

Kısa Bilimsel Çalışma / Short Communication

Bir tavşanda doğal *Pasteurella multocida* enfeksiyonu: patolojik ve mikrobiyolojik bulgular

Mehmet Eray ALÇIĞIR¹, Sevil ATALAY VURAL¹, Kaan MÜŞTAK², Arda Selin TUNÇ¹

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, ¹Patoloji Anabilim Dalı; ²Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Özet: Olguda 4,5 yaşlı dişi bir tavşanda karşılaşılan generalize pasteurellozis patomorfolojik ve mikrobiyolojik olarak tanımlanmıştır. Makroskopik olarak tavşanın sağ boyun bölgesinde 6x4x3 cm boyutlarında fluktuan kıvamlı, kesit yüzünden koyu kıvamda beyazımsı renkte sıvı sızan bir kitle fark edildi. Akciğerlerde özellikle apikal loblarda hepatize alanlar, karaciğerde toplu iğne başı büyüklüğünde beyaz renkli odaklar dikkati çekti. Boyunda karşılaşılan kitlenin subkutanöz apse olduğu gözlemlendi. Ayrıca akciğerde akut kataral bronkopnömoni, fokal plöritis, karaciğerde multifokal nekrotik hepatitis ve beyinde fokal akut ensefalitis ile karşılaşıldı. Örneklerden bakteriyolojik izolasyon konvansiyonel mikrobiyolojik metotlar ile yapıldı. İzolatlar fenotipik özelliklerine göre *P.multocida* olarak tanımlandı. Ayrıca izolatların moleküler konfirmasyonu *P.multocida plpE* genine spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile gerçekleştirildi.

Anahtar sözcükler: Mikrobiyoloji, *Pasteurella multocida*, patomorfoloji, tavşan.

Naturally infection with *Pasteurella multocida* in a rabbit: the pathological and microbiological findings

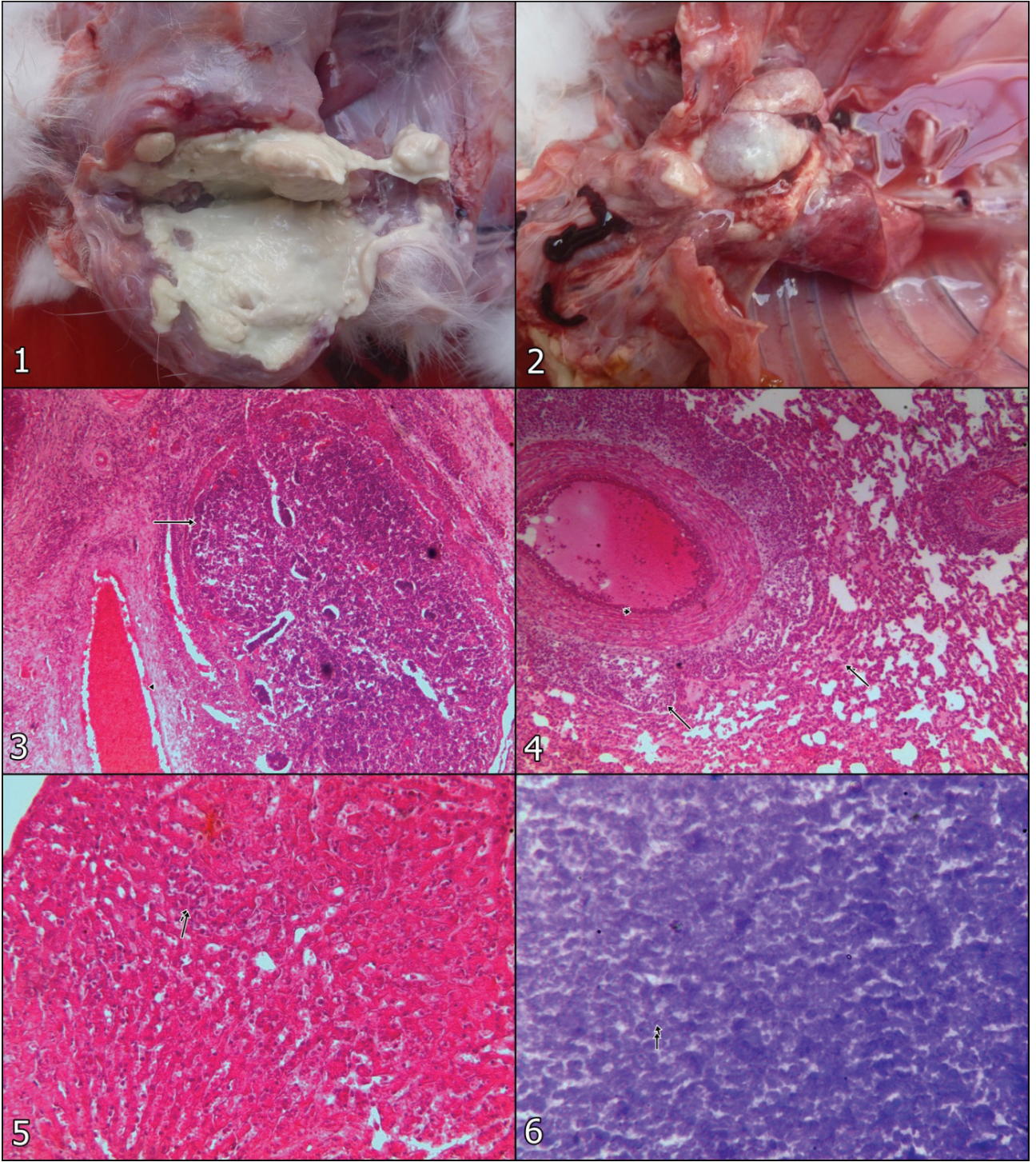
Summary: In the case, it was described the generalized pasteurellozis in a 4,5-year-old female rabbit as pathomorphological and microbiological. Macroscopically, a mass which was 6x4x3 cm in diameter, fluctuant and pus like white color and crema leaking from the cross-section, was attended in right side of neck. On lungs especially in apical lobes, hepatized areas and at the liver, white colored spots was taken into attention. The mass encountered in the neck was subcutaneous abscess. In addition, acute catarrhal bronchopneumonia on the lungs, focal pleuritis, multifocal necrotic hepatitis at the liver and focal acute encephalitis at the brain were encountered. Bacterial isolation from samples were done by using conventional microbiologic methods. Isolates were identified as *P.multocida* according to phenotypic features. Also, molecular confirmation of isolates were carried out by polymerase chain reaction (PCR) which was specific to *plpE* gene of *P.multocida*.

Key words: Microbiology, *Pasteurella multocida*, pathomorphology, rabbit.

Pasteurellozis tavşanlarda oldukça yaygın olarak karşılaşılan ve %15-20 mortalite ile seyreden *Pasteurella multocida* (*P.multocida*) serotiplerinin neden olduğu bulaşıcı bakteriyel bir hastalıktır (3-6, 9, 12). Doğal enfeksiyonlarda etken aerojen yolla ve nasal sekretle damlacık enfeksiyonu şeklinde yayılmaktadır. Ayrıca venereal yol ile genital kanala ve östaki kanalı ile orta kulağa geçebildiği bildirilmiştir (9).

Olgunun materyalini; hayvan sahibi tarafından hızla gelişen iştahsızlık, halsizlik, hareket etmede isteksizlik ve boyunda şişkinlik şikayetleriyle tanımlanan ve kısa zamanda ölen 4,5 yaşlı dişi bir tavşan oluşturdu. İnceleme isteğiyle tavşan Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na getirildi. Yapılan nekropsinin ve makroskopik incelemelerin ardından dokular %10'luk formalin solüsyonuna konularak rutin doku takibine

alındı, parafinde bloklandı ve 5 µ kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilin-Eozin (HE), Gram ve Giemsa boya yöntemlerine uygun olarak boyandı. Mikrobiyolojik olarak apse içeriği, akciğer, kalp ve karaciğer örneklerinden %5-7 koyun kanlı agar ve MacConkey agara ekimler yapılarak 37°C'de 24-48 saat aerobik olarak inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda şüpheli koloniler Gram boyama, oksidaz, katalaz, indol, üreaz, MacConkey agarda üreme, lizin dekarboksilaz, ornitin dekarboksilaz ve arabinoz, dulsitol, galaktoz, laktoz, mannitol, trehaloz, sorbitol ve maltoz fermentasyon özellikleri ile *P.multocida* yönünden değerlendirildi (7). İzolatların moleküler konfirmasyonu bu çalışmada tasarlanan ve *P.multocida* lipoprotein E'yi kodlayan *plpE* genine spesifik PmultF 5'-GCC TTC TTC CAC TCC AAT CA-3' ve PmultR 5'-TTA CTC GCA TTT CCC CAT TC-3'



Şekil 1: Subkutanöz apsenin kesit yüzü.

Figure 1: Cut section of subcutaneous abscess.

Şekil 2: Göğüs boşluğu ve organlarının makroskopik görüntüleri.

Figure 2: Macroscopical appearance of thoracic cavity and its organs

Şekil 3: Subkutanöz apsenin histopatolojik görüntüsü (ok) ve tromboz (ok başı), x40, HE.

Figure 3: Histopathological appearance of subcutaneous abscess (arrow) and thrombosis (arrow head), x40, HE.

Şekil 4: Akut katarrhal bronkopnömoni (oklar) ve trombozlar (ok başı), x40, HE.

Figure 4: Acute catarrhal bronchopneumonia (arrows) and thrombosis (arrow head), x40, HE.

Şekil 5: Fokal hepatit (ok), x100, HE.

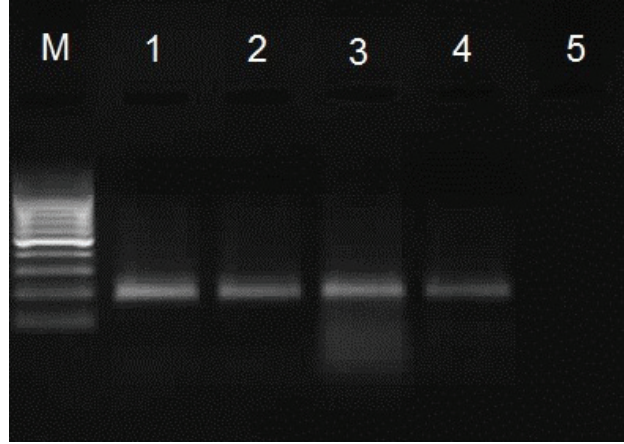
Figure 5: Focal hepatitis (arrow), x100, HE.

Şekil 6: Mavi renkli bakteri kümeleri (ok), x200, Giemsa.

Figure 6: Bacterial colonies in blue staining (arrow), x200, Giemsa.

oligonukleotid primer setinin kullanıldığı PCR ile gerçekleştirildi. Bu amaçla PCR amplifikasyonunda 14.8 µl DEPC-treated water, 2.5 µl 10×PCR Buffer, 2.5 mM MgCl₂ (25 mM), her bir dNTP'den 0.5 µl, 1.25 U Taq polymerase, her bir primerden (10 pmol) 1 µl ve 2 µl template DNA içeren 25 µl PCR karışımı oluşturdu. Amplifikasyon aşaması 94°C'de 3 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 1 dk denatürasyon, 57°C'de 1 dk primer bağlanma, 72°C'de 1 dk uzama olmak üzere 30 siklus ve 72°C'de 7 dk final uzama olarak gerçekleştirildi. Sonuçta 213 bp'lik amplifikasyon ürününün görülmesi pozitif olarak değerlendirildi. Çalışmada pozitif kontrol olarak Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan *P.multocida* AVMC88-33 suşu kullanıldı.

Olguda sağ boyun bölgesinde göğüs kafesi girişine kadar uzanmış, subkutan olarak yerleşim gösteren, 6x4x3 cm boyutlarında fluktuant kıvamlı, kesit yüzünden koyu kıvamlı, beyazimsı renkte, irin sızan apseyle karşılaşıldı (Şekil 1). Ayrıca akciğerlerde apikal loblarda yer yer sarımsı-gri renkte odaklar (Şekil 2) ile karaciğerde tüm loblarda diffuz dağılımlı değişen büyüklüklerde beyaz renkte sınırlı odaklar dikkati çekti. Yapılan histopatolojik incelemelerde boyun bölgesindeki kitlenin çok sayıda parçalanmış ya da canlı nötrofil lökosit içerdiği ve etrafının da bağ dokusundan meydana gelen bir kapsülle çevrili subkutan bir apse ve tromboz olduğu fark edildi. Bunun etrafındaki kas demetleri arasında yoğun nötrofil lökosit infiltrasyonlarından ibaret purulent miyozitis gözlemlendi (Şekil 3). Ayrıca akciğerde alveol ve bronşiyollerin lümenlerinde nötrofil lökositler, hafif ödem, daha az da dökülmüş alveol ve bronşiyol epitel hücrelerinden oluşan akut kataral bronkopnömoni tablosu ve tromboz hakimdi (Şekil 4). Bununla birlikte plöra üzerinde yer yer nötrofil lökosit infiltrasyonlarından ibaret fokal plöritis mevcuttu. Karaciğerde multifokal alanlar halinde hepatositlerin nekroza uğradığı ve bu alanların çevresinde ve portal aralıklarda nötrofil lökositlerce zengin, aralarında makrofaj infiltrasyonlarından oluşan multifokal nekrotik hepatitis ve enteritis gözlemlendi (Şekil 5). Beynin pariyetal lobunda substansiya albada yoğun olmak üzere fokal alanlar halinde ve damarların çevresinde nötrofil lökositlerden oluşan akut fokal ensefalitis dikkati çekti. Gram ve Giemsa boyamalarında etkene ait koloniler pozitif olarak boyandı (Şekil 6). Hem apse içeriği, hem de akciğer, karaciğer ve kalp dokularından alınan örneklerden yapılan bakteriyolojik inceleme sonucu *P.multocida* izole ve tanımlandı. Moleküler olarak apse içeriği, akciğer, karaciğer ve kalp'ten izole edilen isolatların tamamında PZR ile ilgili gen, kullanılan primerlerle amplifiye edildi (Şekil 7). Olguda gelişen makroskopik ve histopatolojik bulguların ortaya konarak, mikrobiyolojik anlamda etken izolasyonu ve identifikasyonu tanımanın desteklenmesi amaçlanmıştır.



Şekil 7: *P. multocida* plpE geni spesifik PCR (213 bp).

M: Moleküler marker (100-1000 bp), 1: Pozitif kontrol *P. multocida* AVMC88-33, 2: Apse İzolatı, 3: Akciğer İzolatı, 4: Kalp İzolatı, 5: Negatif kontrol.

Figure 7: *P. multocida* plpE gene specific PCR (213 bp).

M: Molecular marker (100-1000 bp); 1: Positive control *P. multocida* AVMC88-33; 2: Abscess isolate; 3: Lung isolate; 4: Heart isolate, 5: Negative control.

Pasteurella enfeksiyonları salgınlar halinde özellikle, ticari anlamda üretimi yapılan yerlerde yüksek mortalitelerle seyrettiğinde ciddi ekonomik zararlara yol açarlar (9). Akut-kronik seyirli mukopurulent rinitisle başlar (2, 5, 9), paranasal sinuslar ve nazal bölgedeki turbinatlara yayılır (5, 9). Trakeyada hiperemi (1, 10), purulent bronkopnömoni, akciğerde genelde kranioventral loblarda konsolide odaklar ve apöstatöz değişiklikler ile bazen de nekrozla seyreder (12). Fibrinöz plöritis ile komplike olabilir (2, 11). Bazen enfeksiyonun yayılımına bağlı olarak plöral empiyemle de seyredebilir (9). Bunların dışında otitis media, apseler, piyotoraks, fibrinöz ya da fibrinopurulent perikarditis, purulent konjunktivitis ve piyometra görülebilir. Bazı olaylarda akut septisemi ile birlikte seyrettiğinde purulent meningoensefalitis meydana getirir. Apseler genellikle subkutan dokularda ya da akciğer, beyin gibi çeşitli viseral organlarda bazen de meme bezlerinde ve çene kemiklerinde şekillenir (9). Bu çalışmada akciğer ve plöra dışında karaciğer ve beyinde de bulgulara rastlanılmıştır. Bununla beraber sağ boyun bölgesinde alışlagelen subkutan apselerle karşılaşılmıştır. Diğer organlarda hastalığa spesifik olarak herhangi bir bulgu kaydedilmemiştir.

Akciğerin kranioventral, apikal ve kardiyak loplarda yoğun nötrofil lökosit infiltrasyonları ile karşılaşılr ve alveol lümenlerini döşeyen epitel hücrelerinde dökülmenin yanı sıra seröz eksudat ve fibrinle karışık görünümündedir. Tüm damarlar ve interalveolar kapillar damarlar hiperemiktir. Plörada yoğun fibrin ve nötrofil lökositlerle karşılaşılr (9, 11, 12). Trakeya ve bronş epitelleri dökülmüş ya da nekrotiktir, ancak bu kısımlar bazen bakteriler, fibrin iplikleri ve nötrofil lökositlerden oluşan hücre infiltrasyonları ve propriyada ödemle bir

arada seyredilebilir (10, 11). Nazal mukozayı döşeyen epitellerde hiperplazi, Goblet hücrelerinde silia kaybı, propriya mukozada ödem, nötrofil lökosit infiltrasyonu gelişebilir. Bazen turbinatalarda kemik periostuna doğru gelişen fibroblast proliferasyonları dikkat çekicidir (5). Olguda akciğerin kranioventral loblarında akut kataral bronkopnömoni tanımlandı. Plöritis ile komplikeydi. Fibrinöz değişiklikler gözlenmedi. Üst solunum yollarında ise herhangi bir değişiklik yoktu. Perikarditisle beraber seyreden olgularda fibrin iplikleri ve nötrofil lökositler görülür. Uterusta piyometra, akut transmural metritis, nekrotik değişiklikler ile yine nötrofil lökositlerin ön planda olduğu purulent salpingitis ve periooforitis gelişir (9). Söz konusu vakada kalp ve dişi genital kanalda herhangi bir mikroskopik bulgu yoktu. Öte yandan beyinde gelişen fokal purulent odaklar bu tip pasteurellozis olaylarında az rastlanan bulgulardandı. Belirtilen organların dışında karaciğerde akut multifokal nekrotik hepatitis gözlemlendi. Bu lezyonlar multifokal nekrotik alanlar ve lökositlerden zengin yangısal hücre infiltrasyonlarından ibaretti. Bunun dışında yalnızca apsenin geliştiği yerdeki kaslarda miyozitise rastlandı. Kaslar ve karaciğerde gelişen bu bulgu diğer çalışmalardan farklı bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada (1), böbrekte multifokal interstisyel nefritis ile tubul epitellerinde dejeneratif ve deskuamatif değişiklikler tanımlanmıştır. Ancak bu olguda karşılaşılan değişiklikler generalize bulgularla paralellik gösterdiği halde böbrekte herhangi bir bulgu kaydedilmemiştir. Diğer taraftan sindirim sisteminde etkilenmeler az olmakla birlikte mide mukozasında fibrinopurulent içerik ve kanamaya rastladıklarını belirtmişlerdir (8). Bu çalışmada ise midede bulguya rastlanmamakla birlikte bağırsakta subakut bir enteritis tanımlanmış ancak bunun önceden gelişen başka bir sebebe bağlı olduğu düşünülmüştür.

Sonuç olarak, olguda apse, akciğer ve plöra bulguları dışında beyin ve karaciğer gibi az rastlanan bulgular tanımlanmış, mikrobiyolojik açıdan da etkenin izolasyonu ve identifikasyonu sağlanmış ve akut septisemiyle seyreden pasteurellozisin bulguları aydınlatılmıştır. Akut septisemilerle seyreden ve çoğunlukla mortaliteyle son bulan generalize pasteurellozis olgularında rastlanan genel makroskopik ve histopatolojik bulgular her zaman tipik bulguları yansıtmayabilir. Bu anlamda özel boyamalar ve mikrobiyolojik olarak izolasyon ve identifikasyona gidilmesi gerekebilir. Bu durumda bulguların serotipe ya da bakteriyel virulansa bağlı olarak şiddetli bulgular gelişebilir. Söz konusu çalışmanın doğal enfeksiyonda seyir gösteren generalize pasteurellozise farklı bir boyut getirdiğine inanılmaktadır.

Kaynaklar

1. **Al-Lebban ZS, Kruckenberg S, Coles EH** (1989): *Rabbit pasteurellosis: Respiratory and renal pathology of control and immunized rabbits after challenge with Pasteurella multocida*. *Histol Histopath*, **4**, 77-84.
2. **Anonim** (2012). Pasteurellosis. Erişim adresi: <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/171317.htm>. Erişim tarihi: 18.12.2012.
3. **Delong D, Manning PJ** (1994): *Bacterial diseases*. 129-170. In: Manning PJ, Ringler DH, Newcomer C.E. (eds.): *The Biology of the Laboratory Rabbit*. 2nd ed. Academic Press, San Diego.
4. **DiGiacomo RF, Garlinghouse LE, Vanhoosier GL** (1983): *Natural history of infection with Pasteurella multocida in rabbits*. *J Am Vet Med Assoc*, **183**, 1172-1175.
5. **DiGiacomo RF, Xu MY, Allen V, Hinton MH, Pearson GR** (1991): *Naturally Acquired Pasteurella multocida infection in rabbits: clinicopathological aspects*. *Can J Vet Res*, **55**, 234-238.
6. **Jaglic Z, Kucerova Z, Nedbalcova K, Kulich P, Alexa P** (2006): *Characterisation of Pasteurella multocida isolated from rabbits in Czech Republic*. *Vet Med-Czech*, **51**, 278-287.
7. **Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST** (1994): *Pasteurella*. 196. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed., William and Wilkson Company, Baltimore, MD.
8. **Percy DH, Bhasin JC, Rosendal S** (1986): *Experimental pneumonia in rabbits inoculated with strains of Pasteurella multocida*. *Can J Vet Res*, **50**, 36-41.
9. **Percy DH, Barthold SW** (2007): *Rabbit*. 264-267. In: *Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits*. Chapter 6. 3rd edition, Blackwell publishing.
10. **Premalatha N, Senthil Kumar K, Purushothaman V, Ravikumar G, Muralimanohar B** (2009): *Incidence of Pasteurellosis (snuffles) in a rabbit farm*. *TANUVAS*, **5**, 269-271.
11. **Redondo E, Masot AJ, Gazquez A, Roncero V, Duran E, Piriz S** (1993): *Experimental reproduction of acute pneumonic pasteurellosis in rabbits*. *Histol Histopath*, **8**, 97-104.
12. **Yarım M** (2011): *Tavşanlarda deneysel pastörelloziste patolojik bulgular*. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **58**, 21-26.

Geliş tarihi: 20.07.2013 / Kabul tarihi: 05.11.2013

Yazışma adresi:

Araş. Gör. Arda Selin TUNÇ
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Patoloji Anabilim Dalı,
06110, Dışkapı/Ankara
e-mail: scoskan@veterinary.ankara.edu.tr