

YENİDOĞAN BUZAĞI İSHALLERİNDEN *SALMONELLA* ve *CITROBACTER* TÜRLERİNİN İZOLASYON ve İDENTİFİKASYONU

Ahmet ÜNVER* Mehmet ÇİTİL** Halil İ. ATABAY* Salih OTLU* Mitat ŞAHİN*

Yayın Kodu: 2005/18-A

Özet: Bu çalışma, *Salmonella* ve *Citrobacter* türlerinin yenidoğan ishallerdeki prevalansını ortaya koymayı amaçlamıştır. Kars yöresinde yetiştirilmekte olan toplam 155 adet yenidoğan ishallerden alınan dışkı örneklerinin 3 tanesinden *Salmonella* spp., farklı 3 tanesinden de *Citrobacter* spp. izole ve tanımlanmıştır. Bu sonuçlara göre hem *Salmonella* hem de *Citrobacter* türlerinin ishallerdeki prevalansı %1.93 olarak bulundu. Yörede ishallerde vakalarında *Salmonella* türlerinin önemini koruduğunu ve *Citrobacter* türlerinin yenidoğan ishallerde ishal nedeni olabileceğini ortaya koyan bu çalışma, bu etkenlerin ishal vakalarının teşhisinde, tedavisinde, kontrol ve koruma çalışmalarında dikkate alınması gerekliliğini ortaya koymuştur.

Anahtar sözcükler: *Salmonella*, *Citrobacter*, yenidoğan buzağı, ishal.

Isolation and Identification of *Salmonella* spp. and *Citrobacter* spp. from Diarrheic Neonatal Calves

Summary: The purpose of this study was to determine the prevalence of *Salmonella* spp. and *Citrobacter* spp. in diarrheic neonatal calves. In 155 fecal samples analyzed for presence of these agents, *Salmonella* spp. and *Citrobacter* spp. were isolated and identified from 3 different samples. These results showed that prevalence of these microorganisms was 1.93% in diarrheic neonatal calves. The current study presents the significance of possible *Salmonella*- and *Citrobacter*-related diarrhoea, therefore, these agents need to be considered for diagnosis, prophylaxis, control and prevention of diarrhoea of neonatal calves in Kars region.

Keywords: *Salmonella*, *Citrobacter*, neonatal calves, diarrhea.

GİRİŞ

Yenidoğan buzağı ishalleri hayvan yetiştiriciliğinde ciddi ekonomik kayba yol açan en önemli hastalıklardan birisidir¹⁻⁴. Hastalık, hazırlayıcı sebepler ve yardımcı faktörler ile beraber oldukça kompleks bir etiyolojiye sahiptir. Birçok bakteriyel, viral ve paraziter etken yanında özellikle *Enterobacteriaceae* ailesinin patojen türleri buzağı ishallerinin etiyolojisinde önemli yer tutmaktadır⁵⁻⁷. Bu aile içinde yer alan *Salmonella* spp. yenidoğan buzağı ishallerinden sıklıkla izole edilmektedir^{1,2,4,8-11}. Salmonelloziste infeksiyon çoğu zaman sindirim sistemi yoluyla şekillenmekte ve etken lenfatik yolla vücuda yayılmaktadır. Bağırsakların istilasını mukozal hücreler ve mukoza ilişkili makrofajlar yoluyla gerçekleştiren bu etkenler buralarda fakültatif hücre içi özellik de sergileyebilmektedirler. İshal yapma mekanizmaları tam olarak bilinmeyen *Salmonella* türlerinin enterotoksijenik aktivitesi ile ilgili bildirilerde çok kesin olmamakla beraber gastroenterit mekanizmasının mikroorganizmaların bağırsak mukozasını istilası nedeniyle olabileceği kuramsal olarak ifade edilmektedir^{1,12}. Epidemiyolojik çalışmalarda *Salmo-*

nella türlerinin yenidoğan buzağı ishallerindeki oranı, etkenin hiç izole edilemediği olgulardan % 40'a kadar izole edildiği olgulara kadar geniş bir varyasyon göstermektedir^{1,6,9-11}. Bu oran Kars yöresinde daha önce yapılan bir çalışmada⁸ ise %1 olarak bulunmuş olmasına rağmen etkenin prevalansı yakın zamanlarda yapılan bir çalışma ile ortaya konulmamıştır.

Taksonomik olarak yine *Enterobacteriaceae* ailesi içinde yer alan *Citrobacter* spp., bağırsak mikroflorasının doğal bir parçası olarak bilinmekle beraber sporadik olarak evcil hayvanlarda ve insanlarda bazı ishal olgularında rol oynadığı bildirilmiştir^{1,3,5,7,13}. Bazı *Citrobacter* suşlarının *Escherichia coli*'nin stabil toksini (ST) benzeri toksinler ve shiga-benzeri sitotoksinler (SLT-I ve -II) ürettikleri bildirilmiş ve bu toksinleri sayesinde ishale yol açabilecekleri ifade edilmiştir^{7,13}. Bir çalışmada insanlarda ishal nedeni olan 13 verotoksijenik etkenden biri *Citrobacter freundii* olarak bulunmuştur⁵. Buzağılarda yapılan bir çalışmada ise 32 adet ishallerde bulunan bir tanesinde enteropatojenik etken olarak *Citrobacter* spp. bulunmuştur¹. Kars yöresinde ise *Citrobacter* türlerinin ishal etiyolojisindeki du-

* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

** Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

rumu bilinmemektedir.

Bu çalışmada, *Salmonella* ve *Citrobacter* türlerinin yenidoğan buzağı ishallerindeki prevalansının belirlenmesi amaç edinilmiştir. Bu çalışmanın, oldukça karmaşık olan buzağı ishallerinin etiyolojisini daha iyi anlamaya ve gerekli tedavi, kontrol ve koruma çalışmalarına yardımcı olması beklenmektedir.

MATERYAL ve METOT

Dışkı örnekleri: Kars merkez, ilçe ve köylerinde yetiştirilen farklı ırklardan 1-28 günlük ishalleri 155 buzağıdan alınan dışkı örnekleri bakteriyolojik muayenelerde kullanıldı.

***Salmonella* spp. izolasyon ve identifikasyonu:** Özenleştirme amacıyla bir öze dolusu dışkı örneği yaklaşık 1 ml Rappaport Vassilidiasis Broth (RVB, Oxoid)'a inoküle edilerek 37°C de 24 saat aerobik olarak inkübe edildi. İnkübasyon sonunda RVB'den McConkey (Oxoid) ve Brillan Green Agara (Oxoid) azaltma yöntemi ile ekimler yapılarak tekrar 37°C de 24-48 saat aerobik olarak inkübe edildi. Bu süre sonunda üreyen *Salmonella* şüpheli koloniler tekrar aynı besiyerlerine pasaj yapılarak saflaştırıldı. Bu aşamadan sonra identifikasyon amacıyla rutin bakteriyolojik yöntemler [Gram boyama, indol, metil red, sitrat, H₂S oluşumu, sorbitol fermentasyon, O-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside (ONPG, Oxoid), ureaz (urea broth, Merck), arjinin dihidrolaz (ADH), ornitin dekarboksilaz (ODC), lizin dekarboksilaz (LDC)] kullanıldı^{3,4}. Bu yöntemler sonucunda *Salmonella* spp. olarak tanımlanan suşlar polivalan O (A-I) *Salmonella* antiserumu (Bacto) kullanılarak lam aglütinasyon testi ile teyit edildi.

***Citrobacter* spp., izolasyon ve identifikasyonu:** Bir öze dolusu dışkı örneği alınarak direk olarak McConkey (Merck) agara ekim yapıldı ve 37°C de aerobik olarak 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda şüpheli koloniler saflaştırılıp bakteriyolojik yöntemler (Gram boyama, indol, metil red, sitrat, H₂S oluşumu, sorbitol fermentasyon, ureaz (Merck), ONPG (Oxoid), ADH, ODC, LDC) ile *Citrobacter* spp. olarak tanımlanarak teyit edildi^{3,4}.

BULGULAR

Bu çalışmada işlenen toplam 155 adet yenidoğan ishalleri buzağı dışkı örneklerinin 3 tanesinden *Salmonella* spp., farklı 3 tanesinden de *Citrobacter* spp. izole

ve tanımlanmıştır. *Salmonella* spp. izole edilen örnekler lokasyon bazında rastgele dağılım göstermesine karşın, *Citrobacter* spp. izole edilen üç örnekte ikisi aynı sürüden bulunmuştur. Bu sonuçlara göre hem *Salmonella* spp. hem de *Citrobacter* türlerinin ishalleri yenidoğan buzağılardaki prevalansı %1.93 olarak bulunmuştur.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Hastalık etkeninin belirlenmesi ve karakterize edilmesi, tedavi, kontrol ve koruma yöntemlerinin başarıya ulaşması için gerekli en önemli aşamalardan biridir. Bu çalışmada, ishalleri yenidoğan buzağılarda *Salmonella* spp. ve *Citrobacter* türlerinin izole ve tanımlanmaları oldukça karmaşık olan ve bir çok faktörün rol aldığı ishallerinin etiyolojisini daha iyi kavramada yardımcı olabilir. Bu etkenlerin izole edilen buzağılarda ishallerin nedeni olduğu sonucuna varmak deneysel bir enfeksiyon çalışması yapılmadığı müddetçe mümkün olmamakla beraber, ishal nedeni olabilecekleri noktasında fikir verebilirler.

Salmonella türlerinin ishalleri buzağılarda izole edilme oranı yapılan çalışmalarda % 0 ile % 40 arasında değişen büyük bir varyasyon göstermektedir^{1,6,9-11}. Bu çalışmada bulunan %1.93 oranı, Kars yöresinde daha önce yapılan bir çalışmadaki orana (%1) yakın bulunmuştur⁸. Bu durum bölgede muhtemel *Salmonella* kökenli gastroenteritlerin önemini koruduğu sonucunu ortaya koyabilir. Dünyanın değişik bölgelerinde birbirinden bağımsız yapılan çalışmalarda bulunan izolasyon oranı ile Kars bölgesinde elde edilen oran arasındaki bu büyük varyasyonun nedenleri popülasyonun direnç ve immunitesi, bakım ve besleme koşulları ile etkenin virulensi ve antijenik özelliklerindeki farklılıklar gibi birçok nedene bağlı olabilir.

Salmonellozisin bölgedeki epidemiyolojisini daha iyi kavramak için bu çalışmada cins düzeyinde tanımlanan *Salmonella* suşları tür ve serotip düzeyinde de belirlenerek antijenik ve genetik karakterizasyonları da yapılmalıdır. Bu nedenle etkenin izole edilmesi karakterizasyon çalışmalarına materyal teşkil edebilirler.

Son yıllarda *Salmonella* türlerinin patogenezesini ortaya koymak amacıyla etkenin invazyonu için gerekli InvA-H invasin virulans genleri ve makrofajlarda hücre içi hayatlarının devamı için gerekli katalaz, superoksid dismutaz, difensin gibi virulans faktörlerini kodlayan *phoP/phoQ* operonunun moleküler düzeyde belirlenmesi yaygın olarak kullanılmaktadır¹². Gelecekteki araştırmalarda bu çalışmada elde edilen *Salmonel-*

la izolatlarının moleküler teknikler ile patogenezesinin belirlenmesinin ve detaylı karakterizasyonunu hastalıkla mücadelede yardımcı olması beklenmektedir.

Doğada oldukça yaygın ve bağırsak mikroflorasının normal parçası olarak bulunan *Citrobacter* suşlarından bazıları ishal, pnömoni, yara infeksiyonu ve üriner sistem infeksiyonu gibi bazı hastalıkların etkeni olarak ortaya konulmuştur^{1,3,5,7,13}. *Citrobacter* spp., ishal nedeni olarak belirlenmiş bir çok bakteriyel, viral ve paraziter etkene göre hekimler tarafından daha az bilinmektedir. Fakat son yıllarda bu etkenlerin ürettikleri *E. coli*'nin ST benzeri ve SLT-I ve -II toksinleri sayesinde ishale neden olabilecekleri bildirilmiştir. Bu çalışmada, etkenin ishali buzağılarda varlığı ve prevalansı ortaya konularak, yöredeki ishal olgularında ayırıcı tanıda hekimler tarafından düşünülmesi gerekliliği belirlenmiştir. Gelecekteki çalışmalarda, bu araştırmada elde edilen *Citrobacter* suşlarının sitotoksitesinin ve toksin üretiminin ortaya konulması, etkenin muhtemel enterotoksijenitesinin doğasını belirlemede yardımcı olacaktır.

Salmonella ve *Citrobacter* türlerinin zoonotik karakterleri^{3,4} göz önüne alındığında ve özellikle Kars gibi, daha çok ailesel yetiştiriciliğin yapıldığı yörelerde evcil hayvanlar ile insanların oldukça yakın temasları nedeniyle, bu etkenlerin insanlardaki gastroenterit vakalarında da göz önüne alınması son derece yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

- 1 **Acres SD, Laing CJ, Saunders JR, Radostits OM:** Acute undifferentiated neonatal diarrhea in beef calves. I. Occurrence and distribution of infectious agents. *Can J Comp Med*, 39(2):116-132, 1975.
- 2 **Arda M:** Neonatal buzağılarda ishaller ve neonatal bağışıklık. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 6(2):143-166, 1988.
- 3 **Arda M, Aydın N, Ilgaz A, Minbay A, Kahraman M, İzgür M, Leloğlu N, Akay Ö, Diker KS:** Özel mikrobiyoloji. 5.baskı. Medisan, Ankara, 1999.
- 4 **Carter GR, Chengappa MM:** Essentials of Veterinary Microbiology and Mycology. 4th Ed. Lea and Febiger, 1991.
- 5 **Ball HJ, Finlay D, Zafar A, Wilson T:** The detection of verocytotoxins in bacterial cultures from human diarrhoeal samples with monoclonal antibody-based ELISAs. *Med Microbiol*, 44(4):273-6, 1996.
- 6 **Bellinzoni RC, Blackhall J, Terzolo HR, Moreira AR, Auza N, Mattion N, Micheo GL, La Torre JL, Scodeller EA:** Microbiology of diarrhoea in young beef and dairy calves in Argentina. *Rev Argent Microbiol*, 22(3):130-136, 1990.
- 7 **Schmidt H, Montag M, Bockemuhl J, Heesemann J, Karch H:** Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect Immun*, 61(2):534-543, 1993.
- 8 **Aydın F, Umur Ş, Gökçe G, Genç O, Güler MA:** Kars yöresindeki ishali buzağılarda bakteriyel ve paraziter

etkenlerin izolasyonu ve identifikasyonu. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 7(1) 7-14, 2001.

- 9 **Bulgin MS, Anderson BC, Ward AC, Evermann JF:** Infectious agents associated with neonatal calf disease in southwestern Idaho and eastern Oregon. *J Am Vet Med Assoc*, 180(10):1222-1226, 1982.
- 10 **Hall GA, Reynolds DJ, Parsons KR, Bland AP, Morgan JH:** Pathology of calves with diarrhoea in southern Britain. *Res Vet Sci*, 45(2):240-250, 1988.
- 11 **Reynolds DJ, Morgan JH, Chanter N, Jones PW, Bridger JC, Debney TG, Bunch KJ:** Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. *Vet Rec*, 119(2):34-39, 1986.
- 12 **Salyers A, Dixie A, Whitt D:** Bacterial Pathogenesis: a Molecular Approach, Second Edition, Washington, D.C., USA, ASM Press, 1994
- 13 **Guarino A, Capano G, Malamisura B, Alessio M, Guandalini S, Rubino A:** Production of *Escherichia coli* STa-like heat-stable enterotoxin by *Citrobacter freundii* isolated from humans. *J Clin Microbiol*, 25(1):110-114, 1987.

Yazışma adresi (Correspondence address)

Yrd.Doç.Dr.Ahmet ÜNVER
Kafkas Üniversitesi Veteriner Fak.
Mikrobiyoloji AD, 36100 KARS, TÜRKİYE
Tel: +90 474 2426800
Fax: +90 474 2426853
e-mail: ahmetunver@hotmail.com