

Koyun ve Sığır Örneklerinden *Arcanobacterium pyogenes* İzolasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile İdentifikasyonu ^[1]

H. Hüseyin HADİMLİ *  Osman ERGANİŞ * Kürşat KAV * Zafer SAYIN *

[1] Bu proje, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP-05401103) tarafından desteklenmiştir.

* Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, TR-42075 Konya - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2009-1298

Özet

Bu çalışmanın amacı; koyun ve sığır örneklerinden *Arcanobacterium pyogenes* (*A. pyogenes*) izole etmek, Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile tanımlamak ve antimikrobiyal duyarlılıklarını belirlemektir. Çalışmada, koyun ve sığırlara ait (süt, akciğer, karaciğer, bronko alveolar yıkantı, eklem sıvısı ve süppuratif doku) toplam 716 adet örnek toplandı. Bütün örnekler, %5 koyun kanı içeren kanlı agara ekimleri yapıldı ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Örneklerden izole edilen toplam 51 adet *A. pyogenes* suşu biyokimyasal özelliklerine göre tanımlandı. Daha sonra, *A. pyogenes* için plosin genine spesifik primerler kullanılarak PCR analizleri gerçekleştirildi. Bütün izolatlar PCR ile *A. pyogenes* olarak doğrulandı. Ayrıca, veteriner sahada kullanılan 16 farklı antimikrobiyal ajana karşı antimikrobiyal aktiviteleri belirlendi. Bu mikroorganizmanın, koyun ve sığırlarda ekonomik kayıplarla seyreden enfeksiyonlara sebep olabileceği vurgulandı.

Anahtar sözcükler: *Arcanobacterium pyogenes*, Sığır, Koyun, Süt, Karaciğer, Akciğer, Bronko alveolar yıkantı

Isolation of *Arcanobacterium pyogenes* from Samples of Sheep and Cattle and Identification by Polymerase Chain Reaction

Summary

The aims of this study were to isolate *Arcanobacterium pyogenes* (*A. pyogenes*) from cattle and sheep, to identify the isolates by conventional methods, Polymerase Chain Reaction (PCR) and to determine antimicrobial susceptibilities. In this study, a total 716 samples were collected from sheep and cattle (liver, milk, broncho alveolar lavage, lung, suppurative tissue, and fluid of joint). All samples were cultured onto blood agar base containing 5% defibrinated sheep blood and plates were incubated at 37°C for 48 h. Total 51 *A. pyogenes* strains isolated from samples were identified in according to properties of biochemical. Then, PCR analyses were made using specific primers for *A. pyogenes*. All isolates were also confirmed by PCR. In addition, antimicrobial activities were determined to 16 antimicrobial agents, some of which were used in veterinary medicine. There is emphasized that this bacterium may cause a variety of infections with economically losses in sheep and cattle.


Keywords: *Arcanobacterium pyogenes*, Cattle, Sheep, Milk, Liver, Lung, Bronco- alveolar lavege


GİRİŞ

Arcanobacterium pyogenes; Gram pozitif, pleomorfik, basıl görünümlü, fakültatif anaerobik bir bakteridir. Etken, önceleri *Corynebacterium pyogenes*, *Actinomyces pyogenes* ve son sınıflandırmada 16S rRNA sekansları baz alınarak *A. pyogenes* olarak yeniden isimlendirilmiştir ¹⁻³. Bununla birlikte, etkenin ismi veteriner sahada hala *Corynebacterium pyogenes* veya *Actinomyces pyogenes* olarak kullanılmaktadır.

A. pyogenes, sığır, koyun, keçi gibi evcil hayvanların üst solunum ve ürogenital sistemlerin muköz membranların kommensal bir bakterisi olarak karşımıza çıkmaktadır ⁴. Aynı zamanda, çeşitli evcil hayvanlarında süppuratif enfeksiyonlardan sorumlu önemli bir fırsatçı patojendir. Etken, mastitis, atıklar, pyometra, artritis, orşitis vakalarından, evcil hayvanların ve kanatlıların ayak apselerinden tek başına yada karışık kültürler

 İletişim (Correspondence)

 +90 332 2233622

 hhadimli@selcuk.edu.tr

olarak izole edilmektedir ⁵⁻¹³. Aynı zamanda, ineklerin karaciğer apselerinden ve solunum sisteminden *Fusobacterium necrophorum* ile birlikte en sık izole edilen sekonder bir patojendir ^{1,14}. Sığırlarda karaciğer apselerinde %2-50 oranında izole edildiği belirtilmektedir ^{1,15,16}. Etkenin sığır rumeninden ve domuzların midesinden izole edilmesi, aynı zamanda bu tür hayvanların sindirim sistemlerinin de yaygın yerleşik bir bakterisi olabileceğini göstermiştir ¹⁶. Kurudaki ineklerde ve düvelerde yaz mastitisine sebep olan etken olarak ta bilinmektedir ⁶. Ayrıca, sığırların apseli böbreklerinden de izole edildiği belirtilmiştir ¹⁷. Hayvanların yanı sıra, hayvancılıkla uğraşan insanlarda da arthritisi ve deri altı apselerinden izole edildiği rapor edilmiştir ^{18,19}.

A. pyogenes'in kommensal bir etkenden patojenik bir etkene dönüşümü yada tarafından oluşturulan enfeksiyonun patogenezi hala tam olarak karakterize edilememiştir. Bununla birlikte, dokuların bütünlüğünün bozan fiziksel ve mikrobiyal travmalar organizmanın vücuda girmesine izin vermektedir ^{2,3,10,20}.

Canlıların florasında bulunan etkenin zaman zaman ekonomik olarak ciddi kayıplı enfeksiyonlar oluşturmaya rağmen, etkenin patojenitesi, patogenezi ve mücadele yollarının yeterince bilinmemektedir. Dolayısıyla, laboratuvarlarda rutin teşhiste göz ardı edilebilmektedir. Çeşitli hayvan türlerinde abort, mastitis, pyometra, arthritisi, ayaklar, karaciğer ve böbreklerdeki apselerden *A. pyogenes*'in izole edilmesi konunun ciddiyetini göstermektedir ^{1,3,5,6,8}. *A. pyogenes*'in teşhisi, çoğunlukla kültür sonuçlarına dayanmaktadır.

Bu çalışmada, kesimhanelerde kesilen besi sığırlarına ait karaciğer apselerinden, süt ineklerine ait süt, akciğer, bronko-alveolar lavaj ve suppuratif doku örneklerinden ve buzağıya ait eklem sıvı örneğinden; *A. pyogenes* suşlarının izolasyonu, biyolojik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerine göre identifikasyonunun yanı sıra anti-biyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada, Konya'da bulunan kesimhanelerde kesilen 660 sığır ve 300 koyun karaciğerleri muayene edilerek 158 sığır ve 48 koyun apseli karaciğerleri alındı. Ayrıca, farklı işletmelerde bulunan süt ineklerinden 481 adet mastitisli süt örneği, 20 adet bronko-alveolar yıkantı örneği, 7 adet akciğer örneği, 1 adet apseli doku örneği ve buzağıya ait 1 adet eklem sıvısı örneği alındı (Tablo 1). Farklı tür ve dokulara ait toplam 716 örnek, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına soğuk zincir altında kısa

sürede getirildi. Akciğer, bronko-alveolar yıkantı örnekleri solunum problemi görülen süt ineklerinden, suppuratif doku örneği ölen bir süt ineğinden ve eklem sıvısı örneği topallık gösteren bir buzağıdan alındı (Tablo 1).

Arcanobacterium pyogenes İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Örnekler, %5 koyun kanı içeren kanlı agara ekilerek %5 CO₂'li ortamda 37°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası küçük, iğne ucu büyüklüğünde, β-hemoliz yapan, gram pozitif, gram değişken veya pleomorfik görümlü koloniler şüpheli kabul edildi. Rutin biyokimyasal testler; katalaz ve oksidaz negatif, nitrat redüksiyon, eskülin, jelatin hidroliz, üreaz üretimi, glikoz, maltoz, mannitol, sukroz ve ksiloz fermentasyonu, casein agarda sivilaşma görünümü, oksidasyon-fermantasyon yönünden incelendi ^{12,15,17,21}.

DNA Ekstraksiyonu

Biyokimyasal özelliklerine göre *A. pyogenes* olarak identifiye edilen suşlardan; 300 µl distile su içeren ependorf tüpe birkaç koloni alındı ve süspansiyon 56°C'de 30 dak. inkübe edildi. Daha sonra üzerine 300 µl TNES buffer (20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, %0.2 SDS) ve proteinase K (200 mg/ml) ilave edildi ve 30 dak. kaynatıldı. Süspansiyona aynı miktarda fenol (saturated with Tris-HCl) eklendi ve 5 dak. şiddetli karıştırıldı. Daha sonra, süspansiyon 11.600 g'de 10 dak. santrifüj edildi. Tüpün üstündeki materyal başka bir ependorf tüpüne aktarılarak sodium asetat (0.1 kısım) ve etanol (2.5 kısım) eklendi. DNA'nın presipitasyonu için süspansiyon 20°C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün, 11.000 g'de 10 dak. santrifüje edildi, pelet üzerine %95 ve %70'lik etanol ilave edilerek 2 kez yıkandı ve 5 dak. santrifüj edildi. Son aşama olarak, alkolün uçması beklenildi ve kuru pelet 50 µl distile su ile yeniden süspansiyon edildi ¹⁷.

PCR

Primerler: *A. pyogenes*'in plo geninden üretilen spesifik primerler kullanıldı.

Forward primer: 5'- GGC CCG AAT GTC ACC GC -3'

Reverse primer: 5'- AAC TCC GCC TCT AGC GC -3'

Toplam 50 µl PCR karışımı; 10 µl PCR Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, %0.1 Triton1X-100), 5 µl 25 mM MgCl₂, 250 µM dNTPs, 1 µM primer, 2 U Taq polimeraz ve 5 µl template DNA içermektedir. Amplifikasyon; 94°C'de 8 dak. ön denaturasyon, daha sonra 35 kez 94°C'de 1 dak. denaturasyon, 55°C'de 1 dak. soğutma ve 72°C'de 1 dak. ekstensiyon aşaması yapıldı. Son olarak, 1 kez 72°C'de 5 dak. final ekstensiyon

aşaması ile amplifikasyon tamamlandı ¹⁷. PCR ürünlerinden 10 µl miktarı horizontal elektroforez'de ethidium bromid'li (0.5 mg/ml) %1.5'lik agaroz içeren jel ortamında elektroforeze (60 v, 1 saat) tabi tutuldu. Ultraviolet lamba'da PCR ürünlerinin 270 bp'lik bantları *A. pyogenes*'in identifikasyonu için değerlendirildi (Şekil 1). DNA marker olarak 100 bp'lik DNA ladder (Fermantas, SM 321) kullanıldı.

A. pyogenes İzolatlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları

A. pyogenes izolatlarının antibiyotik duyarlılık testleri; oksitetrasiklin (30 µg; Oxoid, UK), gentamisin (10 µg; Oxoid, UK), ofloksasin (5 µg; Oxoid, UK), eritromisin (15 µg; Oxoid, UK), linkomisin (10 µg; Oxoid, UK), florfenikol (30 µg; Oxoid, UK), kloksasilin (5 µg; Oxoid, UK), neomisin (30 µg; Oxoid, UK), danofloksasin (5 µg; Pfizer), ampisilin (25 µg; Oxoid, UK), sulbaktam + ampisilin (30 µg; Oxoid, UK), amoksisilin (25 µg; Oxoid, UK), amoksisilin + klavulanik asit (30 µg; Oxoid, UK), cefaperazon (75 µg; Bioanalyse, UK), penisilin G (10 U; Oxoid, UK) ve ciprofloksasin (5 µg; Oxoid, UK) diskleri kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile %5 koyun kanı katılmış Mueller-Hinton agarda (Oxoid) yapıldı ²². Besiyerleri 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra sonuçlar değerlendirildi.

Virulens Tespiti

A. pyogenes'in patojen olabileceğini göstermek için kesimhanede kesilen bir besi danasının karaciğer apse-sinden izole edilen, biyokimyasal ve PCR ile tanımlanmış bir *A. pyogenes* suşunun 1×10^7 , 1×10^8 ve 1×10^9 konsantrasyonları 10'ar fareye kas içi yolla uygulandı. Fareler, artrit, farklı klinik semptomlar ve ölüm yönün-

den 20 gün boyunca gözlemlendi. Ayrıca, ölen yada 20 gün sonra uyutulan farelerin doku (akciğer, karaciğer, kalp, böbrek ve dalak) örnekleri; hem *A. pyogenes* ve hem de diğer bakterilerin izolasyonu yönünden kanlı agar, MacConkey agar ve Saboroud Dekstroz agar ekildiler ²³.

BULGULAR

Besi sığırlarına ait 158 adet apseli karaciğer örneğinden 25 (%15.82)'inde ve koyunlara ait 48 apseli karaciğer örneğinden 4 (%8.33)'ünden etken izolasyonu yapıldı. Süt ineklerine ait 481 süt örneğinden 12'sinde (%2.49), 20 adet bronko alveolar yıkantı örneğinden 3 'ünde (%15), 7 adet akciğer örneğinden 5 (%71.42) ve 1 adet suppuratif dokudan etken üretildi. Ayrıca, buzağıya ait 1 adet eklem sıvısından *A. pyogenes* izole edildi (Tablo 1).

PCR Sonuçları

Biyokimyasal özelliklerine göre *A. pyogenes* olarak tanımlanmış izolatlar PCR ile teyit edildi (Şekil 1).

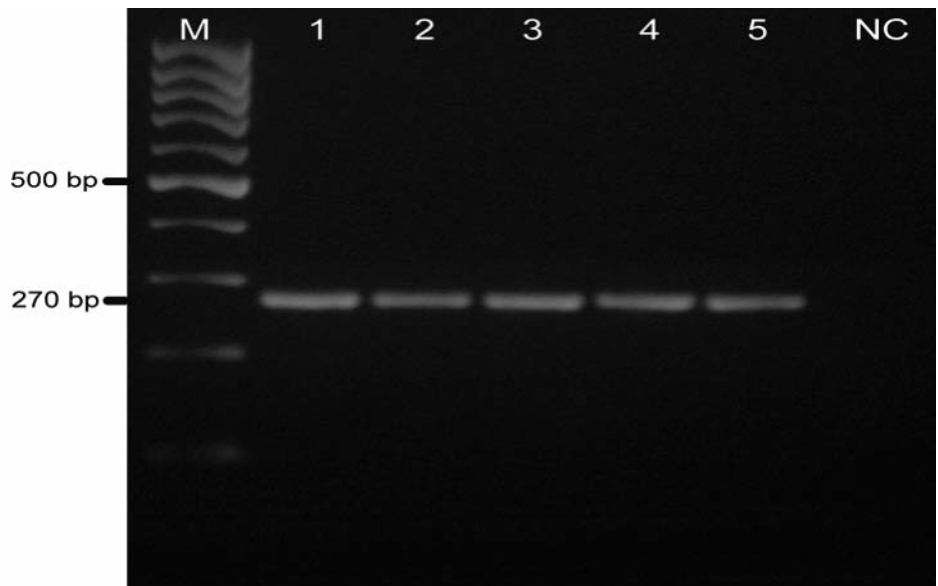
Tablo 1. *Arcanobacterium pyogenes* izolasyonu için toplanan örnekler ve izolat sayıları

Table 1. The number of isolates and collected samples for isolation of *Arcanobacterium pyogenes*

İzole Edilen Tür	Örnek Alınan Doku	Örnek Sayısı	İzolat Sayısı
Besi Sığırı (kesimhane)	Karaciğer	158	25
Süt İneği	Süt	481	12
Süt İneği	Akciğer	7	5
Süt İneği	Bronko alveolar yıkantı	20	3
Süt İneği	Apse	1	1
Buzağı	Eklem sıvısı	1	1
Koyun (kesimhane)	Karaciğer	48	4
Toplam		716	51

Şekil 1. *Arcanobacterium pyogenes* suşlarının PCR Analizi: **M:** 100 bp DNA Marker, **1:** Pozitif kontrol (270 bp band), **2-5:** Pozitif örnekler, **NC:** Negatif kontrol

Fig 1. Analysis of PCR of *Arcanobacterium pyogenes* isolates: **M:** 100 bp DNA Marker, **1:** Positive control (270 bp band), **2-5:** Positive samples, **NC:** Negative control



A. pyogenes Suşlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri

Arcanobacterium pyogenes izolatlarının farklı antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılıkları **Tablo 2**'de verilmiştir. Toplam 51 *A. pyogenes* izolatın amoksisilin + klavulonik asite %100 duyarlı bulunurken; amoksisilin, florfenikol, ofloksasin, ampisilin, penisilin ve sulbaktam + ampisiline %98.04 oranlarında duyarlı oldukları belirlendi. Ayrıca, ciprofloksasin, eritromisin ve sefaperazona %90.20 duyarlı oldukları belirlendi. Bununla birlikte, oksitetrasikline %78.43, neomisine %49.01, gentamisine %37.25, linkomisine %35.29, danofloksasine %25.49 ve kloksasine %17.64 oranlarında dirençli oldukları gözlemlendi.

Tablo 2. *Arcanobacterium pyogenes* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları

Table 2. Antibiotic susceptibilities of *Arcanobacterium pyogenes* isolates

Antibiyotik	Dirençli		Duyarlı	
	n	%	n	%
Oksitetrasiklin	40	78.43	11	21.57
Gentamisin	19	37.25	32	62.75
Ciprofloksasin	5	9.80	46	90.20
Florfenikol	1	1.96	50	98.04
Oksasilin	1	1.96	50	98.04
Eritromisin	5	9.80	46	90.20
Linkomisin	18	35.29	33	64.71
Kloksasilin	9	17.64	42	82.36
Neomisin	25	49.01	26	50.99
Danofloksasin	13	25.49	38	74.51
Sulbaktam+Ampisilin	1	1.96	50	98.04
Amoksisilin+Klavulonik asit	-	-	51	100
Ampisilin	1	1.96	50	98.04
Cefaperazon	5	9.80	46	90.20
Penisilin	1	1.96	50	98.04
Amoksisilin	1	1.96	50	98.04

Virulens Tespiti

Arcanobacterium pyogenes suşunun kas içi yolla verilen farklı konsantrasyonlarında (1×10^7 , 1×10^8 ve 1×10^9) hem morbidite hemde ölüm şekillendiği gözlemlendi (**Tablo 3**). Ayrıca, enfekte farelerin doku örneklerinden *A. pyogenes* suşu tekrar izole edildi (**Tablo 4**).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Kommensal bir etken olarak dikkate alınan *A. pyogenes*, hastalık vakalarında çoğunlukla patojen bir etken olarak izole edilebilmektedir. Sığır ve domuzlarda deri, eklem ve organlarda suppuratif enfeksiyonlara sebep olabilen en yaygın fırsatçı patojenlerden birisi *A. pyogenes*'dir ^{11,12,14}. Çoğunlukla, müköz membranların fiziksel yada mikrobiyal travması sonrasında, primer bir patojen olarak enfeksiyon oluşturacak şekilde dokulara yayılmaktadır.

Karaciğer apseleri, her yaştaki ve süt inekleri dahil

Tablo 3. Farklı konsantrasyonlarda *Arcanobacterium pyogenes* verilen (kas içi) farelerde mortalite ve morbidite oranları

Table 3. The rate of mortality and morbidity in mouse which given (intramuscularly) different concentrations of *Arcanobacterium pyogenes*

Parametre	Bakteri Yoğunluğu		
	1×10^9	1×10^8	1×10^7
Mortalite	7/10	6/10	5/10
Morbidite	9/10	8/10	4/10

Tablo 4. Farklı konsantrasyonlarda *Arcanobacterium pyogenes* verilen (kas içi) farelerde mikrobiyolojik sonuçları

Table 4. The results of microbiological (A) and Levels of mortality - morbidity (B) in mouse which given (intramuscularly) different concentrations of *Arcanobacterium pyogenes*

İç Organlar	Bakteri Yoğunluğu		
	1×10^9	1×10^8	1×10^7
Karaciğer	6/10	5/10	4/10
Dalak	6/10	4/10	5/10
Kalp	1/10	1/10	1/10
Böbrek	2/10	2/10	2/10
Akciğer	5/10	4/10	2/10
Toplam	20/50	16/50	14/50

tüm sığırlarda meydana gelebilmektedir. Ancak, ekonomik durumlarından dolayı besi hayvanlarında daha önemlidir. Hayvanların yaklaşık %12-32'sinde karaciğer apselerine rastlanılmakta ve besi endüstrisinde belirgin ekonomik kayıba sebep olduğu belirtilmektedir. Besi hayvanlarında karaciğer apselerinin önlenmesi için çeşitli antibiyotikler (basitrasin, metilen disalisilat, klor-tetrasiklin, oksitetrasiklin, tylosin ve virginomisin) kullanılmaktadır ^{1,15,16}. Ayrıca, birçok bakteriyel enfeksiyonlarda tedavi ve profilaktik amaçlı olarak terapötik dozda veya altında antibiyotikler (en sık oksitetrasiklin ve tilozin türevleri) yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna bağlı olarak, bir çok *A. pyogenes* izolatı tylozin ve tetrasiklin derivatlarına karşı dirençli olabilmektedir ¹⁵.

Kültüre edilen karaciğer apselerinden birinci sırada *Fusobacterium necrophorum* (%81-100) ve ikinci sırada *A. pyogenes* (%2-50) izole edildiği, bunun yanı sıra *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, *Pasteurella spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* gibi diğer bakterilerde bildirilmiştir ¹⁵.

Tylosin katılmış yem ile beslenen hayvanların karaciğer apselerinde *A. pyogenes* ve *F. necrophorum*'un miks enfeksiyon oranının yüksek bulunması, iki bakteri arasında karaciğer apselerin oluşumunda potansiyel bir sinerjik etkinin olduğu belirtilmiştir ¹⁵. Genel olarak, *A. pyogenes*'in primer bir etkenden ziyade, karaciğer apselerinin oluşumunda yardımcı bir etken olduğu gözlen-

mektedir. Bu çalışmada, kesimhanede toplam 660 adet besi danasının karaciğerleri kesim sonrası muayene edilmiş, 158 tanesinden de 25 *A. pyogenes* suşu izole edilmiştir. *A. pyogenes* suşlarının tümünün oksitetrasikline dirençli bulunması, yeme yada suya oksitetrasiklin katılmasından (ülkemizde antibiyotik katılması yaygın olmaması ve incelenen hayvanlara antibiyotik verildiğine ait bilgi olmaması) ziyade, tedavi yada korunma amaçlı yaygın oksitetrasiklin grubu antibiyotiklerin kullanılması sonucunda olduğu kanaatine varılmıştır.

A. pyogenes, 2. laktasyondan sonraki süt ineklerinde ciddi süt kayıplarına sebep olan mastitis etkenlerinden (*Streptococcus spp.*, *Staph. aureus*, *E. coli* ve *Klebsiella spp.*) birisidir^{5,11}. Aynı zamanda, kurudaki ineklerde ve düvelerde sıklıkla görülen yaz mastitisinin etkenidir⁶. Yaz mastitislerinin etiolojisinde, ilk başta *A. pyogenes* olmakla birlikte, *Peptostreptococcus indolicus*, *F. necrophorum* ve *Streptococcus dysgalactiae* gelmektedir. Hastalık, çok şiddetli pis irin kokusu ve enfekte lobta sertlik, gevrek ve doku zedelenmesi ile karakterizedir. Vakaların çoğunluğu yaz döneminde (*Hydrotaea irritans* isimli sinek vektör olmaktadır) şekillenirken, kış aylarının başında da olaşabileceği belirtilmiştir⁶. Bu çalışmada, süt ineklerinden alınan 481 süt örneğinin 12'sinde (% 2.49) *A. pyogenes* izole edilmiştir. Aslında, normal izolasyon oranından daha yüksek olarak bulunması, bazı işletmelerde *A. pyogenes* zaman zaman problem oluşturması ve maksatlı örnekleme yapılmasına bağlanmıştır.

Yoshimura ve ark.²⁵, sığırlara ait farklı vakalardan (11 akciğer, 6 mastitisli süt, 8 apse, 3 serebral yada spinal lezyon, 4 atık ve dokuları, 2 lenf düğümü ve kanlı idrar, 1 pyometra) 42 adet *A. pyogenes* suşunu izole etmişlerdir. Bu çalışmada da, süt ineklerine ait, süt, akciğer, bronko-alveolar yıkantı ve suppuratif doku örneklerinden *A. pyogenes* suşları izole edilmiştir. Bazı işletmelerde, hastalık ve ölüm görülmesi üzerine; akciğer, bronko-alveolar yıkantı ve suppuratif doku örnekleri *A. pyogenes* yönünden incelenmiştir.

Ertaş ve ark.¹⁷, apseli sığır böbreklerinden izole ettikleri 40 *A. pyogenes* suşlarının *A. pyogenes* plo genine spesifik primerlerle yapılan PCR ile *A. pyogenes* olarak tanımlanmış olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, farklı hayvansal örneklerden izole edilen *A. pyogenes* suşları; hem klasik hem de moleküler tekniklerle incelendi. Son dönemlerde, veteriner hekimlikte patojenlerin tanımlanması için geliştirilmiş moleküler tekniklerin kullanılması yaygınlaşmaktadır. Özellikle, klasik yöntemlerle tanımlanmış suşların PCR ile doğrulanması yapılmaktadır. Kültürü yapılamayan yada çok yavaş üreme gösteren patojenlerin klinik örneklerde tespiti

gibi moleküler tekniklerin çeşitli avantajları mevcuttur. Klasik metotlara göre, uzman kişilere ihtiyaç duyulması ve maliyetinin pahalı olması gibi dezavantajlarına rağmen, bazen klasik metotlarla tanımlanmada yanlış sonuçlar alınabilmektedir. PCR ile *A. pyogenes* suşlarının tanımlanması için pyolisin genine spesifik primerler belirlenmiştir. Bu çalışmada ve farklı araştırmalarda^{2,17} klasik metotlarla *A. pyogenes* olarak tanımlanmış suşların tümü PCR ile *A. pyogenes* olarak doğrulanmıştır.

A. pyogenes enfeksiyonlarının korunmasında yada tedavisinde antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, tedavide antimikrobiyal ilaçların kullanılması sadece kısa bir süre için çözüm olabilmektedir. İzole edilen suşların antimikrobiyal maddelere duyarlılıkları sadece yıldan yıla değil aynı zamanda ülkeden ülkeye de farklılık gösterebilmektedir²⁴.

Yoshimura ve ark.²⁵, izole ettikleri bütün suşların penisilin, ampisilin, eritromisin, tilmikisin ve linkomisine duyarlı olduklarını, oksitetrasikline dirençliliğinin %57.1 olduğunu belirtmişlerdir. En az 25 yıldır veteriner sahada uzun süredir kullanılan, penisilin ve ampisilin hala tüm dünyada *A. pyogenes*'e karşı etkinliğini sürdürmektedir. Bu çalışmada da, tüm *A. pyogenes* suşlarının florfenikol, ofloksasin, kloksasilin, ampisilin, penisilin, sefaperazon, sulbaktam + ampisilin, amoksisilin + klavulanik asit ve amoksisilin'e karşı duyarlı (%100) oldukları belirlendi.

A. pyogenes'te antimikrobiyal ajanlara karşı dirençliliğinin gelişmesi; sadece enfeksiyonun tedavi edilmesi açısından değil aynı zamanda normal florada bulunan diğer bakterilere antimikrobiyal dirençliliğinin transfer edilmesinde rezervuar olarak rol alabilmesi açısından önemlidir²⁴. Trinh ve ark.²⁴, sığırlardan izole edilen *A. pyogenes* izolatlarının %25.9'unda tetrasikline karşı dirençlilik olduğunu belirtmişlerdir.

Kommensal olarak tanımlanan bakterinin enfeksiyon yapabilme potansiyelini göstermek amacıyla apseli karaciğer örneğinden izole edilen bir *A. pyogenes* suşu farelere verilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda (6×10^9 bakteri/ml) *A. pyogenes* verilen 10 adet farenin 9'u hastalanırken 7'sinde ölüm gözlenmiştir. Bununla birlikte, daha düşük konsantrasyonda (6×10^7 bakteri/ml) bile etkenin hastalık (4 tanesinde) ve ölüm (5 tanesinde) yaptığı tespit edilmiştir. Ayrıca, etken virulens faktörleri olarak hemolitik ekzotoksin, pyolisin, noröaminidaz, multiple proteaz ve DNAase gibi hücre dışı yüzey proteinleri üretmektedir². Bunların en önemlisi olan pyolisin'in de virülensinin tespit edilmesi gerekmektedir.

A. pyogenes, daha önceleri potansiyel patojen bir bakteriden ziyade kommensal yada invaziv bir bakteri olarak yanlış tanımlanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada

koyun ve sığırlara ait farklı örneklerden izole edilen *A. pyogenes* izolatlarının bir çok enfeksiyona sebep olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma temel alınarak elde edilen *A. pyogenes* suşlarının virulens genlerine sahip olup olmadığı, hemaglutinasyon ve toksisite özelliklerinin ilave çalışmalarla belirlenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Narayanan S, Nagaraja TG, Staats J, Chengappa MM, Obersts RD:** Biochemical and biological characterizations and ribotyping of *Actinomyces pyogenes* and *Actinomyces pyogenes*-like organisms from liver abscesses in cattle. *Vet Microbiol*, 61, 289-303, 1998.
- Billington SJ, Songer JG, Jost BH:** Molecular characterization of the pore-forming toxin, pyolysin, a major virulence determinant of *Arcanobacterium pyogenes*. *Vet Microbiol*, 82, 261-274, 2001.
- Silva E, Gaiva M, Leita S, Jost BH, Carneiro C, Vilela CL, Lopes da Costa L, Mateus L:** Genomic characterization of *Arcanobacterium pyogenes* isolates recovered from the uterus of dairy cows with normal puerperium or clinical metritis. *Vet Microbiol*, 25, 111-118, 2008.
- Jost BH, Billington SJ:** *Arcanobacterium pyogenes*: Molecular pathogenesis of an animal opportunist. *Antonie van Leeuwenhoek*, 88, 87-102, 2005.
- Simpson RB, Wesen DP, Anderson KL, Armstrong JD, Harvey RW:** Subclinical mastitis and milk production in primiparous simmental cows. *J Anim Sci*, 73, 1552-1558, 1995.
- Jousimies-Somer H, Pyorala S, Kanervo A:** Susceptibilities of bovine summer mastitis bacteria to antimicrobial agents. *Antimicrob Agent Chemother*, 40, 157-160, 1996.
- Watts JL, Lowery DE, Teel JF, Rossbacht S:** Identification of *Corynebacterium bovis* and *Coryneforms* isolated from bovine mammary glands. *J Dairy Sci*, 83, 273-2379, 2000.
- Nolte O, Morscher J, Weiss HE, Sonntag HG:** Auto-vaccination of dairy cows to treat post partum metritis caused by *Actinomyces pyogenes*. *Vaccine* 19, 3146-3153, 2001.
- Quinn AK, Vermont JJ, Twiss DP:** *Arcanobacterium pyogenes* mastitis in a 18-month-old heifer. *New Zealand Vet J*, 50, 167-168, 2002.
- Gouletsou PG, Ethenakis GC, Cripps PJ, Papaioannou N, Lainas T, Psalla D, Amiridis GS:** Experimentally induced orchitis associated with *Arcanobacterium pyogenes*: Clinical, ultrasonographic, seminological and pathological features. *Theriogenol*, 62, 1307-1328, 2004.
- Gröhn YT, Wilson DJ, Gonzalez RN, Hertl JA, Schulte H, Bennett G, Schukken YH:** Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J Dairy Sci*, 87, 3358-3374, 2004.
- Gouletsou PG, Ethenakis GC, Tzora A, Cripps PJ, Saratsis P:** Isolation of *Arcanobacterium pyogenes* from the scrotal skin and the prepuce of healthy rams or from rams with testicular abnormalities. *Small Rumin Res*, 63, 177-182, 2006.
- Miller ANA, Williams EJ, Sibley K, Herath S, Lane EA, Fishwick J, Nash DM, Rycroft AN, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM:** The effects of *Arcanobacterium pyogenes* on endometrial function *in vitro*, and on uterine and ovarian function *in vivo*. *Theriogenol*, 68, 972-980, 2007.
- Seimiya YM, Takahashi M, Tamura T, Murakumi R, Haritani M, Kimura KM:** Fibrinonecrotic rhinitis caused by a concurrent infection of *Fusobacterium necrophorum* and *Arcanobacterium pyogenes* in a cow. *J Vet Med Sci*, 66, 985-987, 2004.
- Nagaraja TG, Beharka AB, Chengappa MM, Carroll LH, Raun AP, Laudert SB, Parrott JC:** Bacterial flora of liver abscesses in feedlot cattle fed tylosin or no tylosin. *J Anim Sci*, 77, 973-978, 1999.
- Nagaraja TG, Chengappa MM:** Liver abscesses in feedlot cattle: A review. *J Anim Sci*, 76, 287-298, 1998.
- Ertaş HB, Kılıç A, Özbey G, Muz A:** Isolation of *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* from abscessed kidney and identification by PCR. *Turk J Vet Anim Sci*, 29, 455-459, 2005.
- Dias CAG, Cauduro PF, Mezzari A, Cantarelli V:** *Actinomyces pyogenes* isolated from a subcutaneous abscess in a dairy farmer. *Clin Microbiol Lett*, 18, 38-40, 1996.
- Lynch M, O'Leary J, Murnaghan D, Cryan B:** *Actinomyces pyogenes* septic arthritis in a diabetic farmer. *J Infection*, 37, 71-73, 1998.
- Rudnick ST, Jost BH, Songer JG, Billington SJ:** The gene encoding pyolysin, the pore-forming toxin of *Arcanobacterium pyogenes*, resides within a genomic islet flanked by essential genes. *FEMS Microbiol Lett*, 225, 241-247, 2003.
- Billington SJ, Post KW, Jost BH:** Isolation of *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* from cases of feline otitis externa and canine cystitis. *J Vet Diagn Invest*, 14, 159-162, 2002.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M:** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Path*, 45, 493, 1966.
- Hadimli HH, Erganiş O, Sayın Z, Yıldırım B:** Evaluation of the efficacy of an inactivated *Salmonella typhimurium* vaccine in sheep: Preliminary report. *6th Int Sheep Vet Congr*, 17-21 June, Crete, Greece, 2005.
- Trinh HT, Billington SJ, Field AC, Songer JG, Jost BH:** Susceptibility of *Arcanobacterium pyogenes* from different sources to tetracycline, macrolide and lincosamide antimicrobial agents. *Vet Microbiol*, 85, 353-359, 2002.
- Yoshimura H, Kojima A, Isfimar M:** Antimicrobial susceptibility of *Arcanobacterium pyogenes* isolated from cattle and pigs. *J Vet Med B*, 47, 139-143, 2000.