

Isolation, Identification and Antibiotic Sensitivity of *Pasteurella* Species in Cattle Slaughtered in Slaughterhouses in Kütahya Province

Seydi Mehmet ARSLAN^{1*}, Beytullah KENAR²

¹Kütahya Provincial Directorate of Agriculture and Forestry, Kütahya, Türkiye

²Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarabısar, Türkiye

ABSTRACT

In this study, it was aimed to isolate and identify *Pasteurella* species, which is one of the most important bacterial agents that cause bovine pneumonia, and to determine their antibiotic susceptibility as the most accurate approach in treatment. For this purpose, 210 lung samples were taken from cattle slaughtered in slaughterhouses in Kütahya. Sowing was performed on blood agar, Eosin methylene blue agar and MacConkey agar from the samples and 89 (42%) Gram negative bacteria were isolated. 17 bacteria showing the characteristics of *Pasteurella* species were identified in the automated Vitek 2 device. As a result of the identification, two (0.95%) isolates were found to be *Pasteurella multocida*. Antibiotic susceptibility of the isolates was investigated using the Kirby-Bauer disk diffusion test. It was observed that the isolates were 100% sensitive to amoxicillin clavulanic acid, enrofloxacin, ciprofloxacin and ceftiofur, 50% sensitive to danofloxacin, 50% sensitive at increased dosage, and 100% resistant to sulfamethoxazole-trimethoprim and tetracycline.

Keywords: Antibiotic sensitivity test, cattle, *Pasteurella* species, slaughterhouse

Kütahya İlindeki Mezbahalarda Kesilen Sığırlarda *Pasteurella* Türlerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılığı

ÖZ

Yapılan bu çalışmada sığır pnömonilerine sebep olan en önemli bakteriyel etkenlerden biri olan *Pasteurella* türlerini izole ve tanımlayarak tedavide en doğru yaklaşım olarak antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek amaçlanmıştır. Bu amaçla Kütahya ilindeki mezbahalarda kesilen sığırlardan 210 akciğer örneği alındı. Örneklerden kanlı agar, Eosin methylene blue agar ve MacConkey agara ekimler gerçekleştirildi ve 89 (%42) Gram negatif bakteri izole edildi. *Pasteurella* türlerinin özelliklerini gösteren 17 bakteri otomatize Vitek 2 cihazında tanımlandı. İdentifikasyon sonucu iki (%0,95) izolatın *Pasteurella multocida* olduğu tespit edildi. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon testi kullanılarak araştırıldı. İzolatların amoksisilin klavulanik asit, enrofloksasin, siprofloksasin ve seftiofura %100 oranında duyarlı, danofloksasine ise %50 duyarlı %50 artırılmış dozajda duyarlı olduğu gözlemlenirken, sülfametaksazol-trimetoprim ve tetrasikline %100 oranında dirençli olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik duyarlılık testi, kesimhane, *Pasteurella* türleri, sığır

To cite this article: Arslan S.M, Kenar B. Isolation, Identification and Antibiotic Sensitivity of *Pasteurella* Species in Cattle Slaughtered in Slaughterhouses in Kütahya Province. Kocatepe Vet J. (2023):16(2):127-130

Submission: 01.09.2022 Accepted: 20.03.2023 Published Online: 06.04.2023

ORCID ID; SMA: 0000-0001-5532-1862, BK: 0000-0001-6573-680X

*Corresponding author e-mail: seydimehmetarslan@gmail.com

GİRİŞ

Pasteurella multocida çoğunlukla sığırların solunum sistemlerinden izole edilen, sığırlarda plöropnömoni ve bronkopnömoniyeye, sığır ve mandalarda septisemik pasteurellozis ve hemorajik septisemiye sebep olan bir etkindir (Bain ve ark., 1982). Hastalık Sığır Pastörollozu (Shipping fever) olarak bilinmektedir (Okay ve ark., 2011). Bu enfeksiyon Dünya ekonomisine önemli kayıplar vermektedir (Lax ve Chanter, 1990). Dünyanın birçok ülkesinde gözlemlenmenin yanı sıra oldukça geniş bir konakçı çeşidini içinde barındıran sığır pastörellozu, hastalığa etki ettiği düşünülen etkenlerin, hasta olmayan hayvanların üst solunum yolunda ve özellikle de yutak kısımlarında fakültatif patojen şeklinde yerleşerek oluşturduğu ve bu etkenlerin hayvanlarda direnci zayıflatıcı etkisi sebebiyle de hastalığa yakalanma riskini artırdığı belirtilmiştir (Aydın, 2006). *P. multocida*'nın, *Mannheimia haemolytica* ile birlikte bronkopnömonideki etkisi sığırların solunum sistemi enfeksiyonlarında birçok araştırmada bildirilmiştir (Miller ve ark., 2011, Taylor ve ark., 2015). Olumsuz çevre şartları, uygun olmayan hayvan transportu, bakteriyel ve viral etkenler sebebiyle oluşan stres, ruminantlarda solunum sistemi enfeksiyonlarında etkin faktörlerdir (Garcia-Alvarez, 2018). Hayvanlarda *P. multocida*'dan ileri gelen hastalıkların tedavisinde en çok kullanılan veteriner hekimlik ürünleri antibiyotiklerdir. Solunum sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılan başlıca antibiyotikler arasında birinci kuşak antibiyotiklerin yanında florokinolonlar gibi kritik öneme sahip antibiyotikler de yer almaktadır (Evira, 2018). Sunulan çalışmanın amacı, Kütahya İlindeki mezbahalarda kesilen sığırların akciğer örneklerinden *Pasteurella* türlerinin identifikasyonu ve identifiye edilen türlerin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesidir.

MATERYAL ve METOT

Pasteurella türlerinin izolasyon ve identifikasyonu

Bu çalışmada Kütahya ilindeki kesimhanelerde kesilen sağlıklı görünümlü sığırların akciğerlerinden *Pasteurella* spp.'nin izolasyonu için 210 örnek toplandı. Toplanan örnekler steril numune kaplarında soğuk zincirde Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veteriner Teşhis ve Analiz Laboratuvarına getirildi. Akciğer doku örneklerinden kanlı agar, Eosin methylene blue (EMB) agar ve MacConkey (MC) agara ekimler gerçekleştirildi ve 37 °C'de 24-48 saat süreyle inkübasyonu sağlandı. Üreyen kolonilerin makroskobik ve mikroskobik morfolojik özellikleri ve kanlı agarda hemoliz özellikleri incelendi (Aydın 2006, Garrity ve ark., 2004, Quinn ve ark., 2004). Gram negatif *Pasteurella* şüpheli koloniler, oksidaz ve katalaz

reaksiyonları ile MacConkey agar ve EMB agarda üreme durumlarına göre seçilerek, şüpheli izolatların kesin identifikasyonları Vitek 2 cihazı Gram negatif identifikasyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

Antibiyotik duyarlılık testleri

İzolasyonu ve identifikasyonu sağlanan *P. multocida* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının tespiti Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) ve Avrupa Birliği Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi (EUCAST) standartları kapsamında kanlı agarda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle yapıldı. Sığırlardan izole edilmiş olan *P. multocida* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarını tespit etmek için, amoksisilin-klavulanik Asit (30 µg, Oxoid), tetrasiklin (30 µg, Oxoid), danofloksasin (5 µg, Oxoid), siprofloksasin (5 µg, Oxoid), seftiofur (30 µg, Oxoid), enrofloksasin (5 µg, Oxoid), sulfametoksazol-trimetoprim (20 µg, Oxoid) antibiyotik disklerinden yararlanıldı.

BULGULAR

İzolasyon ve identifikasyon bulguları

Mezbahada kesilen sığırlardan elde edilen 210 akciğer örneğinin 89'undan Gram negatif bakteri izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen bu bakterilere oksidaz ve katalaz testleri uygulanırken, bakterilerin kanlı agarda hemoliz özellikleri ile MacConkey ve EMB agarlarda üreme özellikleri test edildi. Buna göre 89 Gram negatif bakteriden 17'si *Pasteurella* türleri yönünden şüpheli olarak değerlendirildi. Şüpheli izolatların kanlı agarda hemoliz oluşturmadığı, katalaz ve oksidaz testlerine pozitif reaksiyon verdiği, MacConkey agarda üremediği, EMB agarda ise üreme olduğu ancak metalik yeşil renk vermediği gözlemlendi. Klasik kültürel yöntemler kullanılarak şüpheli olarak belirlenen 17 *Pasteurella* izolatının kesin identifikasyonu Vitek 2 otomatize sistem kullanılarak gerçekleştirildi. Buna göre 17 şüpheli izolatın ikisi (0.95%) *P. multocida* olarak identifiye edildi.

Antibiyotik duyarlılık testi bulguları

Identifiye edilen iki *P. multocida* izolatının antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle belirlendi. İzolatların amoksisilin klavulanik asit, enrofloksasin, siprofloksasin ve seftiofura %100 oranında duyarlı, danofloksasine %50 duyarlı ve %50 artırılmış dozajda duyarlı olduğu gözlemlenirken, sulfametoksazol-trimetoprim ve tetrasikline %100 oranında dirençli olduğu tespit edildi.

TARTIŞMA

Pasteurella enfeksiyonları gerek ülkemizde gerek dünyada ekonomik olarak büyük bir öneme sahiptir. Ruminantların solunum sistemi hastalıkları;

yetiştiriciler için fiziksel güç ve verim kaybıyla birlikte ölümlere ve tedavi masrafları sebebiyle büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (De Alvis, 1999).

Ruminantların solunum sistemi enfeksiyonlarından oldukça yüksek oranda *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın izole edildiği bazı çalışmalarda (Yates, 1982, Davies ve ark., 2004, Boyce ve ark., 2010) bildirilmiştir. Pnömonili buzağı akciğerlerinden *P. multocida* izolasyonuna yönelik yapılan bir çalışmada, 61 adet akciğer örneğinin 18'inde (%29,5) *P. multocida* tespit edildiği bildirilmiştir (Madsen ve ark., 1985). Yine bir çalışmada pnömoni tablolı sığırların akciğerlerinden *P. multocida* izolasyon oranı %6 olarak bildirilmiştir (Houghton ve Gourlay, 1984). Allan ve ark., (1985) tarafından yapılan bir çalışmada, pnömoni sebebiyle ölmüş ya da kesilmiş buzağuların akciğerlerinden %15,8'inde *P. multocida* tespit edildiği bildirilmiştir. Danimarka'da yapılan bir çalışmada pnömoni tablosuna sahip buzağularda 72 akciğer örneğinin 10'undan (%13,8) *P. multocida* izolasyonunun sağlandığı bildirilmiştir (Tegtmeier ve ark., 1999). 1994-2002 yılları arasını kapsayan bir başka çalışmada pnömonili buzağuların akciğerlerinden *P. multocida* izolasyonunun %34,7 olduğu ve bu izolasyon oranının yıllar bazında değişiminin %20 ile %47,4 arasında olduğu bildirilmiştir (Welsh ve ark., 2004).

Türkiye'de Konak (2012) tarafından Afyonkarahisar'da yapılan bir çalışmada, mezbahalardan toplanan 300 sığır akciğer örneğinde 22 (%7,3) *P. multocida* izolatının identifiye edildiği bildirilmiştir. Moğulkoç (2020) tarafından yapılan bir çalışmada mezbahadan alınan 200 adet pnömonik sığır akciğerlerinden 9 adet *P. multocida* (%4,5) identifiye edildiği bildirilmiştir. Karahan ve ark., (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, pnömoni semptomları gösteren 100 adet sığırdan akciğer örnekleri alınmış ve örneklerden etken identifikasyonu klasik yöntemler ve Vitek cihazı ile sağlanmıştır. Aynı çalışmada, izolasyonu ve identifikasyonu sağlanan 58 örneğin %13'ünden *P. multocida* identifiye edildiği bildirilmiştir. Elazığ'da yapılan bir çalışmada 8222 adet sığırdan alınan akciğer örneklerinden 500'ünde pnömoni tablosu tespit edilmiş olup; bakteriyolojik ve biyokimyasal yöntemler sonucu 30 (%6) örnekte *P. multocida* identifiye edilmiştir (Kılıç ve ark., 2004). Başka bir çalışmada pnömoni lezyonlu 100 buzağı akciğer doku örneğinin 8'inden *P. multocida* izole edilebildiği bildirilmiştir (Hazıroğlu ve ark., 1997). Dinler (1998) tarafından Erzurum'da pnömoni semptomlu sığırların akciğerlerinden %4,5 oranında *P. multocida* izolasyonu bildirilirken, konu ile ilgili bir başka çalışmada *P. multocida* izolasyon oranı %15,9 olarak belirtilmiştir (Gündüz ve Erganiş, 1998).

Hayvanlarda *P. multocida*'dan ileri gelen hastalıkların tedavisinde en çok kullanılan veteriner hekimlik ürünleri antibiyotiklerdir. Solunum sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılan başlıca

antibiyotikler arasında birinci kuşak antibiyotiklerin yanında florokinolonlar gibi kritik öneme sahip antibiyotikler de yer almaktadır (Evira, 2018). Fransa'da 2012-2017 yılları arasında yapılan bir çalışmada sığırlardan elde edilen akciğer örneklerinde *P. multocida* izolatlarının antibiyotik dirençlilikleri izlenmiş; tetrasiklin (%23,4), tilmikosin (%17,2), flumequin (%14,3) ve enrofloksasin (%4,5), sülfametaksazol-trimetoprim (%6,2), amoksisilin (<%5) ve florfenikol (>%0) olarak gözlemlenmiştir (Bourelly ve ark., 2019). Türkiye'de Konak (2012) tarafından Afyonkarahisar'da yapılan bir çalışmada *P. multocida* izolatlarının %95,8 florfenikole, %93,8 seftiofura ve %91,7 oranında amoksisilin-klavulanik aside duyarlı olduğu; oksitetrasikline %22,9, penisilin G ve eritromisine ise %20,8 oranında dirençli olduğu bildirilmiştir. Moğulkoç (2020) tarafından yapılan çalışmada *P. multocida* izolatlarının %100 oranında enrofloksasin ve seftiofura duyarlılık gözlemlenirken sülfametaksazol-trimetoprim %33 oranında, tetrasikline ise %55 oranında direnç tespit edilmiştir.

SONUÇ

Sunulan çalışmada sığırlardan toplanan 210 akciğer örneğinden ikisinden (%0,95) *P. multocida* identifiye edildi. Bu çalışmada elde edilen izolasyon oranının diğer araştırmalarla karşılaştırıldığında oldukça düşük oranda olduğu gözlemlendi. Bunun en önemli nedeninin, diğer araştırmalardan farklı olarak bu çalışmada kullanılan örneklerin klinik olarak sağlıklı görünümlü sığırlardan toplanmasının olabileceği düşünüldü. Ayrıca örnek sayısı ve coğrafik farklılıkların da elde edilen düşük izolasyon oranında etkili olabileceği düşünüldü.

Bu çalışmada, *P. multocida* izolatlarının amoksisilin klavulanik asit, enrofloksasin, siprofloksasin ve seftiofura %100 oranında duyarlı, danofloksasine ise %50 duyarlı ve %50 artırılmış dozajda duyarlı olduğu gözlemlenirken, sülfametaksazol-trimetoprim ve tetrasikline %100 oranında dirençli olduğu tespit edilmiş olup, oranların son yıllarda yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

Çıkar çatışması: Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Yazarların Katkı Oranı: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan etmişlerdir.

Etik izin: Bu çalışma "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" Madde 8 (k) gereği HADYEK iznine tabi değildir.

Açıklama: Bu makale birinci yazarın, ikinci yazar danışmanlığında hazırladığı yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

KAYNAKLAR

- Allan, EM., Wiseman, A., Gibbs, HA., Selman, IE. (1985). *Pasteurella* species isolated from the bovine respiratory tract and their antimicrobial sensitivity patterns. *Vet. Rec.*, 117: 629-631.
- Aydın, N (2006). Pasteurellaceae Familyası, 64–74. İçinde Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker K. S. Özel Mikrobiyoloji, Epidemiyoloji, Bakteriyel Ve Mikotik İnfeksiyonlar, Medisan Yayın Serisi, No: 26, 4. Baskı, Ankara.
- Bain, RVS., De Alwis, MCL., Carter, GR., & Gupta, BK. (1982). Haemorrhagic septicaemia [of Bovidae]. *FAO Animal Production and Health Papers* (FAO).
- Bourelly, C., Cazeau, G., Jouy, E., Haenni, M., Madex, JY., Jarrige, N., Gay, E. (2019). Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from diseased food-producing animals and pets. *Veterinary microbiology*, 235, 280-284.
- Boyce, JD., Haerper, M., Wilkie, IW., Adler, B. (2010). *Pasteurella*. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 325-337.
- Davies RL., Maccorquodale R., Reilly S. (2004). Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Vet. Microbiology.*, 99: 145-158.
- De Alvis, MCL. (1999). Haemorrhagic septicaemia. *Australian Centre For International Agricultural Research. Acıar Monograph*, Australia. 1-141.
- Dinler, U. (1998). Pnömonili sığır akciğerlerinden *Pasteurella multocida*'nın izolasyonu ve identifikasyonu (Uzmanlık Tezi). Ankara.
- Evira (2018). Recommendations for the Use of Antimicrobials in the Treatment of the Most Significant Infectious and Contagious Diseases in Animals. University of Helsinki Faculty of veterinary medicine
- Garcia-Alvarez, A., Fernandez-Garayzabal, JF., Chaves, F., Pinto, C. and Cid, D. (2018). Ovine *Mannheimia haemolytica* isolates from lungs with and without pneumonic lesions belong to similar genotypes. *Veterinary microbiology*, 219, 80-86
- Garrity, GM., Brenner, DJ., Krieg, NR., Staley JR. (2004). *BERGEY'S MANUAL of SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*, Vol. 2 The Proteobacteria, Part B. The Gammaproteobacteria.
- Gündüz, K., Erganiş, O. (1998). Pnömonili sığır akciğerlerinden izole edilen *Pasteurella haemolytica* suslarının biyotiplendirilmesi ve serotiplendirilmesi. *Veterinarium*, 9: 11-19.
- Hazıroğlu, R., Erdeğer, J., Gülbahar, MY., Kul, O. (1997). Association of *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* and *Haemophilus somnus* with pneumonia in calves. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.*, 104: 125-164.
- Houghton, SB., Gourlay, RN. (1984). Bacteria associated with calf pneumonia and their effect on gnotobiotic calves. *Res. Vet. Sci.*, 37: 194-198.
- Karahan, Ş., & Ekin, İH. (2020). Pnömonili Sığır Akciğer Örneklerinde *Mycoplasma bovis*'in Real Time PCR ile Araştırılması . XIV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) (ss.148-149). Konya, Türkiye
- Kılıç, A., & Muz, A. (2004). Pnömonili sığır akciğerlerinden bakteri izolasyonları ve izole *Pasteurella*'ların polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28(1), 217-223.
- Konak, S. (2012). Afyonkarahisar İlinde Sığırlarda *Pasteurella multocida* İzolasyonu, Tiplendirilmesi, Antibiyotik Duyarlılıkları ve Bazı Virülens Genlerinin Pzr İle Belirlenmesi.
- Lax, JA., Chanter, N. (1990). *Pasteurella multocida* toxin, a potent mitogen, stimulates protein kinase c-dependent and-independent protein phin sosphorylation in Swiss
- Madsen, EB., Bisgaard, M., Mutters, R., Pedersen, KB. (1985). Characterization of *Pasteurella* species isolated from the lungs of calves with pneumonia. *Can. J. Comp. Med.*, 49: 63-67.
- Miller DS., Weiser, GC., Ward, ACS., Drew, ML., Chapman, PL. (2011). Domestic sheep (*ovis aries*) *Pasteurellaceae* isolates from diagnostic submissions to the caine veterinary teaching center (1990-2004). *Vet.Microbiol.*, 150(3-4): 284-288.
- Moğulkoç, M. N. (2020). Bazı sığır pnömoni etkenlerinin tespiti, karakterizasyonu ve PFGE yöntemi ile genotiplendirilmesi.
- Okay, S. (2011). Development of recombinant vaccines composed of plpe and ompH from *Pasteurella multocida* A:3. The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University Doctorate Thesis, Ankara
- Quinn, PJ., Markey, BK., Carter, ME., Donnelly, WJ., Leonard, F.C. (2004). *Veterinar Microbiology And Microbial Diseases*. Blackwell, Uk.
- Taylor, JD., Holland, BP., Step, DL., Payton, ME. And Confer, AW. (2015). Nasal isolation of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* as predictors of respiratory disease in shipped calves. *Research in veterinary science*, 99, 41-45.
- Tegtmeier C, Uttenthal A, Friis Nf, Jensen Ne, Jensen He (1999). Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. *Zentralbl. Veterinarmed. B.*, 46: 693-700.
- Welsh, RD., Dye, LB., Payton, ME., Confer, AW. (2004). Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16: 426- 431.
- Yates, WDG. (1982). A review of infectious ovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can. J. Comp. Med.*, 46: 225-263.