

Hatay Yöresinde Kesimhanede Kesilen Sığır Akciğerlerinden *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* İzolasyonu ve Antibiyotiklere Duyarlılığı *

Hakan ÜLKER¹, Dilan KÜÇÜK¹, Zafer CANTEKİN², Hasan SOLMAZ²

¹ Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hatay, Türkiye

² Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji ABD, Hatay, Türkiye

Geliş tarihi/Received: 11.9.2012, Kabul Tarihi/Accepted: 24.10.2012

Özet

Bu çalışmada, sığır akciğer örneklerinden *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* izolasyonu ve bu izolatların antibiyotiklere karşı duyarlılıkları belirlendi. Bu amaçla, Antakya'da (Hatay) kesimhanede kesilen sığırlardan alınan akciğerlerde bakteriyolojik incelemeler yapıldı. İzole edilen etkenlerin identifikasyonu PZR ile teyit edildi ve identifiye edilen kültürlerin çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları araştırıldı. Çalışmada, 122 akciğer örneğinden 3 (%2.45) adet *P. multocida* izole edildi, ancak *M. haemolytica* ise izole edilmedi. İzole edilen *P. multocida* suşları amoksisilin, amoksisilin + klavulanik asit, trimetoprim + sulfametoksazol, enrofloksasin ve penisilin-G'ye %100, eritromisin, oksitetrasiklin ve gentamisine de %66 oranında duyarlı bulundu. Çalışma kapsamında lisans öğrencilerinin akademik bilgi ve becerilerinin gelişmesine katkı sağlandı.

Anahtar Kelimeler: Akciğer, Antibiyotik Duyarlılığı, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*

Isolation of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* from Slaughtered Bovine Lung in Hatay Region and Detection of Their Antibiotic Susceptibilities

Abstract

In this study *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* were isolated from cattle lung samples and their susceptibilities were detected to some antibiotics. These bacteria were isolated and identified from slaughtered cow's lung in Hatay Region. The identification of microorganisms was confirmed by PCR. Antibiotic susceptibilities of identified organisms were determined against different antibiotic groups. In the study, *P. multocida* were isolated from 3 (2.45%) of 122 Lung samples, but *M. haemolytica* was not isolated. The susceptibilities to antibiotics for *P. multocida* were as follow: 100% to amoxycillin, amoxicillin+clavulonic acid, trimethoprim+sulphamethoxazole, enrofloxacin and penicillin-G; 66% to erythromycin, oxytetracyclin and gentamycin. Isolation rate and detection of antibiotic susceptibility of these organisms will provide useful knowledge for treatment of disease. And also, this Project attribute to academic knowledge and skills of students in this project.

Key Words: Lung, Antibiotic Susceptibilities, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*

Giriş

Solunum sistemi hastalıkları sığır, koyun ve keçi gibi hayvanlarda sıklıkla görülmekte, ülkemizde ve dünya önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. *Pasteurellaceae* familyasının çoğu üyesi memeli hayvanlar ve kanatlı hayvanlarda üst solunum yolu ve alt genital kanal mukozasının normal florasında bulunurlar ve fırsatçı patojenler olarak bilinirler. *P. multocida* hayvanlarda major patojenler arasında gösterilirken, *M. haemolytica* potansiyel hayvan patojeni olarak gösterilmiştir (2, 5). *P. multocida*'nın sığırlarda hemorajik septisemi, pnömoni, meningoenfalelitis ve mastitis (20),

domuzlarda atrofik rinit ve pnömoni, koyunlarda pnömoni ve laboratuvar hayvanlarında da benzer enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir (1, 2, 3). *M. haemolytica*'nın ise koyun ve kuzularda pnömoni ve septisemilere, sığırlarda ise pnömonilere neden olduğu belirlenmiştir (1, 7). *P. multocida* ve *M. haemolytica*'ya bağlı oluşan enfeksiyonlar sporadik olarak seyredebileceği gibi, koyunlarda salgınlar rapor edilmiştir (1, 15).

Pastörella enfeksiyonlarının tanısı, klinik bulgular ve mikroorganizmanın izolasyonuna dayanır. Hastalığın etkeni olan mikroorganizmanın izolasyonu antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için de gereklidir

* Bu çalışma 2011 yılında TÜBİTAK 2209 kodlu Üniversite öğrencileri yurt içi / yurt dışı araştırma projeleri destekleme programı kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Yazışma adresi/Correspondance: Sorumlu yazar: Zafer CANTEKİN, Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji ABD, Hatay, Türkiye, E-mail: E-mail: zcantekin@hotmail.com

(19). Ancak klasik kültür metodunun zaman alması ve etkenin kesin identifikasyonu amacıyla hayvan deneylerine ihtiyaç duyulması nedeniyle hızlı ve güvenilir bir teknik olarak identifikasyona yardımcı olması amacıyla moleküler yöntemlerin de kullanımı önerilmiştir (23). Çeşitli çalışmalarda bu tekniklerin hem izole edilen etkenlerin teyidinde hem de direkt klinik materyallerde başarıyla kullanıldığı bildirilmiştir (6, 12, 17).

Çiftlik hayvanlarında sıklıkla hastalık yapmalarına ve önemli düzeyde ekonomik kayıplara yol açmalarına rağmen Hatay Yöresinde konuyla ilgili olarak yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma ile kesimhane de kesilen sığırların pnömni belirtili akciğer örneklerinden *P. multocida* ve *M. haemolytica* izolasyonları yapılması ve izole edilen bu etkenlerin çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada Antakya ilinde bulunan özel bir işletmeye ait kesimhane haftalık olarak ziyaret edilerek toplam 122 adet pnömni belirtili sığır akciğer örneği toplandı. Akciğerler soğuk zincirde Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirildi. Akciğer örneklerinden bakteriyolojik kültür amacıyla %7 koyun kanı katılarak zenginleştirilmiş Kanlı Agar'a ekimler yapıldı. Besiyerleri 37°C'de aerobik ortamda 24-48 saat süre ile inkübe edildi. Kanlı Agarda üreyen bakterilerin koloni morfolojileri, hemoliz özellikleri, Gram boyama, oksidaz, katalaz, indol ve Mac Conkey Agarda üreme gibi özellikleri incelenerek standart metotlara göre identifikasyonları yapıldı (19, 11).

Konvansiyonel biyokimyasal testler kullanılarak identifiye edilen bu etkenlerin teyidi amacıyla kaynatma yöntemi kullanılarak etkenlerden DNA ekstraksiyonu yapıldı. Bu amaçla, Triptic Soy Agar'da inkübe edilen 24 saatlik kültürlerden 1-2 koloni öze yardımıyla alınıp 100 µl steril distile suda süspansiyon edildi. Bakteri süspansiyonu içeren 200 µl'lik plastik tüpler Thermal cyclers (Techne Genius TC 312) içine yerleştirildi. Bu şekilde 99°C'de 10 dakika tutularak 1 siklus tamamlatıldı. Daha sonra ise 1000 devirde 2 dakika santrifüj edilip analizde kullanılacak DNA kalıbı elde edildi. Bu solüsyondan 5µl alınarak PZR karışımında kalıp DNA olarak kullanıldı (13).

İzolasyonu ve identifikasyonu yapılan etkenlerin teyidi amacıyla PZR işlemi yapıldı. *Pasteurella multocida* için Townsend ve ark. (22) tarafından uygulanan protokolle KMT-1SP6 5'- ATC CCG CTA TTT ACC CAG TGC -3' ve KMT1T1 5'- GCT GTA AAC GAA

CTC GCC AC -3' primerleri kullanılarak, *Mannheimia haemolytica* için ise Ryan ve Lo (21) tarafından önerilen protokole göre Rpt2 5'- GTT TGT AAG ATA TCC CAT TT-3' ve Rpt2 rev 5'- CGT TTT CCA CTT GCG TGA-3' primerleri kullanılarak PZR karışımları hazırlandı (Tablo 1).

Tablo 1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Karışımlar

Karışım bileşenleri	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>
10XPZR Buffer	2.5 µl	2.5 µl
dNTP karışımı	0.5 µl	0.5 µl
Primer F	0.2 µl	0.2 µl
Primer R	0.2 µl	0.2 µl
MgCl ₂	2 µl	2 µl
Taq polimeraz	0.2 µl	0.2 µl
Distile Su	14.4 µl	14.4 µl
Template DNA	5 µl	5 µl
TOPLAM	25 µl	25 µl
Amplifikasyon Ürünü(bp)	460 bp	1022 bp

Amplifikasyon işlemi araştırmacılar (21, 22) tarafından önerilen prosedüre göre gerçekleştirildi (Tablo 2).

Tablo2. PZR Amplifikasyon Koşulları

Amplifikasyon koşulları	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>
Ön Denatürasyon	95°C'de 5 dakika	95°C'de 5 dakika
Denatürasyon	94°C'de 30 saniye	94°C'de 1 dakika
Bağlanma	55°C'de 30 saniye	48°C'de 1 dakika
Uzama	72°C'de 30 saniye	72°C'de 30 saniye
Siklus Sayısı	30 siklus	30 siklus
Son uzama	72°C'de 5 dakika	72°C'de 5 dakika

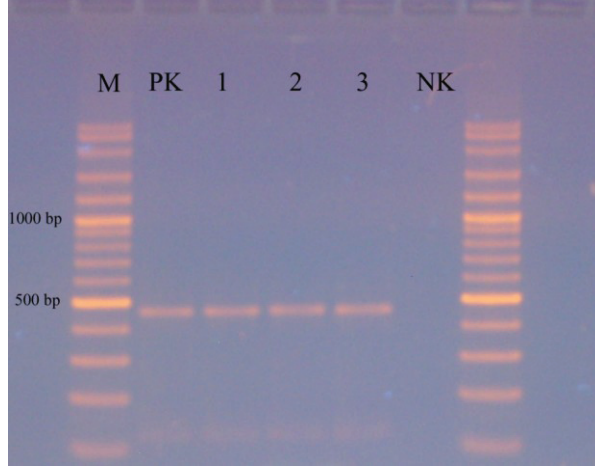
Yapılan amplifikasyon işleminden sonra PZR ürünlerinin değerlendirilmesi amacıyla %1.5'lik Agaroz jel kullanıldı. Yüklenen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde 180 V'da 60 dakika boyunca koşturuldu. Çıkan sonuçlar ultraviyole ışık altında incelenerek fotoğrafları çekildi. Değerlendirmede, marker (Vivantis, 100 bp plus) kullanıldı. *P. multocida* için 460 bp'lik, *M. haemolytica* için ise 1022 bp'lik bandlar araştırıldı.

İzole edilen etkenlerin antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemi kullanılarak yapıldı (4). Buna göre, bir gece 37°C'de Nutrient Buyyonda üretilen suşlardan 0.1 ml Mueller-Hinton Agara yayma tarzında ekilerek, üzerlerine gentamisin (CN-10mcg), eritromisin (E-15 mcg), trimetoprim/sulfametoksazol (STX-25 mcg), enrofloksasin (ENR-5 mcg), amoksisilin (AML-10 mcg), oksitetrasiklin (T-30), amoksisilin/klavulanik asit (AMC-30 mcg), penisilin-G (P-10 mcg) ve doksisisiklin (DO-30 mcg) antibiyotik diskleri yerleştirildi. Besi yerleri 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra etkenlerin bu antibiyotiklere

duyarlılık/dirençlilikleri antibiyotik diskleri etrafında oluşan inhibisyon zonların çapları ölçülerek değerlendirildi (14).

Bulgular

Çalışmada, 122 akciğer örneğinden 3 (% 2,45) *P. multocida* izole ve identifiye edildi, ancak örneklerin hiç birinden *M. haemolytica* izole edilmedi. İzole edilen *P. multocida* suşlarının identifikasyonları spesifik primerler kullanılarak PZR analizi ile teyit edildi (Resim 1).



Resim 1: M: VC 100bp Plus DNA Ladder , PK: *P. multocida* Pozitif Kontrol, 1, 2, 3: *P. multocida* olarak identifiye edilen örneklere ait bandlar, NK: Negatif

P. multocida izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları amoksisilin, amoksisilin+klavulanik asit, trimetoprim+sulfametoksazol, doksisisiklin, enrofloksasin ve penisilin-G'ye %100, eritromisin, oksitetrasiklin ve gentamisin'e %66 olarak belirlendi (Tablo 3).

Tablo 3. *P. multocida* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları

Antibiyotik	R (%)	İ (%)	S (%)
CN	33	-	66
E	33	-	66
SXT	-	-	100
ENR	-	-	100
AML	-	-	100
OT	33	-	66
AMC	-	-	100
P	-	-	100
DO	-	-	100

(R; Dirençli, S; Duyarlı, İ; Orta derecede duyarlı, CN (Gentamisin-10 mcg), E (Eritromisin-15 mcg), STX (Trimetoprim/Sulfametoksazol-25 mcg), ENR (Enrofloksasin-5 mcg), AML (Amoksisilin-10 mcg), OT (Oksitetrasiklin-30 mcg), AMC (Amoksisilin/Klavulanik asit-30 mcg), P (Penisilin-G -10 mcg), DO (Doksisisiklin -30 mcg)

Tartışma ve Sonuç

Pasteurellaceae familyasında yer alan *P. multocida* ve *M. haemolytica*, hayvanların üst solunum kanalı mukozasının mikrobiyal flora üyeleridirler. Ancak çevresel stres faktörleri ve çeşitli mikroorganizmalar tarafından oluşturulan infeksiyon durumlarında fırsatçı patojenler olarak hastalık yaparlar ve şartlara bağlı olarak şiddetli hastalık tablolarına ve salgınlara neden olabilirler. Oluşturdukları bireysel veya sürü bazında hastalık tabloları ile önemli ekonomik kayıplara neden olurlar. Hastalıkların tedavisinde bilinçsiz antibiyotik kullanımının fazla olmasına bağlı olarak son yıllarda artan oranda antibiyotik direnç sorunu ile karşılaşmaktadır (9, 12, 16, 22). Antibiyotiklere karşı direnç gelişimi nedeniyle tedavi güçleşmekte, tedavi süresi uzamakta ve oluşan ekonomik kaybın boyutu artmaktadır. Bu çalışmada kesimhaneden alınan pnömoni belirtili sığır akciğer örneklerinden yapılan bakteriyolojik incelemeler ile 122 adet örneğin 3'ünden (% 2.45) *P. multocida* izole edildi, ancak örneklerin hiç birinden *M. haemolytica* izole edilmedi. İzole edilen *P. multocida* suşlarının identifikasyonları spesifik primerler kullanılarak PZR analizi ile teyit edildi.

Gürbüz ve Şahin (9) yaptıkları çalışmada 125 adet sığır akciğer örneğinin 32'sinden (%26) *M. haemolytica* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Öztürk ve Çorlu (18) 150 adet koyun akciğer örneğinin 15'inden (%10) *M. haemolytica* ve 2'sinden (%1.33) *P. multocida* izole ettiklerini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar izole ettikleri suşlarda amoksisilin+klavulanik asit'e, enrofloksasin'e ve florfenikol'e %100 oranında duyarlılık saptadıklarını ve bunun ardından ampisilin'e, danofloksasin'e ve furazolidon'a %94.11 düzeyinde ve oksitetrasiklin'e %88.23 oranında izolatları duyarlı bulduklarını bildirmişlerdir. Önat ve ark (16), ise 47 adet Holstein ırkı sığırdan aldıkları burun svab örneklerinden 5 (%10.63) adet *M. haemolytica*, 27 (%57.44) adet *P. multocida* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmada izole ettikleri *Pasteurella multocida* izolatlarının florfenikol'e %100, enrofloksasin'e %85.1, sulfametoksazol/trimetoprim'e %80, eritromisin'e (%92.6) ve ampisilin'e %80 oranında duyarlı olduklarını belirlemişlerdir.

Kaoud ve ark (10), Mısırdaki sığır akciğer örneklerinde yaptıkları çalışmada *M. haemolytica*'yı %3.6 oranında izole ettiklerini bildirmişlerdir. Gabinatiene ve ark (8), *Mycoplasma bovis* infeksiyonu bulunan sığırların %5.7'sinde *P. multocida* ve %2.9'unda *M. haemolytica* izole ettiklerini rapor etmişlerdir. Kumar ve ark (12) ise 38 adet sığır orjinli, 34 adet manda orjinli ve 28 adet koyun orjinli olmak üzere toplam 100 adet *P. multocida* izolatu ve 17 farklı antibiyotik kullanarak yaptıkları çalışmada %94 duyarlılık oranı ile etkin antibiyotiğin enrofloksasin olduğunu ve bunu %93 ile ofloksasin, %93 ile kloramfenikol, %89 ile doksisisiklin, %86 ile tetrasiklin ve %84'lük duyarlılık oranıyla ciprofloksasinin takip ettiğini bildirmişlerdir.

Yapılan bu çalışmada *M. haemolytica* izolasyonu olmazken, 122 adet örneğin 3'ünden (%2.45) *P. multocida* izole edilmiştir. Elde edilen bu izolasyon oranları diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında düşüktür. Bu durum bölgesel farklılıklardan kaynaklanabileceği gibi özellikle iklim olanaklarına da bağlı olarak Hatay'da yarı açık besiciliğin yaygın yapılmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ayrıca Hatay'da sığır kesiminin yaygın olarak mahalli kasaplarda yapılmasından dolayı kesimhanede hayvan kesiminin nispeten az olması materyal elde edilmesinde güçlüklereden neden olmuştur.

Bu çalışmada izole edilen *P. multocida* izolatlarında çeşitli antibiyotik gruplarını içeren diskler ile yapılan antibiyotik duyarlılık testleri ile diğer çalışmalarla benzer bir şekilde enrofloksasin başta olmak üzere kinolon grubu, amoksisilin+klavulanik asit başta olmak üzere penisilin grubu antibiyotiklere karşı yüksek oranda duyarlılık belirlenmiştir.

Alınan örneklerden etken izolasyonu amacıyla kullanılan klasik kültür yöntemi ile PZR sonucu alınan sonuçlar birbirini teyit etti. Bu sonuçlar direkt etkene yönelik incelemelerde klasik yöntemlere alternatif olarak PZR'nin de kullanılabileceğini göstermektedir. Proje kapsamında ayrıca lisans öğrencilerinin akademik bilgi ve becerilerinin gelişmesine katkı sağlandı.

Kaynaklar

- 1) **Adlam C, Rutter JM, (1989).** Pasteurella and Pasteurellosis, Academic Press Inc, NewYork.
- 2) **Aydın N, Paracıkoğlu J, (2006).** Veteriner Mikrobiyoloji, İlke-Emek Yayınları, Ankara.
- 3) **Barnum DA, (1954).** A Herd Outbreak of Mastitis Caused by Pasteurella Multocida, *Can J Comp Med Vet Sci.* 18(4): 113–119.
- 4) **Bauer AU, Kirby WM, Sherris JC, Tack M, (1966).** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method, *J Clin Pathol.* 45: 493-494.
- 5) **Bisgard, M, (1993).** Ecology and significance of Pasteurellaceae in animals. *Zbl Bakt.* 279:7-26.
- 6) **Deressa, A., Asfaw, Y., Lubke, B., Kyule, M. W., Tefera, G., and Zessin, K.-H., (2010).** Molecular detection of Pasteurella multocida and Mannheimia haemolytica in sheep respiratory infections in Ethiopia. *International journal of applied research in veterinary medicine.* 8 (2): 101-108.
- 7) **Frank GH (1986).** The role of *Pasteurella haemolytica* in the bovine respiratory disease complex, *Vet Med.* 12: 841-846.
- 8) **Gabinaitiene A, Siugzdaite J, Zilinskas H, Siugzda R, Petkevicius S, (2011).** *Mycoplasma*

bovis and bacterial pathogens in the bovine respiratory tract. *Veterinari Medicina.* 56 (1): 28–34.

- 9) **Gürbüz A ve Şahin M, (2003)** Sığır ve Koyunlara ait Pnömonili Akciğerlerden Pasteurella Haemolytica'nın İzolasyonu, İdentifikasyonu, Biyotiplendirilmesi ve Antibiyotiklere Olan Duyarlılıklarının Belirlenmesi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 9(2): 169-175.
- 10) **Kaoud H, El-Dahshan AR, Zaki MM, Nasr SA, (2010)** Occurrence of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* Among Ruminants in Egypt. *New York Science Journal.* 3(5): 135-141.
- 11) **Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, (1997)** Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, fifth edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 12) **Kumar P, Singh VP, Agrawal RK and Singh S, (2009)** Identification of Pasteurella multocida isolates of ruminant origin using polymerase chain reaction and their antibiogram study. *Trop Anim Health Prod.* 41:573-578.
- 13) **Lench N, Stainer P, Williamson R, (1988)** Simple non-invasive method to obtain DNA for gene analysis. *Lancet* 1988;i:1356-8.
- 14) **NCCLS (2003).** National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighth Edition, *NCCLS document M2-A8Volume 23 No 1.*
- 15) **Odugbo MO, Odama LE, Umoh JU, Lamorde AG, (2006).** *Pasteurella multocida* pneumonic infection in sheep: Prevalence, clinical and pathological studies. *Small Rum Res.* 66: 273–277.
- 16) **Önat K, Kahya S ve Çarlı KT, (2010).** Frequency and antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* isolates from nasal cavities of cattle. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 34(1): 91-94.
- 17) **Özbey G, Muz A, (2004).** *Pnömonili Koyun ve Keçilerin Akciğerlerinden Aerobik Bakteri İzolasyonları ve İzole Pasteurella multocida ve Mannheimia haemolytica'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Saptanması.* *Turk J Vet Anim Sci.* 28: 209-216.
- 18) **Öztürk D ve Çorlu M, (2006).** *Pnömonili Koyun Akciğerlerinden İzole Edilen Bakteriler ve Antibiyotik Duyarlılıkları.* *Vet. Bil. Derg.* 22(1-2): 59-63.
- 19) **Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR, (1999).** *Clinical Veterinary Microbiology.* Wolfe Publication, London, UK.
- 20) **Radostits OM, Blood DC, Gay CC, (1994).** *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses,* 9 th edition, Saunders (W.B.) Co Ltd, London.
- 21) **Ryan KA, Lo RYC, (1999).** Characterization of a CACAG pentanucleotide repeat in Pasteurella haemolytica and its possible role in modulation of a novel type III

restriction-modification system. *Nucl. Acids Res.* 27(6): 1505-1511.

22) **Townsend KM, Frosta J, Lee CW, Papadimitriou JM, Dawkins HJS, (1998).** Development of PCR assays for species-and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36(4): 1096-1100.

23) **Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ and Adler B, (2001).** Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J Clin Microbiol.* 39: 924-929.