

Sağlıklı Köpek Dışkılarından Oksidaz Pozitif Gram Negatif Bakterilerin İzolasyon ve İdentifikasyonu ile Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Ebubekir CEYLAN¹Hanefi KÖRKOCA²Hamza BOZKURT²Muhammed G. KURTOĞLU²Zahid T. AĞAOĞLU³Mustafa BERKTAŞ²¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, VAN.²Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, VAN.³Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, VAN.

ÖZET

Çalışmada, Van yöresindeki köpeklerden alınan gaita örneklerinden oksidaz pozitif Gram negatif basillerin izolasyon ve identifikasyonu ile antimikrobiyal ajanlara duyarlılıklarının araştırılması amaçlandı. Bu amaçla, köpeklerden alınan 55 gaita örneği uygun besiyerlerine ekim yapılarak şüpheli kolonilerden hareket, Gram boyama ve oksidaz testleri yapıldı. Uygun bakterilerin identifikasyon ve antibiyogramlarının saptanması için Sceptor Gram Negatif ID panelleri (Panel code: 430, Beckton Dickinson-USA) kullanıldı. Çalışmada birer adet *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*) (%1.82), *Pasteurella haemolytica* (*P. haemolytica*) (%1.82), *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) (%1.82), *Aeromonas sobria* (*A. sobria*) (%1.82), iki adet *Aeromonas caviae* (*A. caviae*) (%3.63), üç adet *Vibrio alginolyticus* (*V. alginolyticus*) (%5.45) ve 10 adet *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (%18.18) olmak üzere toplam 19 (%34.5) oksidaz pozitif Gram negatif bakteri saptanmıştır. İzole edilen suşların 20 antibiyotiğe (amikasin, amoksisilin-klavulanat, ampisilin, ampisilin/sulbaktam, aztroneam, sefazolin, sefoperazon, sefotaksim, sefotetan, seftazidim, seftriakson, sefuroksim, siprofloksasin, gentamisin, imipenem, piperasilin, tikarsilin, tikarsilin/klavulanat, tobramisin ve trimetoprim/sulfametoksazol) karşı duyarlılık durumları araştırıldı. Duyarlılık testleri sonucunda; *P. haemolytica*, *P. fluorescens*, ve *V. alginolyticus*'ün suşlarının tüm ajanlara duyarlı olduğu, *P. multocida* suşunun ampisilin, ampisilin/sulbaktam ve trimetoprim/sulfametoksazole, *A. sobria* suşunun ampisilin ve ampisilin/sulbaktama dirençli olduğu saptanmıştır. İki *A. caviae* suşunun ikisi de ampisilin ve ampisilin/sulbaktama dirençli bulunmuş, ayrıca suşlardan birisinin aztroneama da dirençli olduğu tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* suşlarının sefoperazona %40, aztroneama %70, sefotetana ise %90 oranında direnç gösterdikleri, diğer antimikrobiyal ajanlara ise duyarlı oldukları saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Oksidaz pozitif Gram negatif basil, antimikrobiyal duyarlılık, köpek.

Isolation, identification and antimicrobial sensitivities of oxidase positive Gram negative bacteria from healthy dogs

SUMMARY

In this study, to determine oxidase positive Gram negative microorganisms and their sensitivities to antimicrobial agents isolated from dog faeces in and around Van was aimed. For this purpose stool specimens from 55 dogs were cultured and oxidase, Gram stain and motility tests were performed in suspected colonies. Sceptor Gram Negatif ID panels (Panel code: 430, Beckton Dickinson-USA) were used for identification of bacteria and antibiogram tests. Totally 19 (34.5%) oxidase positive Gram negative bacteria were isolated from 55 stool specimens including; one *P. fluorescens* (%1.82), *P. haemolytica* (%1.82), *P. multocida* (%1.82), *A. sobria* (%1.82), two *A. caviae* (%3.63), three *V. alginolyticus* (%5.45) and 10 *P. aeruginosa* (%18.18). Antimicrobial susceptibilities of the strains against 20 antimicrobial agents (Amikacin, amoxicillin-clavulanate, ampicillin, ampicillin/sulbactam, aztroneam, cefazolin, cefoperazone, cefotaxime, cefotetan, ceftazidime, ceftriaxone, cefuroxime, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, piperacillin, ticarcillin, ticarcillin/clavulanate, tobramycin ve trimethoprim/sulfamethoxazole) were investigated. The susceptibility tests showed that the strains of *P. haemolytica*, *P. fluorescens*, and *V. alginolyticus* were susceptible to all agents, the strain of *P. multocida* is resistant to ampicillin, ampicillin/sulbactam and trimethoprim/sulfamethoxazole, the strain of *A. sobria* is resistant to ampicillin and ampicillin/sulbactam. *A. caviae* strains were found to be resistant to ampicillin/sulbactam and aztroneam at the rate of 50%, and *P. aeruginosa* strains were resistant to cefoperazone, aztroneam, cefotetan at the rate of 40, 70, 90% respectively and this strain was susceptible to all of other agents.

Key Words: Oxidase positive, gram negative, basil, antimicrobial sensitivity, dog.

GİRİŞ

Hareketli *Aeromonas*'lar hayvanlarda (1,2,3) ve insanlarda (4) hastalık etkeni olarak tanınmaktadır.

Pasteurella haemolytica koyun, sığır ve domuzlarda daha çok pnömonik pastörellozise neden olmaktadır. *P. multocida*'ya ise köpeklerde yara enfeksiyonuna rastlanırken, pastörelloz insanlarda daha çok kedi ve köpek ısırması sonucu meydana gelmektedir. *P. multocida* lokal enfeksiyonlardan başka meningit, puerperal sepsis, pneumoni ve akut apandisitlere neden olmaktadır (5).

Pseudomonas aeruginosa köpek ve kedilerde prostatit, sistit, dermatit, postoperatif septisemi, kulak enfeksiyonu ve endokarditise neden olurken; insanlarda yara, üriner enfeksiyon, korneal, iç kulak enfeksiyonları ile trake,

akciğerler, kalp kapakçıkları, meninksler ve beyin sapını kapsayan öldürücü enfeksiyonlara, ayrıca septisemi, osteomyelit, artrit, sellulit, flebit, intestinal enfeksiyon sonucu diyare ve nozokomiyal enfeksiyonlara neden olmaktadır (6). *Pseudomonas fluorescens* düşük virulansa sahip olmasına rağmen potansiyel bir patojen olarak düşünülmektedir (7).

Vibrio alginolyticus balıklarda septisemik hastalığa neden olmaktadır (5).

Çalışmada insan ve hayvanlardaki önemi yukarıda açıklanan oksidaz pozitif Gram negatif bakterilerin köpek dışkılarında varlığının araştırılması ve antimikrobiyal ajanlara duyarlılıklarının tespiti amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Van yöresindeki klinik olarak sağlıklı 55 sokak köpeği çalışma kapsamına alındı. Bu köpeklerden alınan rektal örnekler, ön zenginleştirme amacıyla Alkali Peptonlu Suya (APS; Peptone 10 gr, NaCl 5 gr, distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve pH 1N NaOH ile 8.4'e ayarlanarak 121°C'de 15 dakika sterilize edildi) alındı. Diğer besiyerleri olarak Aeromonas Selective Agar (Oxoid, CM 833+ Ampicillin Selective Supplement SR 136), %5 koyun kanlı agar ve Eosin Metilen Blue (EMS Agar, Oxoid) agar besiyerleri kullanıldı.

Çalışma iki seri şeklinde yapıldı. Steril eküvyonlarla alınan rektal içerikler, hareketli aeromonaslar yönünden incelenmek üzere APS'ye alınarak 28°C'de bir gece inkube edildikten sonra buradan Aeromonas Selective Agar'a ekim yapıldı. 37°C'de bir gece aerobik ortamda inkubasyondan sonra şüpheli kolonilerin oksidaz aktiviteleri, oksidaz identifikasyon stikleri (Oxidase Br 64, Oxoid) kullanılarak tespit edildi. Oksidaz pozitif Gram negatif, hareketli bakteriler identifikasyon amacıyla Sceptor Gram Negative Enteric ID Panel (Beckton-Dickinson, USA)'e alındı. *A. caviae*/*A. hydrophila* şeklinde identifiye edilen mikroorganizmalara Voges-Preskauer (VP) testi uygulandı. VP testi sonucunda pozitif olanlar *A. hydrophila*, VP negatif olanlar *A. caviae* olarak identifiye edildi.

İkinci seri çalışmada steril eküvyonlarla alınan rektal içeriklerden direk EMB agar ve %5 koyun kanlı agara ekim yapıldı. 37°C'de 24 saatlik aerobik ortamda inkubasyondan sonra üreyen kolonilerin oksidaz aktiviteleri belirlendi. Oksidaz pozitif Gram negatif bakteriler Sceptor Gram Negative Enteric ID Paneline alınarak identifiye edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 55 gaita örneğinden birer adet *P. fluorescens* (%1.82), *P. haemolytica* (%1.82), *P. multocida* (%1.82), *A. sobria* (%1.82), iki adet *A. caviae* (%3.63), üç adet *V. alginolyticus* (%5.45) ve 10 adet *P. aeruginosa* (%18.18) olmak üzere toplam 19 (%34.5) oksidaz pozitif gram negatif basil saptandı.

Bu suşların 20 çeşit antimikrobiyal ajana karşı duyarlılıkları araştırıldı. Çalışılan antimikrobiyal ajanlar: Amikasin, amoksisilin-klavulanat, ampisilin, ampisilin/sulbaktam, aztroneam, sefazolin, sefoperazon, sefotaksim, sefotetan, seftazidim, seftriakson, sefuroksim, siprofloksasin, gentamisin, imipenem, piperasilin, tetrasiklin, tikarsilin, tikarsilin/klavulanat, tobramisin ve trimetoprim/sulfometoksazol olup *P. fluorescens*, *V. alginolyticus*, ve *P. haemolytica*'nın tüm suşlarının bu 20 adet antimikrobiyal ajana duyarlı oldukları saptandı.

Amikasin, seftazidim, seftriakson, siprofloksasin, gentamisin, imipenem, piperasilin, tikarsilin/klavulanat ve tobramisine *P. aeruginosa*'nın tüm suşları duyarlı iken, aztroneama %30 (3), sefoperazona %60 (6) ve sefotetana ise sadece %10 (1)'unun duyarlı olduğu saptandı. İzole edilen bir *P. multocida* suşunun, ampisilin, ampisilin/sulbaktam ve trimetoprim/sulfometoksazol dışındaki antimikrobiyal ajanlara, *A. sobria* suşunun ise ampisilin ve ampisilin/sulbaktam dışındaki antimikrobiyal ajanlara duyarlı oldukları tespit edildi. *A. caviae* suşlarının her ikisinin ampisilin ve ampisilin/sulbaktama direnç gösterdiği,

suşlardan birinin ayrıca aztroneama dirençli olduğu, her iki suşun da diğer tüm antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlı olduğu saptandı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışma konusu olan oksidaz pozitif Gram negatif bakteriler, insan ve hayvanların dışkılarında normal flora üyesi olarak bulunabilen ancak fırsatçı patojen olarak tanımlanan bakterilerdir. Köpeklerin gastrointestinal sisteminde bu bakterilerin saptanması da gerek köpeklerde infeksiyon etkeni olabilmeleri, gerekse bu etkenlerin insanlara geçerek zoonotik infeksiyonlara yol açabilme riski nedeniyle önemlidir.

Bu konuda yapılan benzer bir çalışmada Ghenghes ve ark. (8), 120 köpeğe ait rektal örnekten 13 (%10.8), 15 kediye ait rektal örnekten ise 1 (%6.7) adet *Aeromonas* spp. izole ettiklerini bildirmişlerdir. Evcil hayvanlardan hareketli aeromonasları ilk defa izole eden Gray (9), çoğu izolatin amoksisilin (%97.6), karbenisilin (%94.1) ve sefradin (%71.8)'e dirençli olduğunu, bazı izolatlardan ise sulfametoksazol (%16.5), trimetoprim (%10.6) ve tetrasiklin (%4.7)'e dirençli olduklarını bildirmiştir.

Martin ve ark. (10), köpeklerin kronik otitis eksterna olgularından izole ettikleri *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* ve *Pseudomonas* spp. suşlarının antibakteriyal duyarlılıkları ile ilgili çalışmada en etkili antibiyotiklerin; tobramisin (%100 duyarlılık), marbofloksasin (%91.3) ve seftazidim (%91.3) olduğunu, tedavide; tikarsilin ve gentamisin ile iyi sonuçlar alındığını (sırasıyla duyarlılıkları %86, %65.2), enrofloksasin'e duyarlılığın düşük olduğunu (%52.1) bildirmişlerdir. van den Haven ve ark (11), köpek bakteriyel izolatlara karşı difloksasin'in in vitro aktivitesiyle ilgili çalışmalarından *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı postantibiyotik etkinin gözlemlenmediğini bildirmişlerdir. Normand ve ark. (12), sağlıklı olmayan kedi ve köpeklerden izole ettikleri bakteriyel izolatlara karşı gelişen antimikrobiyal direnç ile ilgili yaptıkları çalışmada; *E. coli*, *Proteus* spp. ve *Pseudomonas* spp. türlerine karşı çoklu ilaç direncinde önemli bir artış eğilimi gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Muhairva ve ark (13), tavuklarda %0.7, ördeklerde %1, köpeklerde %1, kedilerde %68 oranında *Pasteurella multocida* spp *multocida* izole etmişler, bu çalışmalarında Afrika'da köpek ve kedilerden ilk defa sınıflandırılmamış *Pasteurella* türlerinin izolasyonunu gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar (13, 14) ayrıca köpek ve kedilerin serbest yetiştirilen kanatlılara *P. multocida*'yı bulaştırabileceklerini bildirmektedirler. Hareketli aeromonaslar ile ilgili moleküler düzeyde yapılan çalışmalarla bu etkenlerin hayvanlar ve insanlar arasındaki bulaşmaları ortaya konmuştur (14, 15).

İnsanlar ve hayvanlar için patojen olan hareketli aeromonaslar, *P. aeruginosa* ve *P. multocida*'nın köpeklerdeki varlığı, köpeklerin sağlığı açısından olduğu kadar insan sağlığı açısından da önem arz etmektedir. Ancak köpekler ve insanlar ile ilgili böyle bir epidemiyolojik yaklaşıma geçerlilik kazandırmak, moleküler düzeyde yapılacak çalışmalar ile mümkün olabilir. Bununla birlikte bu etkenlerin köpeklerde ve insanlarda patojen olarak saptanabilmesi, bu etkenlerin antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesini de önemli kılmaktadır.

Çalışma sonucunda izole edilen çeşitli bakterilerin antibiyotiklere duyarlılık paternleri, bu bakterilerin etken olduğu düşünülen infeksiyonlarda ve antibiyogram yapılamadığı durumlarda uygulanacak tedavi protokollerinin oluşturulmasına da katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

- 1- Shotts EB, Gains JL, Martin C, Prestwood AK (1972): *Aeromonas* induced deaths among fish and reptiles in a eutrophic inland lake. JAVMA., 161: 603-607.
- 2- Marcus LC (1971): Infectious diseases of reptiles. JAVMA., 159: 1629-1631.
- 3- Haley R, Davis SP, Hyde JM (1967): Environmental stress and *Aeromonas liquefaciens* in American and threadfin shad mortalities. Prog. Fish. Cult., 29: 193-194.
- 4- Davis WA, Kane JG, Garuguni VG (1978): Human *Aeromonas* infection: a review of the literature and a case report of endocarditis. Medicine., 57: 267-277.
- 5- Arda M, Aydın N, Ilgaz A, Minbay A, Kahraman M, İzgür M, Leloğlu N, Akay Ö, Diker KS (1997): Özel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi. No:26. 4. Baskı, Ankara.
- 6- Carter GR, Chengoppo MM, Roberts AW (1995): Essentials of Veterinary Microbiology. 5th ed. Williams and Williams Co., Baltimore, USA.
- 7- Von Graevenitz A. and Weinstein J (1971): Pathogenic significance of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. Yale J. Biol. Med., 43: 265-273.
- 8- Ghenghes KS, Abeid SS, Daber MM, Ben-Taker SA (1999): Isolation and haemolytic activity of *Aeromonas* species from domestic dogs and cats. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 22, 3: 175-179.
- 9- Gray SJ (1984): *Aeromonas hydrophila* in livestock: incidence, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility. J. Hyg., 92: 365-375.
- 10- Martin Barrasa JL, Lupiola Gomez P, Gonzalez Lama Z, Tejedor Junco MT (2000): Antibacterial susceptibility patterns of *Pseudomonas* strains isolated from chronic canine otitis externa. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health., 47, 3:191-196.
- 11- van den Hoven R, Wagenaar JA, Walker RD (2000): In vitro activity of difloxacin against canine bacterial isolates. J. Vet. Diagn. Invest., 12, 3: 218-223.
- 12- Normand EH, Gibson NR, Reid SW, Carmichael S, Taylor DJ (2000): Antimicrobial-resistance trends in bacterial isolates from companion community practice in the UK. Prev. Vet. Med., 46, 4:267-278.
- 13- Muhairwa AP, Mtambo MM, Christensen JP, Bisgaard M (2001): Occurance of *Pasteurella multocida* and related species in village free ranging chickens and their animal contacts in Tanzania. Vet. Microbiol., 78, 2:139-153.
- 14- Korkoca H (2001): Tavuk, martı ve Gökkuşuğu Alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) dışkılarından izole edilen hareketli aeromonas türleri ve SDS-PAGE yöntemi ile protein profillerinin tespiti. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2001, Van.
- 15- Esteban J, Gadea I, Fernandez-Roblas R, Molleja A, Calvo R, Acebron V, Soriano F. (1999): Pseudo-outbreak of *Aeromonas hydrophila* isolates related to endoscopy. J. Hosp. Infect., 41, 4:313-316.