. Kültürün üst kısmında pembe rengin oluşumu pozitif, rengin sarı oluşu negatif kabul edildi.

e - **H₂S oluşumu** : Mikroorganizma 5 cc peptonlu su içine ekildikten sonra içine kurşun asetatlı kağıt yerleştirildi. Kültürdeki kağıt şerit hergün kontrol edildi. Kağıt şeritteki uçtan başlayan kararım pozitif olarak kabul edildi. Negatif reaksiyonu değerlendirmek için kültüre 0.5 cc 2N HCl ilave edildi ve tekrar kağıt şerit konarak kültür içinde H₂S olmadığı kontrol edildi.

f - **Üreaz deneyi** : 0.5 cc üreli sıvı ortam içine mikroorganizmanın yoğun bir emülsiyonu yapıldı ve 37°C'de 3 saat su banyosunda tutuldu. Sürenin sonunda tüpün içine 0.1 cc Nessler ayırıcı kondu ve 3-4 dakika içinde sonuçlandı. Pozitif reaksiyonlarda sarıdan koyu kahverengiye kadar değişen renkte presipitasyon görüldü. Negatif reaksiyonlarda tüplerin rengi değişmedi.

B U L G U L A R

İncelenen 220 akciğer materyalinden 130 tanesi (% 59.09) pnömoni, 90 tanesi (% 40.9) sağlıklı hayvanlara ait akciğerlerdir. Pnömonili 130 akciğerin 4 (% 3.2)'ünden H.somnus izole edildi. Normal görünüşlü akciğerlerin ise 1 (% 1.1)'inde H. somnus bulundu.

İzole edilen bu suşlar yalnızca BHIBYE agar'da ve CO₂'li ortamda ürediler. Kırksekiz saat içinde üreyen koloniler 1 mm çaplı, yarı saydam, grimsi sarı renkli, tereyağ kıvamında, yuvarlak ve konveks olarak görüldüler. Daha uzun inkubasyonda koloni çapı 2-3 mm'ye ulaştı.

İzolatların sadece kanlı, maya özelli beyin-kalp infuzyon agar (BHIB-YE) ve serumlu, maya özelli, beyin-kalp infuzyon buyyon (BHİSYE)'de ürettiği belirlendi. Diğer test edilen kanlı agar, Mac Conkey agar ve nutrient buyyonda üreme kaydedilmedi. Karanlık saha ve faz kontrast mikroskopu ile incelendiğinde hareket gözlenmedi. H.somnus antiserumu ile kontrol edilen suşların tümü lâm'da aglutinasyon verdi.

Üreyen kolonilerden Gram yöntemi ile yapılan boyamalarda gram negatif, pleomorfik, küçük kokobasil şeklinde mikroorganizmalar görüldü. İzole edilen mikroorganizmalarda biyokimyasal reaksiyonlar sonunda oksidaz ve indol pozitif, katalaz, üreaz ve H₂S oluşumu negatif bulundu. Suşlar glukoz ve maltoz'u fermente etti, laktoz ve arabinoz'u fermente etmedi.

H.somnus izole edilen 4 pnömoni vak'asının tümünde fibrinli veya prulent karakterde lezyonlar belirlendi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde H.somnus kökenli enfeksiyonlar ve hayvan ekonomisine verdiği kayıpların önemi gün geçtikçe değer kazanmaktadır. Normal ve pnömonili sığırların akciğerinde H.somnus'un varlığını tespit üzere yapılan bu çalışmada değişik menşeli 220 besi sığırının akciğeri incelenmiştir. Pnömonili akciğerlerde % 3.2 gibi bir değer bulunmuştur. Normal görünüşlü 90 akciğerin ise sadece birinden H.somnus izole edilmiştir. Ancak, bu oran diğer ülkelerle kıyaslandığı zaman oldukça düşüktür. Andrews ve ark. (2)'nin yaptıkları ve beş yıl süren bir araştırmada; 105 sığırın 92'sinden (% 87.6) H.somnus izole edilmiştir. Andrews ve ark. (1)'nin yaptıkları bir başka araştırmada da % 89 oranında H.somnus izole edilmiştir. Stastova (42), ise danalardaki H.somnus oranını % 23.7 olarak bildirmiştir. Yine Moreira ve ark. (34), bir salgında buzağuların % 20'sinin H.somnus pnömonisinden etkilendiğini belirtmişlerdir.

Yapılan bu çalışmada H.somnus oranının az bulunması, besi sığırlarına antibiyotik katkılı yem verilmesinden kaynaklanmış olabilir. Ayrıca,

mezbahada kesilen bu sığırların ortalama ağırlıklarının 200-350 kg arasında olduğu öğrenilmiştir. Andrews ve ark. (1,2), yaptıkları her iki çalışmada da ağırlıkları 200 kg'nun altında olan hayvanların bu mikroorganizmaya karşı daha hassas olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, diğer çalışmalarda özellikle pnöymoni salgını olan sürülerin seçilmesi oranının yüksek olmasına yol açabilir.

Sığırlarda deneysel olarak da H.somnus kökenli pnöymoniler gerçekleştirilmiştir (10,21,22,23,28,30,35). Oluşturulan bu pnöymonilerde, deneysel inokulasyonlarda kullanılan danaların akciğerlerinden H.somnus izole edilmiş (21,22,23,28,30,35), mikroorganizmanın akciğerlerde uzun süre kaldığı (23,35) ve bu sürenin artan virulans mekanizmasıyla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (35).

Deneysel olarak oluşturulan H.somnus kökenli pnöymonilerdeki lezyonlarla, doğal yolla oluşan H.somnus kökenli pnöymonilerdeki lezyonların aynı olduğu bildirilmiştir (10,12,21,28,30). Bu çalışmada da önceki araştırmacılar tarafından bildirilenlere paralel olarak pnöymoni akciğerlerinin tümünde fibrinli ya da prulent pnöymoni lezyonları ve ayrıca % 11.5 oranında nekrotik lezyonlar tespit edilmiştir.

İzolasyonda H.somnus'un % 10 sığır kanı ve % 0.5 maya özeti eklenmiş Brain-Heart Infusion agar'da optimal üreme gösterdiği ve özellikle ilk izolasyonda %10 CO₂'li atmosferin gerektiği Humphrey ve Stephens (29), tarafından bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada da H.somnus'un izolasyonu için % 0.5 maya özeti, %10 koyun kanı ve % 0.5 Thiamine pyrophosphate (cocarboxylase) içeren Brain-Heart Infusion agar kullanılmış olup % 10 CO₂ atmosferde 37°C'de 48 saat inkubasyona bırakılmıştır. Potgieter ve ark. (35), ise deneysel inokulasyonlar için H.somnus'u % 5 sığır kanı, % 1 maya özeti katılmış tryptose agar'da ve % 10 CO₂'li atmosferde 37°C'de ürettiklerini bildirmişlerdir.

Asmussen ve Daugh (5), serum, maya özeti ve thiamine pyrophosphate (cocarboxylase)'in üremeyi artırıcı etkilerinden bahsetmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da bu maddelerin eksikliği durumunda üreme kaydedilmemiştir.

Stastova (42), izole ettiği H.somnus suşlarının biyokimyasal reaksiyonlarında oxidase, NO₃, glukoz ve mannoz'u pozitif bulmuştur. Yapılan bu çalışmada da önceki araştırmacıların çalışmalarına paralel olarak oxidase ve glukoz pozitif bulunmuştur.

Yapılan literatür taramasında normal görünüşlü akciğerlerden H.somnus izole edildiğine dair herhangi bir kayıda rastlanmamıştır. Ancak, Humphrey ve Stephens (29), sağlıklı sığırların üst solunum yollarından H.somnus izole edildiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez *H.somnus*'un sığırların pnöymoni vak'alarında bulunabileceği gösterilmiş ve diğer pnöymonik infeksiyon etkenleri arasında *H.somnus*'un da rutin olarak incelenmesi gerektiği ortaya konulmuştur.

Ö Z E T

130 Pnöymonili akciğerden dört ve 90 normal görünüşlü sığır akciğerlerinden 1 adet *Haemophilus somnus* izole ve tanıya edildi. Toplanan materyallerden steril eküvyonlarla kanlı agar, Mac Conkey agar ve kanlı-maya özelli beyin-kalp infüzyon agara ekimler yapıldı. Sadece kanlı-maya özelli beyin-kalp infüzyon agarda % 10 CO₂ atmosferde, 48 saat inkubasyondan sonra üreme belirlendi. Koloniler; grimsi sarı renkli, tereyağ kıvamında, 1 mm çaplı, yarı saydam, yuvarlak şekilli olarak görüldüler. İzole edilen gram negatif, pleomorfik, küçük kokobasil şeklindeki mikroorganizmalar glukozu fermente ettiler. Indol ve oksidaz pozitif, katalaz negatif bulundu. *H.somnus* antiserumu ile kontrol edilen izolatların tümü lâmda aglutinasyon verdi.

S U M M A R Y

Haemophilus somnus was isolated and identified from four lungs of 130 lungs with pneumonia and from one of 90 lungs with normal appearance. The collected materials were seeded on to blood agar, Mac Conkey and brain-heart infusion agar with blood and yeast extract using steril swabs. The organisms grew well only on brain-heart infusion agar with blood and yeast extract in the presence of % 10 CO₂ atmosphere and after 48 hours incubation. The colonies were greyish yellow in colour, translucent, rounded, 1 mm in diameter and butter-like in consistency. The isolated organisms were gram negative, pleomorphic and coccobacilli and they fermented glucose. Indol and oxidase tests were positive but catalase negative. All the isolates tested with *H.somnus* antiserum and gave agglutination in the slide-agglutination test.

K A Y N A K L A R

- 1 - ANDREWS, J.J., ANDERSON, T.D., SLIFE, L.N. and STEVENSON, G.W. (1985) : Microscopic lesions associated with the isolation of *Haemophilus somnus* from pneumonic bovine lungs. *Vet. Pathol.*, 22 : 131-136.
- 2 - ANDREWS, J.J., SLIFE, L.N. and STEVENSON, G.W. (1983) : Naturally occurring *Haemophilus somnus* pneumonia in cattle. In proceedings of the Third International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Vol. 2 : 377-384

- 3 - ARDA, M., DIKER, K.S., ERDEĞER, J. (1989) : Sığırların *Haemophilus somnus* infeksiyonlarının teşhisinde çeşitli serolojik testlerin karşılaştırılması üzerinde çalışmalar. Doğa Türk Vet. Hayv. Derg., 13 : 83-88.
- 4 - ARMSTRONG, K.R., OSBORNE, A.D. and JANZEN, E.D. (1986) : *Haemophilus somnus* mastitis in a dairy cow. Vet. J., 27 : 211-212.
- 5 - ASMUSSEN, M.D. and BAUGH, C.L. (1985) : Thiamine pyrophosphate (cocarboxylase) as a growth factor for *Haemophilus somnus*. J. Clin. Microbiol., 14 : 178-183.
- 6 - BAILIE, W.E., ANTHONY, H.D. and WEIDE, K.D. (1966) : Infectious thromboembolic meningoencephalomyelitis (sleeper syndrome) in feedlot cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc., 148: 126-166.
- 7 - BLOOD., D.C., HENDERSON, J.A. and RODOSTITIS, O.M. (1979) : *Haemophilus septicaemia* of cattle. Vet. Med. 519-520.
- 8 - BEEMAN, K.B. (1985) : *Haemophilus somnus* infection of cattle. Compendium, 7: 259.262.
- 9 - CANTO, G.J. and BIBERSTEIN, E.L. (1982) : Serological diversity in *Haemophilus somnus*. J. Clin. Microbiol., 15 : 1009-1015.
- 10 - CORBEIL, L.B., WIDDERS, P.R., GOGOLEWSKI, R., ARTHUR, J., INZANA, T.J. and WARD, A.C.S. (1986) : *Haemophilus somnus*, bovine reproductive and respiratory disease. Can. Vet. J., 27 : 90-93.
- 11 - CORBOZ, L. (1981) : Epidemiology of *Haemophilus somnus* infection in cattle : colonial variants of strains isolated from various sources. In *Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus*, Ed. M. Kilian, Academic Press, London, pp: 133-142.
- 12 - CORBOZ, L. and POHLENZ, J. (1976) : Experimentelle infectionen mit sogenannten *Haemophilus somnus* beim kalb: vergleich von stammen mit unterschiedlicher virulenz. Schweiz. Arch. Tierheilk., 118: 429-440.
- 13 - CORBOZ, L. and WILD, P. (1981) : Epidemiologie der *Haemophilus somnus* infection beim rind: vergleich von stammen in der polyacrilamidgel-electrophorese (PAGE). Schweiz. Arch. Tierheilk. 123: 78-88.
- 14 - CZUPRYNSKI, C.J. and HAMILTON, H.L. (1985) : Bovine neutrophils ingest but do not kill *Haemophilus somnus* in vitro. Infect. Immun., 50: 431-436.
- 15 - DEWEY, K.L. and LITTLE, P.B. (1984) : The pathogenicity of *Haemophilus somnus* in various laboratory animal species. Can. J. Comp. Med., 48: 27-29.
- 16 - DIERKS, R.E., HANNA, S.A. and DILMANN, R.C. (1973) : Epizootiology and pathogenesis of *Haemophilus somnus* infection. J. Am. Vet. Med. Assoc., 163: 866-869.
- 17 - DIKER, K.S. ARDA, M. and IZGÜR, H. (1986) : Isolation and characterization of *Haemophilus somnus* from cows with metritis. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 33:52-57.
- 18 - DIKER, K.S., ERDEĞER, J. and HASHIMOTO, K. (1989) : Effects of disinfectants on *Haemophilus somnus*. Etlik Vet. Mikrob. Derg. 5: 137-142.
- 19 - DIKER, K.S., YARDIMCI, H. and HASHIMOTO, K. (1989) : Survival of *Haemophilus somnus* in biological milieus. Etlik Vet. Mimrob. Derg. 5: 127-136.
- 20 - GARCIA,-DELGADO, G.A., LITTLE, P.B. and BARNUM, D.A. (1977) : A comparison of *Haemophilus somnus* strains. Can. J. Comp. Med., 41: 380-388.

- 21 - GOGOLEWSKI, R.P., KANIA, S.A., INZANA, T.J., WIDDERS, P.R., LIGGITT, H.D. and CORBEIL, L.B. (1987) : Protective ability and specificity of convalescent serum from calves with *Haemophilus somnus* pneumonia. *Infect. Immun.*, 50: 431-435.
- 22 - GOGOLEWSKI, R.P., LEATHERS, C.W., LIGGITT, H.D. and CORBEIL, L.B. (1987) : Experimental *Haemophilus somnus* pneumonia in calves and immunoperoxidase localization of bacteria. *Vet. Pathol.*, 24: 250-256.
- 23 - GOGOLEWSKI, R.P., SCHAEFER, D.C. WASSON, S.K., CORBEIL, R.R. and CORBEIL, L.B. (1989) Pulmonary persistence of *Haemophilus somnus* in the presence of specific antibody. *J. Clin. Microbiol.*, 9: 1767-1774.
- 24 - GONZALES, H.F. and BINGHAM, D.P. (1983) : Genetic relatedness of *Haemophilus somnus* to select genera of bacteria. *Am. J. Vet. Res.*, 44:1793-1795.
- 25 - GOSSLING, J. (1966) : The bacteria isolated from lesions of embolic meningoencephalitis of cattle. *Illinois Vet.*, 9: 14-18.
- 26 - GROOM, S.C, HAZLETT, M.J. and LITTLE, P.B. (1986) : An evaluation of the APIZYM system as a means of identifying *Haemophilus somnus* and related taxa. *Can. J. Vet. Res.*, 50: 238-244.
- 27 - GROOM, S.C. and LITTLE, P.B. (1988) : Effects of vaccination of calves against induced *Haemophilus somnus* pneumonia. *Am. J. Vet. Res.*, 49:793-800.
- 28 - GROOM, S.C., LITTLE, P.B. and ROSENDAL, S. (1988) : Virulence differences among three strains of *Haemophilus somnus* following intratracheal inoculation of calves. *Can. J. Vet. Res.*, 52: 349-354.
- 29 - HUMPHRY, J.D. and STEPHENS, L.R. (1983) : *Haemophilus somnus*: a review, *Vet. Bull.*, 53: 987-1004.
- 30 - JACKSON, J.A., ANDREWS, J.I. and HARGIS, J.W. (1987) : Experimental *Haemophilus somnus* pneumonia in calves. *Vet. Pathol.*, 24:129-134.
- 31 - KENNEDY, P.C., BIBERSTEIN, E.L., HOWARTH, J.A., FRAZIER, L.M. and DUNGWORTH, D.L. (1960) : Infectious meningoencephalitis in cattle, caused by *Haemophilus*-like organism. *Am. J. Vet. Res.*, 21:403-409.
- 32 - LAMONT, M.H. and HUNT, B.W. (1982) : *Haemophilus somnus* and conjunctivitis. *Vet. Rec.*, III:21.
- 33 - McEWEN, S.A. and HULLAND, T.J. (1985) : *Haemophilus somnus* induced otitis and meningitis in a heifer. *Can. Vet. J.*, 26: 7-8.
- 34 - MOREIRA, A.R., TERZOLA, H.R., ODRIOZOLA, E. SALAMANCO, A.G., CASARO, A.P. and ARNALDE, J. (1987) : Bovine bronchopneumonia associated with *Haemophilus somnus*. *Rev. Med. Vet.*, 68: 36-38.
- 35 - POTGIETER, L.N.D., HELMAN, R.G., GREENE, W. BREIDER, M.A., THURBER, E.T. and PEETZ, R.H. (1988) : Experimental bovine respiratory tract disease with *Haemophilus somnus*. *Vet. Pathol.*, 25: 124-130.
- 36 - SAUNDERS, J.R. and JANSEN, E.D. (1980) : *Haemophilus* infections. II. A Canadian field trial of commercial bacterin: clinical and serological results. *Can. Vet. J.* 21: 219-224.
- 37 - SAUNDERS, J.R., THIESSEN, W.A. and JANSEN, E.D. (1980) : *Haemophilus somnus* infections. I. A ten year (1969-1978) retrospective study of losses in cattle herds in Western Canada. *Can. Vet. J.*, 21: 119-123.

- 38 - STEPHENS, L.R. and LITTLE, P.B. (1981) : Ultrastructure of *Haemophilus somnus*, causative agent of bovine infectious thromboembolic meningoencephalitis. *Am. J. Vet. Res.*, 42: 1638-1640.
- 39 - STEPHENS, L.R., LITTLE, P.B. WILKIE, B.N. and BARNUM, D.A. (1981) : Humoral immunity in experimental thromboembolic meningoencephalitis in cattle caused by *Haemophilus somnus*. *Am. J. Vet. Res.*, 42: 468-473.
- 40 - STEPHENS, L.R., HUMPREY, I.D., LITTLE, P.B. and BARNUM, D.A. (1983) : Morphological, biochemical, antigenetic and cytochemical relationship among *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni*, *Haemophilus haemoglobinophilus*, *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis*. *J. Clin. Microbiol.*, 17: 728-737.
- 41 - STEPHENS, L.R., LITTLE, P.B., HUMPREY, I.D., WILKIE, B.N. and BARNUM, D.A. (1982) : Vaccination of cattle against experimentally induced thromboembolic meningoencephalitis with a *Haemophilus somnus* bacterin. *Am. J. Vet. Res.*, 43: 1339-1342.
- 42 - STASTOVA, A. (1988) : *Haemophilus somnus* as a cause of bronchopneumonia in calves. *Vet. Med.*, 33: 193-200.
- 43 - WALKER, R.L., BIBERSTEIN, E.L., PRITCHETT, R.F. and KIRKHAM, C. (1985) : Deoxyribonucleic acid relatedness among *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni*, *Histophilus ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Haemophilus influenzae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35: 46-49.
- 44 - WARD, G.E., NIVARD, I.R. and MAHESWARAN, S.K. (1984) : Morphologic features, structure and adherence to bovine turbinati cells of three *Haemophilus somnus* variants. *Am. J. Vet. Res.*, 45: 336-338.