

KAZLARDAN ASPERGİLLUS FUMİGATUS İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU

Isolation and Identification of *Aspergillus Fumigatus* from Geese

Mitat ŞAHİN* Fuat AYDIN** Oktay GENÇ*** M. Ali GÜLER ***

ÖZET

Kars yöresinde üç farklı odaktan toplam 206 kazdan 14 tanesinin ölümüne neden olan aspergillozis belirlendi. Kazlarda klinik olarak kilo kaybı, tüylerin kabarması, iştahsızlık ve solunum güçlüğü saptandı. Otopside akciğer, hava keseleri ve karaciğerde içerisi kazeifiye olmuş 1 mm'den 15 mm'ye kadar varan yuvarlak granülomlar tespit edildi. Granülomlardan, kültürel yoklamalar sonucu *Aspergillus fumigatus* izole edildi.

Anahtar Sözcükler: Kaz, *Aspergillus fumigatus*, İzolasyon ve İdentifikasyon.

SUMMARY

In Kars province, from 3 different points totally 14 geese out of 206 had been died in the course of *Aspergillus* infection were determined. Dyspnea, anorexia, dropping wings, emaciation and death were inspected during clinical examination. At necropsy lesions were usually consist of small white caseous nodules (varying site from 1 mm to 15 mm diameter) in the lungs and livers and on the surface of air sacs. Samples collected from lesions were culturally examined on Saborhoud Dextrose Agar (SDA). As a result of cultural examination on SDA *Aspergillus fumigatus* isolated and identified.

Key Words: Goose, *Aspergillus fumigatus*, Isolation and Identification.

GİRİŞ

Mikroorganizmalar içerisinde büyük bir grup oluşturan mantarların çoğu saprofitik bir yaşantıya sahip olmalarına karşın az sayıda türü, evcil hayvanlarda ve insanlarda enfeksiyona neden olmaktadır(1-5). Genel olarak kanatlı hayvanlarda mantarlardan ileri gelen hastalıklar çok sık görülmekle beraber bir kaç türün neden olduğu mantar hastalıkları (*Aspergillozis*, *Moniliasis*, *Favus*) zaman zaman görülmekte ve ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır (3,6).

Kanatlı hayvanlarda mantarlardan ileri gelen enfeksiyonların başında aspergillozis gelmektedir (3,7-9). Kanatlı aspergillozisi evcil ve yabani her türlü kanatlıda görülebilen, özellikle gençlerde yüksek morbidite ve mortaliteyle birlikte akut ve subakut seyreden, başta solunum sistemi olmak üzere diğer doku ve organlara da yerleşebilen bir enfeksiyondur (4,6,7).

Kanatlılarda aspergillozise neden olan türlerin başında *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* gelmek-

tedir ve bunlar sıklıkla oportunist fungal enfeksiyon etkenleri arasında bildirilmektedir (7,10,11). *Aspergillus* cinsi içerisinde en patojen tür olan *Aspergillus fumigatus*, doğada çok yaygın olarak bulunmaktadır. Sporları doğal şartlara dayanıklıdır. Etkene, kokuşmuş ve çürümüş otlarda, toprakta, küflenmiş samanlarda, kötü konserve edilmiş un ve tane yemlerde, bulaşık yem, altlık ve kuluçkahanelerde rastlanılmaktadır (3,12,13). *A. fumigatus* genellikle inhalasyon yoluyla alınmakta, akciğerlere invaze olmakta ve en çok bu organda patolojik bozukluklara neden olmaktadır (12,14). Bazen etkenin kan yoluyla karaciğer, böbrek, kalp, dalak ve beyin gibi organlara da yayıldığı ve bu organlarda patolojik bozukluklar oluşturduğu bildirilmektedir (3,15-17).

Aspergillus fumigatus'un konidioforları 300 µm uzunlukta, 5-8 µm çapında düzgün duvarlı olup apekse doğru genişler ve erlenmayer şeklinde bir vezikülle sonlanır.

* Arş.Gör.Dr. KAÜ Vet. Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

** Doç.Dr. KAÜ Vet. Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

*** Arş.Gör. KAÜ Vet. Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

Veziküllerin çapı 20-30 µm olup mikroskopta gri-kahve renkte görülürler. Konidialar ise küre şeklinde ve 2-3 µm çapındadırlar. Sterigmatalar konidioforun eksenine paralel olarak girintili çıkıntılı şekilde dizilmiştir (1,12, 15,18).

Aspergillus fumigatus, Czabek Agar veya Saboraud Dextrose Agarda (SDA) 25 °C veya 37 °C'de 3-5 günlük inkübasyon sonunda kolaylıkla ürer (8,18). Bu besiyerinde üreyen koloniler ilk önce beyaz renkte olup kültür eskidikçe mavi yeşile dönüşür, daha sonra duman grisinden koyu gri renge kadar değişir (12,18). Kanatlılarda infeksiyon oluşturan *A. fumigatus*'un bir özelliği de termotolerant olmasıdır. *A. fumigatus* izolatları 45 °C ve üstü ısılarda üremesine karşın diğer *aspergillus* türleri bu ısıda üreyememektedir (13,14).

Yapılan literatür incelemelerinde kanatlılarda aspergillozis olgularına yurdumuzda çok sık rastlanmadığı tespit edilmiştir. Yurdumuzda kanatlılarda görülen ilk aspergillozis olgusu Başkaya ve ark. (18), tarafından bildirilmiştir. Araştırmacılar Ankara Orman Çiftliğinde 871 hindiden 192'sinin öldüğünü, ölen 23 hindide yapılan bakteriyolojik ve patolojik incelemeler sonucunda hastalık etkeninin *A. fumigatus* olduğunu tespit etmişlerdir. Yine İstanbul ve civarında piliçlerde (6) civciv ve güvercin yavrularında (13) aspergillozis olguları bildirilmiş ve bu olgulardan *A. fumigatus* izole ve identifiye edilmiş, izole edilen etkenin tavşan, kobay ve farelerde yapılan deneysel inokulasyonunda *A. fumigatus* olduğu teyit edilmiştir. Akan ve ark. (10), değişik yaşlardaki aspergillozis şüpheli bildircinlerden SDA'ya yapılan ekimlerde *A. fumigatus* izole etmişlerdir.

Kanatlı aspergillozisi ile ilgili olarak yurdumuzda olduğu gibi diğer ülkelerde de çeşitli araştırmalar yapılmıştır (8,15-17,19). Wang ve ark. (20), kaz ve ördek yetiştirilen bir çiftlikte gözlenen aspergillozis olgusundan dolayı, ördeklerde % 45 ve kazlarda % 5 ölüm olduğunu saptamışlar, epidemiyolojik, klinik bulgular, postmortem incelemeler ve laboratuvar yoklamaları sonucu infeksiyona *A. fumigatus*'un neden olduğunu bildirmişlerdir. Gupta ve ark. (11), 15 kanatlı çiftliğinde mikotik etkenlerle ilgili yaptıkları çalışmada 4 *A. flavus*, 3 *A. fumigatus*, 2 *A. niger* ve 1 *Alternaria* sp.

olmak üzere toplam 10 adet mantar türü izole ettiklerini belirtmişlerdir.

Türkiye'de yapılan literatür taramalarında kazlarda *A. fumigatus* infeksiyonu ile ilgili bir bilgiye rastlanılmamış ve dünyada da az rastlanan bir infeksiyon olduğu görülmüştür. Bu araştırmada Kars yöresinde ailesel düzeyde yetiştiriciliği yapılan kazlarda gözlenen aspergillozis infeksiyonunun varlığının bildirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Üç farklı odaktan Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na (6-10 haftalık 206 kaz palazı bulunan üç sürüden) getirilen 14 kaz palazı (6'sı ölü, 8'i canlı) çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

Metot

Mikroskopik Yoklama: Gerek canlı gerekse ölen hayvanların otopsilerinden sonra, akciğer, hava keseleri, karaciğer ve dalak gibi patolojik bozukluklar görülen organlardan alınan nodüller lam üzerinde iyice ezildi ve üzerine bir kaç damla laktofenol pamuk mavisli konup lamel kapatılarak mikroskopta (10x, 40x) incelendi. Ayrıca ezilen nodüllerden hazırlanan preparatlar asido rezistans bakteriler yönünden incelenmek üzere Ziehl-Neelsen boyama metoduyla da boyandı.

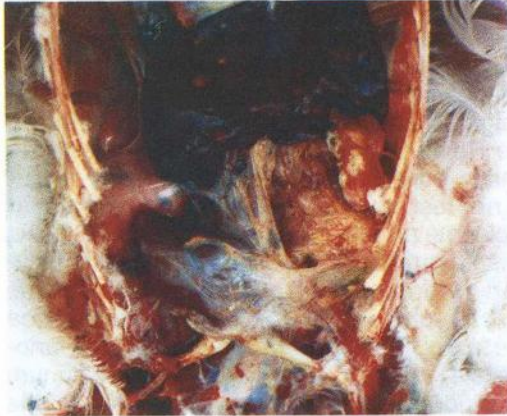
Kültürel Yoklama: Mikroskopik incelemeden sonra lezyonlu organlardan şapalama usulü ile Sabouraud Dextrose Agara (SDA) ekim yapıldı. Ekim yapılan petri kütuları 25°C'de inkübasyona bırakıldı. Üreme görülen kolonilerin mikroskopik ve makroskopik morfolojileri incelenerek subkültürleri yapıldı ve *A. fumigatus*'un termotolerant özelliğinden yararlanmak üzere 45 °C'de inkübasyona bırakıldı. Subkültürde saf olarak üreyen mantar kolonileri makroskopik ve mikroskopik morfolojileri yönünden detaylı olarak incelendi.

BULGULAR

Klinik Bulgular: Alınan anamnez ve canlı hayvanlarda yapılan sistemik muayeneye göre kaz palazlarında iştahsızlık,

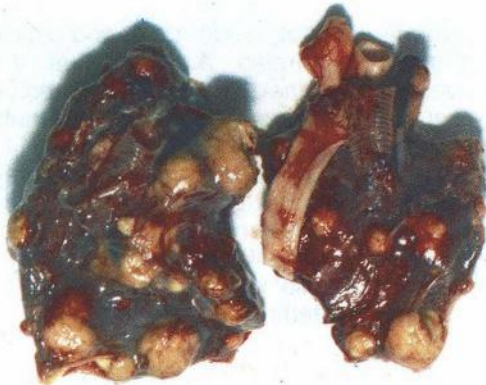
tüylerin kabarması, sürünün gerisinde kalma, hafif solunum güçlüğü, canlı ağırlık artışında azalma ile birlikte kaşeksi ve ölüm şekillendiği belirlendi. Edinilen bilgilere göre hastalığın subakut formda seyrettiği ve mortalitenin % 20 civarında olduğu tespit edildi.

Otopsi Bulguları: Ölen veya otopsi yapılan kazlarda başta akciğer ve hava keseleri olmak üzere karaciğer, böbrek ve dalakta çok sayıda nodüler tarzda krem renginde çapları 1 mm'den 10 mm'ye kadar varan ortaları kazeifiye olmuş kesit yüzü kuru yuvarlak granümlara rastlandı (Resim 1,2). Kazların gösterdikleri klinik



Resim 1. Otopsi yapılan bir kazın karaciğerinde granümlerin görünümü.

Figure 1. The view of the granulomas on the liver in a necropsied goose.



Resim 2. Akciğerde yuvarlak ve kesit yüzü kuru granümler.

Figure 2. Oval shaped and dry granulomas on the cutting surface of the lungs.

belirtiler, otopsi bulguları, buldukları ortamın nem ve ısı durumu ve yaşları da göz önüne alınarak aspergillozis infeksiyonundan şüphelenildi.

Makroskopik Bulgular: Lezyonlu organlardan alınan nodüllerden hazırlanan preparatlar laktofenol pamuk mavisi ile boyandıktan sonra mikroskop altında incelendiğinde bölmeli ve üniform tarzda miselyumlar görüldü. Ziehl-Neelsen metodunda herhangi bir asidorezistans bakterisi görülmedi.

Kültürel Yoklama Sonuçları: SDA'a akciğer, karaciğer ve hava keselerinden ekim yapılarak 25 °C'de 5 gün inkübe edildikten sonra üremeler görüldü. Üreyen koloniler önceleri beyaz renkte iken kültür eskidikçe mavi-yeşil renge ve daha sonra duman grimsinden, koyu griye kadar değişen pigmentasyon görüldü. Kolonilerin büyüklükleri kültürün yaşına göre 5 mm'den 20 mm büyüklüğüne kadar değişmekteydi. A. fumigatus 45°C ve daha yüksek ısılarda gelişen tek aspergillus türü olma özelliği taşımaktadır. İzole edilen kültürleri A. fumigatus'un termofilik özelliğinden yararlanılarak 2. kez SDA'a geçirilerek 45 °C'de 7 gün inkübe edildi. Inkübasyon süresi sonunda saf olarak aspergillus fumigatus kolonilerinin geliştiği gözlemlendi. SDA'da gelişen kolonilerden hazırlanan preparatlar laktofenol pamuk mavisi ile boyanarak mikroskopik morfolojileri incelendi. Mikroskopik incelemede konidioforlar düzgün duvarlı olup, apeksine doğru düzenli bir şekilde genişleyerek erlenmayer şeklinde bir vezikülle sonlandığı belirlendi. Vezikülün üst yarısında girintili çıkıntılı, birbirine paralel küçük şişe benzeri konidialar ve tek sıra halinde dizili sterigmatalar görüldü (Resim 3,4). Bu görüntüler A. fumigatus için karakteristikti.

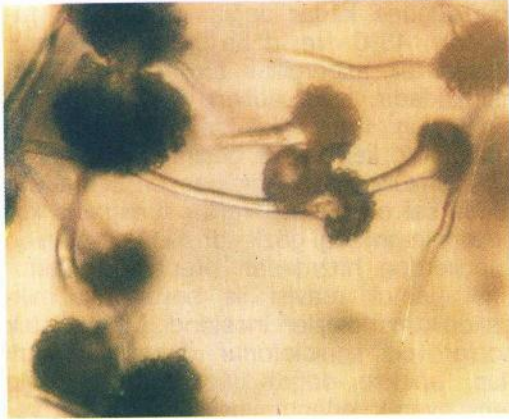
İzole edilen etken, yukarıda belirtilen kültürel ve mikroskopik özelliklere göre A. fumigatus olarak tanımlandı.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanatlı hayvanların önemli hastalıklarından biri olan aspergillozis Türkiye'de tavuk, hindi, güvercin ve bildircinlerde bildirilmesine rağmen, kazlarda bildirilmemiştir (4,6,10,13,18).



Resim 3. Bir haftalık kültürden hazırlanmış *A. fumigatus*'un vezikül ve konidialarının mikroskopik görünümü (400x).
Figure 3. The Microscopic view of vesicule and conidia of the *A. fumigatus* prepared from a week culture (400x).



Resim 4. SDA'da gelişen kolonilerden hazırlanmış bir preparatta *A. fumigatus*'un mikroskopik görünümü (200x).
Figure 2. The microscobic view of *A. fumigatus* prepared from growing up colonies on the SDA (200x).

Aspergillozis sporları hemen hemen her yerde bulunur ve bulaşma sporların inhalasyonu ile olmaktadır. Bu nedenle enfeksiyondan ilk olarak solunum sistemi, özellikle de akciğer ve hava keseleri etkilenmektedir. *A. fumigatus* bazen kanatlıların solunum sistemi enfeksiyonlarında primer etken olarak tespit edilmiştir (5, 9,11,17).

Kanatlı aspergillozisi ile ilgili olarak yurdumuzda (4,6,10,18,21) ve gerekse yurt dışında (5,8,9,11,19) değerli araştırmalar yapılmıştır. Minbay ve ark. (21), Ankara'nın Beypazarı ilçesinde bulunan 3000 kapasiteli piliç sürüsünde gözlenen akut aspergillozis salgınında mortalitenin % 20 oranında olduğunu bildirmişlerdir. Ölen piliçlerin yapılan otopsisinde lezyonların en çok akciğerlerde, daha az olarak da karaciğer, böbrek, dalak, bezli mide, bursa fabricius ve myokard'da görüldüğünü belirtmişlerdir. Erer ve ark. (4), Konya ilinde 3,5 aylık 1500 adet Hisex piliç bulunan bir kümeste % 30 oranında ölüm görülmesi üzerine yaptıkları araştırmada otopsi yapılan 7 adet piliçte akciğer, karaciğer, göğüs duvarı, abdominal serozada granülomlara rastlandığını belirtmişler ve bu olgulardan alınan numunelerin SDA'a ekimi yapılarak *A. fumigatus* izole edildiğini bildirmişlerdir. Board ve Rojas (19), Küba'nın farklı bölgelerinden temin edilen 2474 kaza ait organ ve dokuların teşhis amacıyla yapılan laboratuvar yoklamalarında % 11.6 oranında mycosis tespit etmişlerdir. Araştırmacılar mycosis olayları içinde ise % 12.2 oranında *A. fumigatus* enfeksiyonu olduğunu belirtmişlerdir. Ulua ve ark (17), Şili'de yaban kazlarında anoreksia, sürekli kilo kaybı, hafif solunum güçlüğü belirtileri ile seyreden ve ölümle sonuçlanan bir hastalık saptadıklarını ve bu kazların hava keselerinden aldıkları ek-sudattan *A. fumigatus* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar çok kötü hava şartlarının enfeksiyon için predispoze faktör olduğunu vurgulamışlardır.

Kazlarda ve diğer kanatlı türlerinde çeşitli araştırmacılar tarafından *A. fumigatus* enfeksiyonunda iştahsızlık, kilo kaybı, solunum güçlüğü, tüylerin kabarması, sürünün gerisinde kalma gibi klinik bulgular (4, 11,16) ve en çok akciğer ve hava keselerinde olmak üzere, bazan de karaciğer, dalak ve beyine kadar yayılan, sarı beyaz renkte kuru ve organların yüzeyinden hafif çıkıntılı nodüller ile karakterize otopsi bulguları bildirilmektedir (4,6,9,16).

Bu çalışmada da Anabilim dalımıza getirilen 6'sı ölü, 8'i canlı toplam 14 kazın klinik yoklamalarında kilo kaybı, iştahsızlık, solunum güçlüğü semptomları saptandı. Daha sonra da hayvanların otopsilerinde akciğer ve hava keseleri başta olmak

üzere, karaciğer, dalak ve böbreklerde beyaz, krem renginde granülatöz tarzda nodüller gözlemlendi. İnfekte hayvanlardan alınan nodüllerin mikroskopik ve kültürel yoklamaları yapıldı. Mikroskopik yoklamalarda septumlu ve üniform tarzda miselyumlar görüldü. Kültürel yoklamalarda ise SDA'da gelişen koloniler önce beyaz renkte iken kültür eskidikçe koyu gri renkte pigmentasyon oluştuğu belirlendi. SDA'da üreyen kolonilerin mikroskopik incelemesinde ise konidioforların düzgün duvarlı olması ve vezikülün erlenmayer şeklinde olması ve vezikülün üst kısmında sterigmataların tek sıra halinde dizilmesi özelliklerinden yararlanılarak *A. fumigatus* olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada hayvanlarda gözlenen klinik ve otopsi bulguları ile infekte dokulardan izole edilen etkenin, kültürel özellikleri incelendiğinde diğer araştırmacıların (4,10,17,21) elde ettiği sonuçlarla paralel olduğu belirlendi.

Sonuç olarak aspergillozis genç kanatlıların çok önemli ekonomik bir hastalığıdır. Bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez kazlardan *A. fumigatus* izole edilmektedir. Aspergillus enfeksiyonunu önlemek için, kümeslerin iyi havalandırılması, hijyenik şartların ve uygun ısının sağlanması gerekmektedir. Enfeksiyon çıkan odalarda hayvanlar kesime gönderilmeli ve barınaklar antifungal ilaçlarla dezenfekte edilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Arda, M.: Mikoloji. AÜ Vet. Fak. Yay. No: 336, 185-191, AÜ Basımevi, Ankara, 1980.
2. Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M.: Kanatlı Hayvan Hastalıkları. Pfizer İlaçları A.Ş., 178, İstanbul, 1990.
3. Demiröz, K., İstanbulluoğlu, E.: Mikotik Enfeksiyonlar. Kanatlı Hayvanların Enfeksiyöz Hastalıkları ve Laboratuvar Teşhis Yöntemleri. Ed. Güven, D., Sarısayın, F., Nadas, Ü.G., Demiröz, K., 152-162, Pendik Vet. Tont. Araş. Enst. Yay. No:7, Milli Eğitim Basımevi, İstanbul, 1983.
4. Erer, H., Sezen, İ.Y., Erganiş, O.: Piliçlerde aspergillozis olayı üzerinde incelemeler. SÜ Vet. Fak. Derg. 2(1): 171-179, 1986.
5. Okoye, J.O.A., Guynani, H.C., Okeke, C.N.: Pulmoner infestions due to *Aspergillus flavus* in Turkey poult and goslings. *Mycoses*, 32(7): 340-344, 1989.
6. Merdivenci, A.: İstanbul dolaylarında aspergillozis olguları ve bazı deneyler. *Türk Vet. Hek. Dern. Derg.*, 41(2):26-29, 1971.
7. Barman, N. N., Sharma, R. K., Chakraborty, A., Saikia, G.K., Boro, B.R.: Bacterial and fungal flora of zoo birds. *Indian J. Anim. Sci.*, 64(3):266-269, 1994.
8. Boado, E., Fonseca, C., Toledor, R.: *Aspergillus* in geese (*A. anser*) caused by *Aspergillus flavus* case report *Revta. cu. Eienc. Avicola*, 14(1):85-92, 1987.
9. Gab-Allah, M.S.A.: Pathological studies on mycotic (*Aspergillus fumigatus*) infection ducks. *Egypt. J. Comp. Pathol. Clin. Pathol.* 6(1): 135-146, 1993.
10. Akan, M., Atasever, A., Yardımcı, H.: Bıldırcınlarda aspergillozis. I. Uluslararası Vet. Mikrobiyol. Kong., 25-27 Eylül 1996, İÜ Vet. Fak. Kong. Özet Kitabı, İst., Türkiye, 184, 1996.
11. Gupta, R.P., Verma, S.P., Sınha, B.K.: Prevalance of toxigenic fungi in the poultry farm environment *Indian. J. Comp. Microbiol., Infect. Dis.* 15(3/4): 48-49, 1994.
12. Collins, C.H., Patrica, M.L., Grance, J.M.: Collins and Lyne's Microbiological Methods. 6th Hartnolls Ltd. Bodmin, 381-390, 1989.
13. Merdivenci, A., Zehavi, H.: Cıvcivlerde ve güvercin yavrularında aspergillozis olguları üzerine araştırmalar. *İÜ Vet. Fak. Derg.*, 2(1): 85-99, 1976.
14. Rhodes, J.C., Kwon, C.K.J.: *Hypomyces*. In: Evans, E.G.V., Richardson, M.D., *Medical Mycology*, Oxford Univ. Press. Oxford. 159-165, 1989.
15. Mortellaro, C.M., Franca, P.D., Carretta, G.: *Aspergillus fumigatus* the causative agent of infection on the frontal sinuses and nasal chambers of the dog. *Mycoses*, 32(7): 336-339, 1995.
16. Kaleta, E.F.: New knowledges of infectious diseases in geese. *Arch. Ge flügelk.*, 59(4): 250-254, 1995.
17. Uluoa, J., Cubillos, V., Montecnos, M.I., Alberdi, A.: Aspergillozis in the wild goose in Chile., *J. Vet. Med. B.* 34(1): 30-35, 1987.
18. Başkaya, H., Urman, H.K., Beşe, M.: Ankara Orman Çiftliği'nin yetişkin hindilerinde aspergillozis olayları. *Türk Vet. Hek. Dern. Derg.*, 76-77, 539-552, 1953.
19. Boado, E., Rojas, G.: Diagnosis and pathological study of goose disease. I., *Rev. Cubana de Ciecía Avicola.*, 17(1): 19-25, 1993.
20. Jang, Q.M.: Diagnosis and treatment of aspergillozis in ducklings and goslings. *Chinese. J. Vet. Med.*, 19(1):28., 1993.
21. Minbay, A., Akay, Ö.: Piliçlerde akut seyirli bir aspergillozis salgını üzerine araştırmalar. *AÜ Vet. Fak. Derg.* 28(1): 43-52, 1981.