

BOĞALARDAN CAMPYLOBACTER FETUS SUBSP. VENEREALIS VE CAMPYLOBACTER SPUTORUM SUBSP. BUBULUS İZOLASYONU

K. Serdar DİKER (*) Nafiz YURDAYDIN (**) Fuat AYDIN (*)

G İ R İ Ş

Campylobacter fetus subsp. venerealis sığırların genital sistemlerinde bulunan ve «veneral kampilobakteriozis»e neden olan bir mikroorganizmadır. Daha önceki yıllarda Vibrio fetus, V.fetus var.venerealis ve C.fetus subsp.fetus gibi adlarla anılan bu mikroorganizma, son yıllardaki sınıflandırma çalışmaları sonucunda C.fetus subsp.venerealis olarak adlandırılmıştır (8). Bu etkenin neden olduğu veneral kampilobakteriozis, ineklerde gebeliğin çeşitli dönemlerinde abortus, erken embryo ölümü ve infertilite ile karakterize bir infeksiyondur (3, 16, 23). C.fetus subsp.venerealis boğaların genital kanallarına iyi adapte olmuştur ve hiçbir klinik belirtiyeye neden olmaksızın boğa prepusyumunda yerleşebilir (11, 16). İnfeksiyonun başlıca kaynağı bu taşıyıcı boğalardır. Gerekli kontrol önlemleri uygulanmayan sürülerde boğaların % 20-50'sinin etkeni taşıyabildikleri bildirilmiştir (4, 9, 14, 21).

Boğa prepusyumundan izole edilebilen diğer bir Campylobacter türü C.sputorum subsp.bubulus'tur. Bu mikroorganizma da daha önceleri V.bubulus ve V.sputorum subsp.bubulus adları ile bilinmekteydi (7, 8). C.sputorum subsp.bubulus sadece sığır ve koyun genital sistemlerinde, özellikle boğa ve koç prepusyumlarında yerleşen apatojenik bir bakteridir (7, 22). Hayvanlarda bu etkenden

(*) A.Ü. Veteriner Fakültesi, Bakteriyoloji Bilim Dalı, Ankara.

(**) A.Ü. Veteriner Fakültesi, Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Dalı, Ankara.

ileri gelen genital sistem ile ilgili herhangi bir hastalık bildirilmemiştir (19).

Bu çalışmada boğalardan *C.fetus* subsp.*venerealis* ve *C.sputorum* subsp.*bubulus* izolasyonları ve önemlerinin bildirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Prepusyal örnekler : Araştırmada, çeşitli yaşlarda 13 adet boğa kullanıldı. Bu boğaların 2-5 ml prepusyal sıvıları steril pamuklu çubuklar yardımı ile steril tüplere toplandı. (Prepusyal örneklerin toplanmasında, ayrıca yıkantı sıvısı kullanılmadı). Toplanan örnekler, Gas-Pak (Oxoid) zarfları ile mikroaerofilik ortamın sağlandığı katalizörsüz anaerobik jar içinde, en geç 3 saatte laboratuvara taşındı.

Campylobacter izolasyonu : Campylobacter türlerinin izolasyonu için selektif besiyeri kullanıldı. Prepusyal sıvılar, pamuklu çubuklar ile, antibiyotik (2500 IU polymyxin B, 5 mg trimethoprim, 5 mg rifampicin, 50 mg actidione/litre) içeren % 7 koyun kanlı agara ekildi. Besiyerleri mikroaerofilik koşullarda (% 5 O₂, % 10 CO₂, % 85 N₂) 37°C'de, gün aşırı kontrol edilerek 9 gün inkübe edildi.

Campylobacter identifikasyonu : Şüpheli koloniler Gram yöntemi ile boyanarak, Gram negatif, «S» ve spiral şeklinde olanlar ayrıldı. Bu suşların oksidaz, nitrat testleri ve karanlık sahada hareket muayeneleri yapıldı. İzole edilen Campylobacter suşları, Smibert (20) ve Morris ve Patton (12) tarafından bildirilen üreme, tolerans ve biyokimyasal özelliklerine göre türlere ayrıldı (Tablo 1). *C.fetus* subsp.*venerealis* ve *C.sputorum* subsp.*bubulus*'un birbirlerinden ve diğer Campylobacter türlerinden ayırımında 25°C ve 42°C de üreme, % 1 glisin ve % 3.5 NaCl'e tolerans, H₂S (TSI agarda), katalaz ve selenit testleri kullanıldı.

İdentifiye edilen suşlar *C. fetus* subsp.*venerealis* referens antiserumu ile lam aglütinasyon testine tabi tutuldu.

Ayrıca, suşların antibiyotiklere duyarlılığı disk difüzyon yöntemi ile incelendi.

B U L G U L A R

İncelenen 13 adet prepusyal sıvı örneğinin 4'ünden (% 30) *Campylobacter* türleri izole edildi. İzole edilen *Campylobacter* suşlarından bir tanesi *C.fetus* subsp.*venerealis*, ikisi *C.sputorum* subsp. *bubulus* olarak tanımlandı. Diğer suş izolasyondan sonra pasajlar sırasında yaşatılmadığından kesin tür ayrımı yapılamadı. Bu suş katalaz testinde pozitif reaksiyon verdiği için katalaz pozitif *Campylobacter* olarak değerlendirildi.

TABLO 1. *Campylobacter* türlerinin ayırımında kullanılan testler.

TESTLER	T ü r l e r *						
	CFV	CFF	CSB	CSM	CSS	TCT	CF
Üreme t.							
25°C	+	+	-	-	-	-	-
42°C	-	-	+	+	+	+	+
Tolerans t.							
% 1 Glisin	-	+	+	-	+	+	+
% 3.5 NaCl	-	-	+	-	-	-	+
Biyokimyasal t.							
Katalaz	+	+	-	-	-	+	+
Selenit	-	+	+	+	+	+	+
H ₂ S (TSI)	-	-	+	+	+	-	+

(*) = CFV, *C.fetus* subsp. *venerealis*; CFF, *C.fetus* subsp.*fetus*; CSB, *C.sputorum* subsp.*bubulus*; CSM, *C.sputorum* subsp.*mucosalis*; CSS, *C.sputorum* subsp. *sputorum*; TCT, termofilik *Campylobacter* türleri; CF, *C.fecalis*.

İzole edilen *C.fetus* subsp.*venerealis* ve *C.sputorum* subsp.*bubulus*, Tablo 1'de belirtilen özelliklere uygun bulundular. Tüm suşların oksidaz, nitrat pozitif ve hareketli oldukları saptandı. *C.fetus* subsp.*venerealis* suşu katalaz pozitif, selenit ve H₂S negatif bulundu, 25°C'de üredi, 42°C'de, % 1 glisin ve % 3.5 NaCl varlığında üremedi. *C.sputorum* subsp.*bubulus* suşları ise, katalaz negatif, H₂S ve selenit pozitif bulundu, 25°C'de üremedi. 42°C'de, % 1 glisin ve % 3.5 NaCl varlığında üredi.

C.fetus subsp.*venerealis* referens antiserumu ile katalaz pozitif *Campylobacter* suşu ve *C.fetus* subsp.*venerealis* izolatu pozitif, *C.sputorum* subsp.*bubulus* izolatları ise negatif aglütinasyon verdi.

C.fetus subsp.venerealis penisiline dirençli, streptomisin, am-pisilin, tetrasiklin, kloramfenkol, kanamisin, neomisin ve gentami-sine duyarlı bulundu. C.sputorum subsp.bubulus suşları ise strep-tomisine dirençli diğer tüm antibiyotiklere duyarlı bulundu.

C.fetus subsp.venerealis 7 yaşındaki esmer mık bir boğadan, ka-talaz pozitif Campylobacter suşu 5 yaşındaki bir simental boğadan, C.sputorum subsp.bubulus suşları ise 2 ve 4 yaşlarındaki iki esmer boğadan izole edildiler.

T A R T I Ş M A

Bu çalışmada 13 boğadan 4 Campylobacter suşu izole edilmiş-tir. Bir suşun tür ayrımı kesin olarak yapılamamış olmasına rağmen, katalaz pozitif bulunması ve C.fetus subsp.venerealis antise-rumu ile serolojik kros reaksiyon vermesi, bu suşun da aynı türden olma ihtimalini kuvvetlendirmiştir. Buna göre Campylobacter izo-latlarının ikisi sığırlarda venereal kampilobakteriozis etkeni olarak değerlendirilebilecektir. Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda, kontrol önlemleri alınmayan boğaların yüksek oranda taşıyıcı ol-dukları belirlenmiştir. Garcia ve ark. (9), infertilite sorunları olan sürülerde kullanılan 13 boğanın prepusyal yıkantılarının 6'sında, Clark ve ark. (4), 28 boğanın 9'unda, Plastridge ve ark. (14) 74 boğa-nın % 44.5'da C.fetus subsp.venerealis bulduklarını bildirmişlerdir. Ayrıca, prepusyal sıvısında bu mikroorganizmaya raslanan boğala-rın tüme yakınının spermaları da aynı etken ile kontamine bulun-muştur (5, 21).

Bu araştırma sırasında boğalardan sperma temin etmek ve boğaların tohumladıkları ineklerin fertilitate oranlarını saptamak mümkün olmamıştır. Ancak boğaların bir kısmının taşıyıcı olduğu çeşitli sürüleri inceleyen diğer araştırmalarda bu oran oldukça dü-şük bulunmuştur (3, 9).

Ayrıca patojenik kabul edilen iki Campylobacter suşu bu ça-lışmada 5 ve 7 yaşlarındaki boğalardan izole edilmiştir. Çeşitli araş-tırmacılar, yaşlı boğalarda Campylobacter'lerin fazla bulunmasını, bak-terinin yaşlı boğaların epitel döküntü boşluklarında (kript) kolayca yerleşmesine bağlamaktadırlar (8, 11).

Bu çalışmada iki boğadan izole edilen *C.sputorum* subsp.bubulus ise apatojenik kabul edilmesi nedeniyle üzerinde fazla durulmayan bir bakteridir. Bisping ve ark. (2) boğaların % 36'sında ve Roslanowski ve ark. (15) dondurulmuş spermaların % 77.3'ünde bu bakteriyi bulduklarını bildirmişlerdir.

İzolasyon yöntemleri bakımından değerlendirildiğinde, selektif izolasyon yönetiminin *Campylobacter* türlerinin izolasyonu için kullanışlı olduğu anlaşılmıştır. Prepusyal örneklerin çok sayıda kontaminant bakteri içermesi direk ekim ile *Campylobacter* izolasyonunu imkânsız kılmaktadır (17). Bu nedenle birçok araştırmacı filtrasyon yöntemini ve selektif yöntemi denemişlerdir (10, 18). Bu iki yöntemi karşılaştıran Bisping ve ark. (2), aynı örneklerden filtrasyon yöntemi ile % 5.9, selektif yöntemle ise % 14.2 oranında *C.fetus* subsp.venerealis izole ettiklerini açıklamışlardır.

İzole edilen suşların antibiyotiklere duyarlılıkları incelendiğinde *C.fetus* subsp.venerealis'in denenen tüm antibiyotiklere duyarlı olmasına karşın, penisiline, *C.sputorum*'un streptomisine dirençli olduğu görülmüştür. Bu bulgular diğer araştırma sonuçları ile uygunluk göstermektedir (13). Türkiye'de suni tohumlamada kullanılan spermalara da penisilin ve streptomisin katılmaktadır. *Campylobacter*lerin sperma içinde inhibisyonu yönünden değerlendirildiğinde, antibakteriyel etkiyi tek bir antibiyotiğin etkisine bırakmak riskli görülmektedir. Nitekim, Aydın ve ark. (1) her tür bakteriyel floraya etkili ampisilin ve kloramfenikolün kullanılmasını önermişlerdir.

Veneral kampilobakteriozisin sığırların infertilite olaylarındaki rolü ve neden olduğu ekonomik kayıp batı ülkelerinde 1950'li yıllarda farkedilerek yoğun çalışmalara başlanmıştır. Bu ülkelerde uygulanan etkili kontrol yöntemleri sayesinde veneral kampilobakteriozis çok seyrek sporadik vak'alar halinde seyreden bir infeksiyon durumuna gelmiştir (6). Türkiye'de ise *C.fetus* subsp.venerealis ve *C.sputorum* subsp.bubulus'un boğa prepusyumlarından izolasyonu bu çalışma ile ilk kez bildirilmektedir. Bu nedenle, veneral kampilobakteriozisin infertilite ve abortus ile yol açabileceği olası ekonomik kayıplar da gözönüne alınarak, boğaların *Campylobacter* türleri yönünden geniş bir şekilde taranması yararlı olacaktır.

Ö Z E T

Bu çalışmada, selektif izolasyon yöntemleri kullanılarak boğalarda *Campylobacter* türleri araştırıldı. İncelenen 13 boğanın 4'ünden *Campylobacter* suşları izole edildi. Yedi yaşlı bir boğadan izole edilen suş *C.fetus subsp.venerealis* olarak tanımlandı. İki ve dört yaşlarındaki boğalardan izole edilen iki suşun ayrımı *C.sputorum subsp.bubulus* olarak yapıldı. Beş yaşında bir boğada bulunan ve pasajlar sırasında kaybedilen bir suş katalaz pozitif *Campylobacter* olarak değerlendirildi. *C.fetus subsp.venerealis* penisiline, *C.sputorum subsp.bubulus* suşları ise streptomisine dirençli bulundu. *Campylobacter*lerin venereal kampilobakteriozisteki rolleri gözden geçirildi ve bunun Türkiye'deki durumu tartışıldı.

S U M M A R Y

In this study, bulls were investigated for *Campylobacter* sp. by selective isolation technique. Four *Campylobacter* strains were isolated from 13 bulls. One strain isolated from a 7 years old bull was identified as *C.fetus subsp.venerealis*. Two strains isolated from 2 and 4 years old bulls were identified as *C.sputorum subsp.bubulus*. One strain which been lost during passages was isolated from a 5 years old bull and evaluated as catalase positive campylobacter. *C.fetus subsp.venerealis* was resistant to penicilline and *C.sputorum subsp.bubulus* strains were resistant to streptomycine. The role of *Campylobacter* strains in venereal campylobacteriosis was reviewed and its current status in Turkey was discussed.

KAYNAKLAR

- 1 — AYDIN, N., TEKİN, N., YURDAYDIN, N. ve SEVİNÇ, A. (1984) : Boğa spermasındaki bakteriyel floraya chloramphenicol ve ampicilline'in etkisi. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 31: 346-352.
- 2 — BİSPING, W., KIRPAL, G. und SONNENSCHNEIN, B. (1981) : Die diagnose und bekämpfung der Campylobacter fetus subsp.fetus infektion beim besamungsbullen. Tierarztl. Umsch., 36: 667-674.
- 3 — CLARK, B.L. (1971) : Review of bovine vibriosis. Aust. Vet. J., 47: 103-107.
- 4 — CLARK, B.L., MONSBOURGH, M.J. and DUFTY, J.H. (1974) : Isolation of Campylobacter fetus subsp.venerealis and Campylobacter fetus subsp.intermedius from the preputial secretions of bulls. Aust. Vet. J., 50: 324.
- 5 — DUNN, H.O., BURDA, K., WAGNER, W.C. and GILMAN, H.L. (1965) : Isolation of Vibrio fetus from bovine semen. Cornell Vet., 55: 220-229.
- 6 — FINLAY, R.C., RUCKERBAUER, G.M. and STOVELL, P.L. (1985) : Campylobacter fetus in artificial insemination unit and slaughterhouse bulls in Ontario. Can. J. Comp. Med., 49: 231-232.
- 7 — FIREHAMMER, B.D. and LOVELACE, S.A. (1961) : The isolation of Vibrio bubulus (Florent) from sheep. Am. J. Vet. Res., 22: 449-460.
- 8 — GARCIA, M.M., EAGLESOME, M.D. and RIGBY, C. (1983) : Campylobacters important in veterinary medicine. Vet. Bull., 53: 793-818.
- 9 — GARCIA, M.M., EAGLESOME, M.D., HAWKINS, C.F., ALEXANDER, F.C.M. (1980) : Campylobacteriosis in Jamaican cattle. Vet. Rec., 106: 287-288.
- 10 — GARCIA, M.M., RUCKERBAUER, G.M., EAGLESOME, M.D., BOISCLAIR, W. E. (1983) : Detection of Campylobacter fetus in artificial insemination bulls with a transport enrichment medium. Can. J. Comp. Med., 47: 336-340.
- 11 — HOFFER, M.A. (1981) : Bovine campylobacteriosis: a review. Can. Vet. J., 22: 327-330.
- 13 — PLASTRIDGE, W.N. and KOTHS, M.E. (1961) : Antibiotic sensitivity of bovine vibrios. Am. J. Vet. Res., 22: 864-866.
- 14 — PLASTRIDGE, W.N., WALKER, E.C., WILLIAMS, L.F., STULA, E.F. and KIGGINS, E.M. (1957) : Isolation of Vibrio fetus from bulls. Am. J. Res., 18: 575-578.

- 15 — ROSLANOWSKI, K., PEDERSEN, C.H. and WIERZBOWSKI, S. (1985) : The effect of freezing semen and preputial flushings on subsequent examination for Campylobacter species. Br. Vet. J., 141: 269-271.
- 16 — SCANLAN, C.M. and HATHCOCK, T.L. (1983) : Bovine campylobacteriosis. Auburn Vet., 4: 18-23.
- 17 — SEVİNÇ, A., İSTANBULLUOĞLU, E. ve YURDAYDIN, N. (1983) : Suni tohumlama istasyonlarındaki boğaların sperma ve prepusyal yıkantılarının bakteriyel florası üzerinde çalışmalar. Doğa Bilim Derg. Vet. Hayv., 7: 185-188.
- 18 — SHEPLER, V.M., PLUMER, G.J. and FABER, J.E. (1963) : Isolation of Vibrio fetus from bovine preputial fluid, using millipore filters and an antibiotic medium. Am. J. Vet. Res., 24: 749-755.
- 19 — SMIBERT, R.M. (1978) : The genus Campylobacter. Ann. Rev. Microbiol. 32: 673-709.
- 20 — SMIBART, R.M. (1984) : Campylobacter. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Ed. N.R. KRIEG, J.G. HOLT, p. 111-118, Williams and Wilkins, Baltimore.
- 21 — WAGNER, W.C., DUNN, H.O. and VANVLECK, L.D. (1965) : Incidence of vibriosis in an AI stud. Cornell Vet., 55: 209-220.
- 22 — WALSH, A.F. and WHITE, F.H. (1968) : Biochemical and serologic characteristics of vibrio isolants from cattle. Am. J. Vet. Res., 29: 1377-1383.
- 23 — WARE, D.A. (1980) : Pathogenicity of Campylobacter fetus subsp.venerealis in causing infertility in cattle. Br. Vet. J., 136: 301-303.