

T.C
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AFYONKARAHİSAR İLİNDE
SIĞIRLARDA *PASTEURELLA MULTOCIDA* İZOLASYONU,
TIPLENDİRİLMESİ, ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI VE
BAZI VİRÜLENS GENLERİNİN PZR İLE BELİRLENMESİ**

Veteriner Hekim Selahattin KONAK

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç.Dr.Yahya KUYUCUOĞLU**

Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından 09.VF.18 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2012-10

2012 - AFYONKARAHİSAR

KABUL ve ONAY

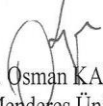
Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı

çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19.10.2012



Prof. Dr. Osman KAYA
Adnan Menderes Üniversitesi
Jüri Başkanı



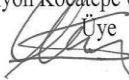
Prof. Dr. U.Sait UÇAN
Selçuk Üniversitesi
Raportör



Prof. Dr. Cevdet UĞUZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye

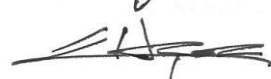


Doç. Dr. Yahya KUYUCUOĞLU
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Esra ŞEKER
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Selahattin KONAK'ın "Afyonkarahisar ilinde sığırlarda *Pasteurella multocida* izolasyonu, tiplendirilmesi, antibiyotik duyarlılıkları ve bazı virülens genlerinin PZR ile belirlenmesi" başlıklı tezi 02/11/2012 günü saat 11.15'te Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Kağan ÜÇOK
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Sığır yetiştiriciliğinde solunum sistemi enfeksiyonları tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de önemli problemler arasındadır. Özellikle işletme/üretici açısından iş gücü ve verim kaybının yanında, ölümler ve sağaltım masrafları nedeniyle büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Enfeksiyöz etkenlere bağlı pnömoniler, etiyolojik olarak kompleks bir yapıya sahiptir. Sığırlarda solunum sistemi hastalıklarında önemli bir yere sahip olan *Pasteurella multocida*, üst solunum yolu mukoz membranlarında fakültatif patojen olarak bulunur ve vücut direncinin kırıldığı durumlarda enfeksiyon oluşturur.

Sığır pastörellozu, dünyanın birçok ülkesinde görülmekle birlikte çok geniş bir konakçı çeşitliliğine sahiptir. *P. multocida* sığırların solunum sistemi hastalıklarından yaygın olarak izole edilmektedir. Pastörellozis, sığır ve mandalarda akut, subakut ve kronik formda seyreder. Akut seyreden olgularda, kısa süre içinde ölümler gözlenir. Enfeksiyon süt ve besi sığırlarında plöropnömoni ve bronkopnömoniyeye neden olur. Çeşitli stres koşulları ve nakliye ateşi (shipping fever) hastalığın oluşmasında hazırlayıcı faktörlerdendir.

Tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesindeki katkılarından dolayı danışman hocam Doç.Dr. Yahya KUYUCUOĞLU’na, tez danışmanlarım Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Cevdet UĞUZ’a ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Esra ŞEKER’e, çalışmalarında yardımını esirgemeyen Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr. Beytullah KENAR’a, Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Metin ERDOĞAN’a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzman Biyologu Zahide KÖSE’ye, moral ve desteklerini esirgemeyen ağabeylerim A.Kadir KONAK’a, Veteriner Hekim Yalçın KONAK’a, ablam Leman ARSLAN’a ve eşim Hatice KONAK’a, yetişmemde büyük özveri gösteren anne ve babama teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Kabul ve Onay.....	iii
Önsöz.....	iii
İçindekiler.....	iv
Simgeler ve Kısaltmalar.....	viii
Şekiller.....	ix
Tablolar.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Pasteurella multocida</i> Enfeksiyonlarının Tanımı ve Tarihi.....	2
1.2. Etiyoloji.....	5
1.2.1. Kapsül.....	7
1.2.2. Fimbria.....	8
1.2.3. Dış Membran Proteinleri.....	9
1.2.4. Lipopolisakkarit.....	11
1.2.5. <i>Pasteurella multocida</i> Toksin.....	12
1.2.6. Multosidin.....	12
1.2.7. Ekstrasellüler Enzimler.....	13
1.2.8. Plazmidler.....	14
1.3. Epidemiyoloji.....	14
1.4. Patogenezis.....	15
1.5. Klinik Belirtiler.....	16
1.6. Teşhis.....	18
1.7. Sağaltım.....	23
1.8. Korunma.....	24

2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
2.1.Gereç.....	26
2.1.1. Örneklerin Toplanması.....	26
2.1.2. Standart Suşlar.....	26
2.1.3. Deney Hayvanları.....	27
2.1.4. Antibiyotik Standartları.....	27
2.1.5. Kullanılan Besiyerleri ve Solusyonlar.....	27
2.1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	34
2.1.6.1. DNA Ekstraksiyonu	34
2.1.6.2. PZR’da Kullanılan Primer, Enzim, Buffer ve Solusyonlar.....	34
2.1.6.3. Kullanılan Cihazlar.....	36
2.2. Yöntem.....	36
2.2.1. <i>Pasteurella multocida</i> ’nın İzolasyonu ve İdentifikasyonu.....	36
2.2.1.1. Katalaz Testi.....	37
2.2.2.2. Oksidaz Testi.....	37
2.2.2.3. İndol Testi.....	37
2.2.2.4. Üreaz Testi.....	37
2.2.2.5. Nitrat Testi.....	38
2.2.2.6. Mac Conkey Agarda Üreme.....	38
2.2.2.7. Oksidasyon ve Fermentasyon Testi.....	38
2.2.2.8. Hareket Testi.....	38
2.2.2.9. Triple Sugar Iron Agar.....	39
2.2.2.10. Karbonhidrat Fermentasyon Testi	39
2.2.2.11. Sitrat Kullanım Testi	39
2.2.2.12. Metil Red Testi	40
2.2.2.13. Voges-Proskauer Testi	40
2.2.2.14. Ornitin Dekarboksilaz Testi	40
2.2.3. <i>Pasteurella multocida</i> Suşlarının Serogruplandırılması	40
2.2.3.1. Hiperimmün Serum Hazırlanması.....	40
2.2.3.2. Lam Aglütinasyon Testi	41

2.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	41
2.2.4.1. DNA Ekstraksiyonu.....	41
2.2.4.2. PZR'da Kullanılan Primerler.....	42
2.2.4.3. PZR Karışımının Hazırlanması.....	42
2.2.4.4. Nükleik Asitlerin Çoğaltılması.....	43
2.2.4.5. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Elektroforez İşlemi.....	44
2.2.4.6. Görüntüleme İşlemi.....	45
2.2.5. Antibiyotik Duyarlılık Testi.....	45
2.2.6. İstatistiksel Analiz.....	45
3. BULGULAR.....	46
3.1. Mikrobiyolojik Muayeneler.....	46
3.2. <i>Pasteurella multocida</i> Suşlarının Biyokimyasal Özellikleri.....	46
3.3. <i>Pasteurella multocida</i> Suşlarının Serogruplandırılması.....	47
3.4. PZR Bulguları.....	48
3.5. <i>Pasteurella multocida</i> Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları.....	51
4. TARTIŞMA.....	52
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	59
ÖZET.....	60
SUMMARY.....	61
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	75

SİMGELER ve KISALTMALAR

CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
G	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
mPZR	Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu
VP	Voges Prouskauer
NaCl	Sodyum Klorür
bp	Baz Çifti
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MR	Metil Red
H ₂ S	Hidrojen Sülfid
TBE	Tris Borik Asit Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
KOH	Potasyum Hidroksit
OIE	Office International des Epizooties
DEPC	Dietilpirokarbonat
FAO	Food and Agriculture Organisation
IHA	İndirekt Hemaglutinasyon
LPS	Lipopolisakkarit
PMT	<i>Pasteurella multocida</i> Toksin
API	Analitik Profil İndeks
kDa	Kilodalton
OMP	Dış Membran Protein (Outer membrane Protein)
Kb	Kilobaz
Tn	Transpozon

ŞEKİLLERSayfa

Şekil 3.1. Agaroj jel elektroforezde <i>P. multocida</i> OMP (220 bp) geni pozitif bulunan suşların oluşturduğu bantlar.....	48
Şekil 3.2. Agaroj jel elektroforezde <i>P. multocida</i> KMT1 (460 bp) geni pozitif bulunan suşların oluşturduğu bantlar.....	49
Şekil 3.3. Agaroj jel elektroforezde <i>P. multocida</i> <i>hyaD-hyaC</i> (Carter kapsüler grup A, 1044 bp) geni pozitif bulunan suşların oluşturduğu bantlar.....	50

TABLULARSayfa

Tablo 1.1. <i>P. multocida</i> 'nın serolojik sınıflandırması.....	4
Tablo 1.2. <i>Pasteurella</i> spp.'nin fenotipik özellikleri.....	6
Tablo 1.3. <i>P. multocida</i> 'nın yerleştiği konakçılar ve oluşturduğu hastalıklar.....	16
Tablo 2.1. Sığırlardan alınan örneklerin yaş ve cinsiyete göre dağılımı.....	26
Tablo 2.2. <i>P. multocida</i> 'nın PZR ile tanısında kullanılan primerler.....	35
Tablo 2.3. PZR protokollerinde kullanılan karışımlar.....	43
Tablo 2.4. Uygulanan PZR protokolleri.....	44
Tablo 3.1. Sığır akciğeri, nazal sıvı ve trakeal yıkantı örneklerinden <i>P. multocida</i> identifikasyonu.....	46
Tablo 3.2. İdentifiye edilen <i>P. multocida</i> ve standart suşların biyokimyasal özellikleri.....	47
Tablo 3.3. İzole edilen <i>P. multocida</i> suşlarının antibiyotik duyarlılıkları.....	51

1. GİRİŞ

Pastörelloz, *Pasteurella* cinsi bakteriler tarafından meydana getirilen enfeksiyonlar için kullanılmaktadır. Hayvanların üst solunum yolu mukoz membranlarında fakültatif patojen olarak bulunan *Pasteurella* spp., vücut direncinin kırıldığı durumlarda enfeksiyon oluşturmaktadır (Aydın, 2006).

Pasteurellalar, Eubacteria alemi, Proteobacteria şubesi, Gammaproteobacteria sınıfı, Pasteurellales takımı, *Pasteurellaceae* ailesi ve *Pasteurella* cinsi içerisinde yer alırlar. *Pasteurella* türleri bir çok hastalık olgusunda primer veya sekonder etken olarak bulunur. Geniş bir konakçı çeşitliliğine sahip olan *Pasteurella multocida*'nın, sığırlarda akut ve subakut seyreden, ateşli, enfeksiyöz karakterde pnömoni, hemorajik septisemi, meningoensefalitis ve mastitis, koyunlarda pnömoni ve mastitis, domuzlarda atrofik rinitis ve pnömoni, kanatlılarda tavuk kolerası, laboratuvar hayvanlarında ise rinitis ve solunum sistemi enfeksiyonlarına sebep olduğu bildirilmektedir (Christensen ve ark., 2005; Christensen ve Bisgaard, 2006; OIE, 2008).

Sığır yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen faktörlerden biri olan enfeksiyöz etkenlere bağlı pnömoniler, yüksek ateş, iştahsızlık, seröz burun akıntısı, nabız ve solunum artışı ile karakterizedir. Pnömonilerin ortaya çıkışında çevresel faktörler (taşıma, kalabalık ahırlarda barındırma ve iklim değişiklikleri gibi stres faktörleri), viral etkenler (Parainfluenza-3, Bovine Respiratory Syncytial Virus, Bovine Herpesvirus-1, Bovine Viral Diarrhea Virus), bakteriyel etkenler (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma* spp., *Escherichia coli*, *Chlamidia* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. ve *Acinetobacter* spp.), mikotik etkenler ve parazit türleri rol oynadığından etiyolojik olarak kompleks bir yapıya sahiptir. Bu nedenle hastalık daha şiddetli ve ölümcül seyredebilmektedir (Yates, 1982; De Alvis, 1999; Fulton, 2009; Hick ve ark., 2012; Portis ve ark., 2012).

1.1. *Pasteurella multocida* Enfeksiyonlarının Tanımı ve Tarihçesi

Pasteurella cins ismi, tavuk kolerası üzerindeki çalışmalarından dolayı Louis Pasteur'e atfen verilmiştir. Pasteur, tekrar eden pasajlar ile etkenin attenuasyonunu gerçekleştirerek kanatlılarda hastalığa karşı immun yanıt oluşmasını sağlamıştır (Mutter ve ark., 1989; Kubatzky, 2012).

Pasteurella multocida sığırların solunum sistemi hastalıklarında yaygın olarak izole edilmektedir. Enfeksiyon süt ve besi sığırlarında plöropnömoni ve bronkopnömoniyeye neden olur. Çeşitli stres koşulları ve nakliye ateşi (shipping fever) hastalığın oluşmasında hazırlayıcı faktörlerdendir. Pnömonik pastörellozis vakalarında yaygın olarak serogrup A izole edildiği bildirilmiştir (Dabo ve ark., 2007; Boyce ve ark., 2010; Okay ve ark., 2012). *P. multocida*, sığırlarda solunum yolu enfeksiyonları yanında hemorajik septisemi etkenidir. Hemorajik septisemi, sığır ve mandalarda septisemik pasteurellozisin önemli bir formudur. Hastalık, ilk kez 1880'de Malezya'da tespit edilmiştir (FAO, 1991). Asya'da *P. multocida* serotip B:2 ve Afrika'da *P. multocida* serotip E:2 epizootik enfeksiyonlar tarzında görülmektedir. Yabani hayvanlarda baskın olan serotip ise B:2 ve B:5'tir. Hastalığın perakut seyri ve ani ölümler nedeniyle tedavi genellikle sınırlıdır (De Alwis, 1999; OIE, 2008).

Domuzlarda ekonomik önemi olan atrofik rinitis ve bronkopnömoni enfeksiyonları görülmektedir. Atrofik rinitis domuzlarda, gelişim geriliği ve konka atrofisi ile karakterize ağır bir enfeksiyona neden olur (Lax ve Chanter, 1990). Tavuk kolerası, dünyada ciddi ekonomik kayıplara yol açan evcil ve yabani kanatlıların perakut, akut, septisemik ve kronik olarak seyreden yüksek morbidite ve mortalite ile karakterize bir enfeksiyondur. Perakut veya akut vakalarda, kemoterapi sınırlıdır. Bu nedenle rezervuar olanların elimine edilmesi önemlidir (Christensen ve Bisgaard, 2000; Aydın, 2002). Enfeksiyon insanlarda ise nadiren görülür. İnsanlardaki pastörellozis vakalarının daha çok karnivorlar tarafından, ısırılma veya tırmalanma sonucu ortaya çıktığı bildirilmiştir (Hubbert ve Rosen, 1970; Liu ve ark., 2003; Christensen ve ark., 2005; Collins ve ark., 2012; Khan ve ark., 2012).

P. multocida ilk olarak 1883 yılında Burrill tarafından “*Micrococcus gallicidus*”, 1887’de Trevisan tarafından “*Pasteurella cholerae-gallinarum*”, 1889’da Lehmann and Neumann tarafından “*Bacterium multocidum*”, 1893’de Kitt tarafından “*Bacterium bipolare multocidum*” ve 1939’da Rosenbusch ve Merchant tarafından *P. multocida* olarak isimlendirilmiştir. Newsom ve Cross 1932’de, sığır ve koyunlarda *M. haemolytica*’yı izole etmiştir. Daha sonra *Pasteurella pneumotropica*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella urea* ve *Pasteurella aerogenes* fenotipik özelliklerine göre tanımlanmıştır (Rosenbusch ve Merchant, 1939; Sneath, 1982; Mutters ve ark., 1985).

Serotiplendirme, teşhis açısından izolatların gruplandırılması ve hastalıkların sınıflandırılmasında kullanılmaktadır. *P. multocida*’nın serotiplendirilmesinde farklı metotlar geliştirilmiş ve serotiplendirme ilk defa Cornelius tarafından 1929 yılında yapılmıştır. Roberts, 1947’de *P. multocida* serotiplerini pasif fare koruma testine göre I, II, III, IV olarak bildirmiş ve Hudson, 1954’te serotip V’i eklemiştir (De Alwis, 1999).

Carter 1952’de presipitasyon ve 1955’te indirekt hemaglutinasyon (IHA) testi ile *P. multocida* serogruplarını A, B, C ve D olarak belirlemiştir (Carter, 1952; Carter, 1955). Carter (1961), Afrika’daki hemorajik septisemi vakalarında izole edilen *P. multocida* türlerinin serogrup B’den farklı olduğunu bildirmiş ve gruplandırmaya E’yi dahil etmiştir. Serogrup C ise gruplandırmadan bir süre sonra çıkarılmıştır (Carter, 1963). Rimler ve Rhoades (1987), hindilerden elde ettiği yeni serogrubu F olarak gruplandırmaya eklemiştir.

Namioka ve Murata (1961a) *P. multocida* suşlarının kapsüler antijenlerine göre gruplandırılmasında Lam Aglutinasyon Testini kullanmıştır. Namioka ve Murata (1961b,1961c,1964), Namioka ve Bruner (1963) tavşan hiperimmün serumu kullanarak aglutinasyon testi ile 11 somatik tipi belirlemiştir. Hedleston ve ark. (1972), Agar Jel Presipitasyon testi ile 16 farklı somatik tipi saptamıştır. Test için bakteri kültürü 100°C’de 1 saat kaynatılmış ve kullanılacak antiserum ise tavuklardan

elde edilmiştir. *P. multocida*'nın sınıflandırmasında kullanılan serolojik testler Tablo 1.1'de gösterilmektedir (De Alwis, 1999).

Tablo 1.1 *Pasteurella multocida*'nın serolojik sınıflandırması (De Alwis, 1999)

Yazar	Test	İdentifiye Edilen Tipler
Cornelius (1929)	Aglutinasyon absorpsiyon test	Grup I,II,III, IV
Yusef (1935)	Presipitasyon test	Grup I,II,III, IV
Rosenbach ve Merchant (1939)	Aglutinasyon fermantasyon	Grup I,II,III
Little ve Lyon (1943)	Lam Aglutinasyon	Tip 1,2,3
Roberts (1947)	Pasif Fare Koruma Testi	Tip 1,2,3,4
Kapsüler Tiplendirme		
Carter (1955)	İndirekt Hemaglutinasyon (IHA)	A,B,C,D
Carter (1961)	IHA	E
Namioka ve Murata (1961a)	Lam Aglutinasyon	A,B,D,E
Rimler ve Rhoades	IHA	F
Somatik Tiplendirme		
Namioka ve Murata (1961b;1961c; 1964), Namioka ve Bruner (1963)	Aglutinasyon	1-11
Hedleston ve ark. (1972)	Agar Jel Presipitasyon	1-16

Brogden ve Parker (1979), Namioka tarafından sınıflandırılan serotipler ile Hedleston tarafından sınıflandırılan serotipleri karşılaştırmış ve aralarında bir korelasyonun bulunmadığını bildirmiştir. Hemorajik septisemi, Hedleston'da serotip 2 ve Carter'da kapsüler serogrup B ve E olarak gruplandırılmıştır. En yaygın kullanılan sistem Carter kapsüler tip ile Hedleston somatik tip'in bir arada yazılmasıdır. İlk yazılan harf ile Carter kapsüler tip, rakam ile Hedleston somatik tip ifade edilir. Buna göre hemorajik septisemi Asya'da *P. multocida* serotip B:2 ve Afrika'da *P. multocida* serotip E:2 olarak bildirilmiştir (De Alwis, 1999; Shivachandra ve ark., 2011).

1.2. Etiyoloji

Pasteurellaceae familyasında 15 cins bulunur. Bunlar, *Actinobacillus* spp., *Aggregatibacter* spp., *Avibacterium* spp., *Basfia* spp., *Bibersteinia* spp., *Chelonobacter* spp., *Gallibacterium* spp., *Haemophilus* spp., *Histophilus* spp., *Lonepinella* spp., *Mannheimia* spp., *Nicoletella* spp., *Pasteurella* spp., *Phocoenobacter* spp. ve *Volucribacter* spp.'dir (Garrity ve ark., 2004; Anonim, 2012a; Anonim, 2012b).

Pasteurella cinsi içerisinde başlıca hastalık etkenleri, *Pasteurella aerogenes*, *Pasteurella bettyae*, *Pasteurella caballi*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella langaaensis*, *Pasteurella lymphangitidis*, *Pasteurella mairii*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella pneumotropica*, *Pasteurella skyensis*, *Pasteurella stomatis* ve *Pasteurella testudinis*'dir. *P. multocida* alt tür olarak *P. multocida subsp. multocida*, *P. multocida subsp. gallicida* ve *P. multocida subsp. septica*'yı içerir (Garrity ve ark., 2004; Anonim, 2012a; Anonim, 2012b).

P. multocida 0,2-0,4 µm eninde ve 0,5-1,5 µm uzunluğunda kokoid, oval, kısa küçük çomakçık ve nadiren de filament tarzındadır. Gram negatif olan *Pasteurella* türleri en iyi metilen mavisi, toluidin mavisi ve May-grunwald Giemsa ile boyanırlar. İnfekte dokular ve kandan yapılan preparatlarda tipik bipolar görünürler. Sporsuz, hareketsiz ve kapsüllüdürler. Özellikle, A ve D tiplerinde kapsül çok belirgindir. Fosfataz, katalaz ve oksidaz reaksiyonları pozitifdir. Ekzotoksinleri çok az patojeniktir ve endotoksinleri vardır. *P. multocida*; glukoz, sakkaroz, levüloz, galaktoz, sorbitol, fruktoz, mannoz ve ksilozu gaz yapmadan fermente eder. Laktoz, maltoz, arabinoz ve dulsite olan etkileri değişiktir. Ramnoz, salisin, dekstrin ve inuline etkisi yoktur. Nitratları nitritlere redükte eder. H₂S, negatif veya nadiren hafif oranda oluşur. İndol pozitifdir. β - galaktosidaz, Metil Red (MR) ve Voges Proskauer (VP) negatifdir. Mac Conkey agarda üreme olmaz. Üreaz negatif olup jelatini eritmez. Lisin ve arjinin dekarboksilaz negatifdir. *P. multocida*, aerob veya fakültatif anaerob olup en iyi 37 °C'de, 24-48 saatte ve pH 7,2 - 7,8'de üreme gösterir. Katı besiyerlerinde yuvarlak,

parlak, düzgün ve 1 mm çapında grimsi koloniler meydana getirir. Zamanla koloni ortaları koyu bir renk alır. Kanlı agarda hemoliz görülmez. *Pasteurella spp.*'nin biyokimyasal özellikleri Tablo 1.2'de gösterilmektedir (Sneath ve Stevens, 1990; Garrity ve ark., 2004; Quinn ve ark., 2004; Aydın, 2006; Anonim, 2012a; Anonim, 2012b).

Tablo 1.2 *Pasteurella spp.*'nin biyokimyasal özellikleri (Quinn ve ark., 2004)

Biyokimyasal Testler	<i>P. multocida</i>	<i>P. aerogenes</i>	<i>P. bettyae</i>	<i>P. caballi</i>	<i>P. canis</i>	<i>P. dagmatis</i>	<i>P. langaaensis</i>	<i>P. lymphangitidis</i>	<i>P. mairii</i>	<i>P. pneumotropica</i>	<i>P. skyensis</i>	<i>P. stomatis</i>	<i>P. testudinis</i>
Katalaz	+	+	d	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Oksidaz	+	d	-	-	+	+	+,z	-	d	+	+,z	+	+
Hemoliz (Kanlı Agar)	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	+
İndol	+	-	-	-	d,z	+	-	-	-	+	+	+,z	+
Nitrat	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Üreaz	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
Mac Conkey Agarda Üreme	-	+	d	-	-	-	-	d	d	d	-	-	d
Glukoz (Hugh Leifson)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+
Ornitin dekarboksilaz	+	d	-	d	+	-	-	-	+	+	+	-	-

+: Pozitif,

-: Negatif

d; Değişken

z; Zayıf reaksiyon

Katı besiyeri üzerinde *P. multocida* başlıca dört tip koloni formu oluşturur (Garrity ve ark., 2004; Quinn ve ark., 2004; Aydın, 2006). Mukoid (M) koloni formu, portör hayvanlardan veya kronik olgulardan izole edilir. Sıvı besiyerinde bulanıklık oluştururlar. Kapsüler serogrup A katı besiyerlerinde oldukça büyük, geniş, düzenli, nemli, yapışkan, yuvarlak ve konveks yapıda görülür. Smooth (S) koloni formu akut olgulardan izole edilir ve katı besiyerlerinde düzgün, yuvarlak ve küçük parlak koloniler şeklinde görülür. İridesans (I) koloni formu akut olgulardan izole edilirken katı besiyerlerinde yuvarlak ve küçük koloniler oluşturur. Rough (R) koloni formu ise kapsülsüz olup fare ve tavşanlar için çok zayıf patojeniteye sahiptir veya avirulantır. *P. multocida* kolonileri dissosiasyona meyilli olup, M, S, I, R şeklinde bir değişime uğrar. Yapılan seri pasajlar sonucu M karakterindeki bir suş R karakteri kazanabilir (Carter, 1962; Bisping ve Amtsberg, 1995; Aydın, 2006).

1.2.1. Kapsül

Kapsül, polisakkarit özelliğindedir ve memeli bağ dokusunda bulunan glikozaminoglikan benzeri bir yapı gösterir. Bakterinin akciğer dokusuna yapışmasından, nötrofillerin fagositozunu engellemekten ve komplement aracılığı ile oluşan lizise direnç göstermekten sorumludur (De Angelis ve Padgett-McCue, 2000; Harper ve ark., 2007).

Kapsül antijenine göre *P. multocida* A, B, D, E ve F olmak üzere beş kapsüler gruba ayrılmıştır. *P. multocida* serogrup A'ya ait kapsüler materyal hyaluronik asit, bir polimer olan D-glukuronik asit ve N-asetil-D-glukozaminden, serogrup D N-asetil-heparozan (heparin) ve serogrup F kondrotin sülfattan oluşur. Serogrup B kapsüler polisakkaritinin yapısı arabinoz, mannoz ve galaktozdan oluşur ve hyaluridaz üretir (Christensen ve Bisgaard, 2006; Harper ve ark., 2006).

Kapsüle sahip olan türler genellikle kapsülü bulunmayan varyant suşlara göre daha patojendir (Snipes ve ark., 1987; Jacques ve ark., 1993). Kapsülü bulunmayan

mutant serogrup A suşunun tavuklara uygulandığında avirüent olduğu (Chung ve ark., 2001); ancak bu suşların yüksek dozlarda uzun süreli olarak uygulandığında koruyucu bağışıklığı uyardığı bildirilmiştir (Chung ve ark., 2005).

Kapsüle ait gen bölgesi *P. multocida* serotip A:1'de üç bölgeye ayrılmıştır. Bu gen bölgeleri kapsüle ait polisakkaritler ve fosfolipitlerin sentezinden sorumludur. Birinci bölge *hexA*, *hexB*, *hexC*, *hexD* genlerini taşır ve *Haemophilus influenzae* *bexA*, *bexB*, *bexC*, *bexD* genlerine benzerlik gösterir. İkinci bölge *hyaA*, *hyaB*, *hyaC*, *hyaD*, *hyaE* genlerini taşır ve *hyaD* hyaluronik asit sentezinden sorumlu gen bölgesidir. Üçüncü bölge *phyA*, *phyB* genlerinden oluşur (Chung ve ark., 1998; Boyce ve ark., 2000). *P. multocida* serogrup A, D ve F serogrubunda kapsül biyosentez bölgesinin dışında tespit edilen heparosan sentetaz (*hssB*) geninin kapsülün ekspresyonuna ve varyasyona sebep olabileceği bildirilmiştir (DeAngelis ve White, 2004).

Serogrup A'nın birçok türde pnömoniye neden olduğu, çoğunlukla sığırların bronkopnömonisi ve kanatlı kolerasından ve bazen de domuz pnömonilerinden izole edildiği rapor edilmiştir. Serogrup D özellikle domuzlarda atrofik rinitis ve pnömoni vakalarından identifiye edilmiştir. *P. multocida* serotip B:2'nin Asya'da, serotip E:2'nin Afrika'da mandalarda yaygın olarak hemorajik septisemilere neden olduğu, serotip B:3 ve B:4'ün ise ilk olarak Avustralya'da sığır yarasından ve sonradan İngiltere ve Kuzey Amerika'da ise sığır ve geyiklerin hemorajik septisemi vakalarından izole edildiği bildirilmiştir. Ayrıca Hindistan'da hemorajik septisemi benzeri vakalarda manda ve sığırlardan ise serotip A:1 ve A:3 tespit edilmiştir (De Alwis, 1999; Quinn ve ark., 2004; OIE, 2008)

1.2.2 Fimbria

Fimbria konakçı hücre yüzeyine tutunmada ve kolonizasyonda önemli rol oynar. *Pasteurellaceae* familyasında adezinler üç gruba ayrılmıştır. Bunlar, ototransporter protein (tip V protein), Flp pilus ve tip IV pilus' dur (Kuhnert ve Christensen, 2008).

Tip IV fimbrialarının *P. multocida* A, B ve D serogruplarında virülens faktörü olduğu rapor edilmiştir. Tip IV fimbrialarında bulunan *ptfA* geni, 18 kDa'luk bir protein olan ve türler arasındaki varyasyonlardan sorumlu gen bölgesidir. Flp pilusunun sentezinden sorumlu olan *tadD* ve *flp-1* genlerinin enfeksiyonun patogeneğinde önemli olduğu bildirilmiştir (Ruffolo ve ark., 1997; Doughty ve ark., 2000). *P. multocida*'nın *tadD* ve *flp-1* gen bölgesinde oluşturulan mutasyon ile tavuk ve farelerde etkenin attenüasyonunun oluşturulduğu ve gen bölgesinde meydana gelen mutasyonun, virülensi 10^5 kat azalttığı saptanmıştır (Fuller ve ark., 2000; Harper ve ark., 2003) .

Bordetella pertussis filamentöz hemaglutinin (*FhaB*) geni ile *P. multocida* *PfhaB1* ve *PfhaB2* genleri arasında benzerlik bulunduğu bildirilmiştir. Bu gen *B. pertussis*'de üst solunum sisteminde kolonizasyon ve invazyonda önemli bir patojenite faktörü olarak rol oynamaktadır (Tatum ve ark., 2005).

1.2.3. Dış Membran Proteinleri (DMP)

Dış membran proteinleri, hücre içine ve dışına moleküllerin selektif olarak taşınmasında ve adezyonda önemli rol oynar. *P. multocida*'ya ait dış membran proteinlerinin kompleks bir yapıya sahip olduğu ve 72 farklı protein taşıdığı bildirilmiştir (Lin ve ark., 2002; Hatfaludi ve ark., 2010).

Pasteurella multocida'nın sahip olduğu 27 kDa, 37,5 kDa, 49,5 kDa, 58,7 kDa, 64,4 kDa ağırlığındaki dış membran proteinleri ile tavşanlardaki pastörellozise karşı koruyucu immün yanıt oluşturma düzeyleri incelenmiştir. Monoklonal antikor yanıtı özellikle 37,5 kDa ağırlığındaki protein bandına karşı bir artış göstermiştir (Lu ve ark., 1988). 37,5 kDa ağırlığındaki bu protein bandının Gram negatif bakterilere ait bir porin proteini (protein H) olduğu ve immunojenik özelliği sayesinde aşı çalışmalarında kullanılabileceği rapor edilmiştir (Vasfi Marandi ve Mittal, 1997; Luo ve ark., 1999). Vasfi Marandi ve Mittal (1997), *P. multocida*'da tespit ettikleri

OmpH proteininin 32 kDa-39 kDa arasında farklı kütle ağırlıklarında olduğunu tespit etmişlerdir. *P. multocida* OmpH proteini ile hazırlanan rekombinant aşılardan farelerde koruyucu düzeyde immün yanıt oluşturulabileceği bildirilmiştir (Lee ve ark., 2007; Tan ve ark., 2010).

Dış membran proteinlerinden OmpA proteininin yapısı *P. multocida*'da β -barrel tiptedir. N-terminal alan lipid tabakası ile C-terminal alan periplasmik bölge ve peptidoglikan ile ilişkilidir (Nikaido, 2003). OmpA protein ile hazırlanan monoklonal antikorlar farelerde yeterli bir koruma sağlayamamıştır (Vasfi Marandi ve Mittal, 1997). OmpA proteininin en önemli görevi *P. multocida* ve konak hücresi arasındaki adezyonu sağlamaktır (Dabo ve ark., 2003; Hatfaludi ve ark., 2010).

En yaygın porin proteinleri arasında olan ve *P. multocida*'nın 16 serotipinde de bulunan 87 kDa (oma87) ağırlığındaki proteinin, serotipler arasında koruyucu immünyete neden olduğu ve *H. influenzae* D15 proteini ile de benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Ruffolo ve Adler, 1996). *P. multocida*'nın tüm serotiplerinde bulunan 16 kDa ağırlığındaki proteinin ise *H. influenzae* P6 proteini ile benzerlik gösterdiği ve immünojenik özellikte olduğu tespit edilmiştir (Kasten ve ark., 1995).

Pasteurella multocida'da tespit edilen 39 kDa'luk protein bandının kanatlı serotipleri arasında çapraz immünyete neden olduğu (Rimler, 2001) ve bu protein bandının farelerde pasif koruma testi ile serotip A:1 ve A:3 arasında çapraz bağışıklık sağladığı bildirilmiştir (Ali ve ark., 2004). *P. multocida* A:3 serotipinin kapsül kalınlığı ve miktarının bu protein ile ilişkili olduğu ayrıca tavuk embriyo fibroblast hücreleri üzerinde adezyon ve invazyonda da etkili olduğu saptanmıştır (Borrathybay ve ark., 2003a; Borrathybay ve ark., 2003b).

1.2.4. Lipopolisakkarit (LPS)

Lipopolisakkarit, Gram negatif bakterilerdeki en önemli virülens faktörlerindedir. *P. multocida* suşlarında 16 (1-16) farklı somatik serotipin oluşmasında etkilidir ve üç önemli kısımdan oluşur. Endotoksik aktiviteden sorumlu olan kısım lipid A, merkez polisakkarit ve O spesifik oligosakkarittir. Enterik Gram negatif bakterilerde “O” antijeni tekrar eden ünitelerden oluşurken, yapılan çalışmalarda *P. multocida* ve diğer patojenlerde (*Haemophilus* spp., *Neisseria* spp.) tekrar eden “O” antijeninden yoksun olduğu ve bu nedenle rough tipli lipopolisakkarit olarak bildirilmiştir (Boyce ve ark., 2010; Harper ve ark., 2011).

Lipopolisakkaritin yapısında glukoz, galaktoz ve L-glisero-D-manno-heptoz (LD-Hep) 4,2,3 oranında bulunur. Az oranda ise N-asetil-glukozamin (GlcNAc) ve N-asetil-galaktozamin (GalNAc) belirlenmiştir. Bu ünite, 2-keto-3-deoksi-oktulosonik asit (Kdo) ile lipit A'ya bağlanır (Garrity ve ark., 2004; St Michael, 2005; Christensen ve Bisgaard, 2006; Harper ve ark., 2007). Fosfokolin (PCho) bakteriyel adezyonda, antimikrobiyel dirençte ve komplementin oluşmasında lipopolisakkarit yapısında bulunan önemli bir virülens faktörüdür. *P. multocida* Pm70 suşunun gen sekans analizinde lipopolisakkarit yapısında fosfokolin bulunmadığı ve *P. multocida* VP161 ve X-73 suşlarında ise lipopolisakkaritin terminal pozisyonunda galaktoz içerdiği saptanmıştır (Harper ve ark., 2007).

Lipopolisakkarit antijenler, farelerde yapılan koruma testlerinde yalnızca homolog serotipe karşı koruma sağlamıştır (Wijewardana ve ark., 1990). Mandalara intravenöz yolla verilen *P. multocida* serotip B:2'ye ait lipopolisakkarit antijenin klinik olarak hemorajik septisemi bulguları oluşturduğu rapor edilmiştir. Hindilerin *P. multocida* serogrup A lipopolisakkarit antijenin letal etkilerine karşı dirençli olduğu, tavuk embriyoları ve farelerin ise oldukça duyarlı tespit edilmiştir (Rhoades ve Rimler, 1987; Horadagoda ve ark., 2002; Boyce ve ark., 2010).

1.2.5. *Pasteurella multocida* Toksin (PMT)

P. multocida toksini, kapsüler serogrup D ve bazı serogrup A suşları tarafından üretilen bir proteindir. Domuzlardaki atrofik rinitis vakalarından sorumludur. Saflaştırılmış dermonekrotik toksinin moleküler ağırlığı yaklaşık 146 kDa'dur. Toksinin, embriyonik sığır akciğer hücrelerinde sitotoksiste, farelerde mukoid ishal ve dalak atrofisi, domuz, sıçan, tavşan ve keçilerde nazal konka atrofisi ile karaciğerde vasküler endotelial hasara neden olduğu belirtilmiştir (Pullinger ve ark., 2004; Wilson ve Ho, 2005; Frey, 2011; Lee ve ark., 2012).

1.2.6. Multosidin (Sideroforlar)

Pasteurella multocida'nın sekans analizinde genoma ait 53 (%2,5) proteinin demir alımı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Demir, bakterilerin gelişmesindeki en önemli elementlerdendir (May ve ark., 2001).

Bakteriler bulunduğu ortamlardan demir elde etmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Plazmada demir transferrin, vücuttaki diğer sıvılarda ise laktoferrin şeklinde bulunur. *P. multocida* demiri elde etmek için siderofor mekanizması ile konakçıya ait demirce zengin laktoferrin ve transferini kullanır. Bakteride oluşan demir eksikliğinde dış membran protein reseptörleri (IROMPs); transferrin- (TbpA), laktoferrin- (Lbp), hemin veya hemoglobin-binding protein (HgbA/B) sayesinde seçici olarak demire bağlanır. Hemoglobin bağlayıcı protein başlıca virülens faktörlerinden biridir. *P. multocida* serogrup D ve A'da hemoglobin bağlayıcı proteini kodlayan gen ve dizilimi bildirilmiştir (Choi Kim ve ark., 1991; Bosch ve ark., 2002a; Cox ve ark., 2003; Krewulak ve Vogel, 2008).

Pasteurellaceae ailesi, demir bağlayıcı TbpA ve TbpB reseptörlerini içermektedir (Gray Owen ve Schryvers, 1996). Sığırlardan izole edilen *P. multocida* suşlarında yalnızca TbpA proteini bulunmaktadır (Ogunnariwo ve Schryvers 2001).

Sığır ve koyunlardan izole edilen *P. multocida* suşlarında PZR çalışmalarında *tbpA* geni tespit edilmiş ancak bu genin tüm izolatlarda bulunmadığı rapor edilmiştir (Ewers ve ark., 2006). Demir alımı için gerekli olan enerjinin TonB proteinleri (ExbB, ExbD, TonB) tarafından sağlandığı ve demir alım proteinlerinin enfeksiyon sürecinde kritik bir rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu proteinlerin inaktivasyonu ile *P. multocida*'nın farelerde attenüasyonu gerçekleştirilmiştir (Fuller ve ark., 2000; Bosch ve ark., 2002b).

1.2.7. Ekstrasellüler Enzimler

Lipaz enzimi *P. multocida* suşlarında potansiyel virulens faktörü olarak bulunmaktadır. Pratt ve ark. (2000), yaptıkları çalışmada *P. multocida* **lipaz** aktivitesini en iyi gösteren substratı Tween 40 olarak bildirmektedir. **Hiyaluronidaz** *P. multocida* tarafından üretilen diğer bir enzimdir ve suşların virülensi ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Carter ve Chengappa (1980), yaptıkları çalışmada çeşitli vakalardan izole ettikleri toplam 74 *P. multocida* A, B, D, E serogruplarının **hiyaluronidaz** aktivitelerini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada hemorajik septisemi vakasından izole edilen 13 *P. multocida* serogrup B'nin **hiyaluronidaz** ürettiğini rapor etmişlerdir.

P. multocida suşlarının **nörominidaz** (N-acetylneuraminat glycohydrolase) üretimi ilk kez 1970'de A, B, D ve E serogruplarında tespit edilmiştir. Sialik asit (N-acetylneuraminic acid, Neu5Ac), ökaryotik hücre bileşeni olarak hücre membranının stabilizasyonu, regülasyonu ve immun sistemin düzenlenmesinde etkilidir. Bakteriler konağa ait sialik asit kaynaklarını karbon, nitrojen ve enerji ihtiyacı için kullanır. **Sialidaz** ayrıca musin gibi konakçıya ait savunma mekanizmasının etkinliğini azaltarak virulansın arttırılmasında etkili olmaktadır. **Sialidaz** enziminin *NanH* ve *NanB* genleri tarafından kodlandığı ve bu üretimin serogrup A ve D gruplarında diğerlerinden fazla olduğu bildirilmektedir (Scharmann ve ark., 1970; Mizan ve ark., 2000). **Sialidaz** aktivitesi serogrup E'de sadece homolog antiserum ile inhibe

edilebilirken serogrup B ve D'de ise A, B, D ve E antiserumları ile inhibe edildiği belirtilmektedir (Rimler ve Rhoades, 1989).

1.2.8. Plazmidler

P. multocida suşlarından elde edilen plazmidler, toksin üretimi ve antibiyotik direnci (R faktörü) ile ilgilidir. Plazmidler kanatlı izolatlarında %24-70,7, sığır ve domuzla izolatlarında %47-51 ve tavşan izolatlarında ise %92 oranında tespit edilmiştir (Hunt ve ark., 2000). İzole edilen plazmidlerinin 1,3 kb-100 kb boyutunda olduğu ve bu plazmidlerin streptomisin, sülfanamid, tetrasiklin, penisilin, kanamisin ve kloramfenikol direncine neden olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, tespit edilen Tn5706 ve Tn10 transpozonların önemli mutasyonlardan sorumlu olduğu saptanmıştır (Hunt ve ark., 2000; Garrity ve ark., 2004).

1.3. Epidemiyoloji

Sığır pastörellozu, dünyanın birçok ülkesinde görülmekle birlikte çok geniş bir konakçı çeşitliliğine sahiptir. Hastalık etkenleri çoğu zaman sağlam hayvanların üst solunum yollarında ve yutaklarında fakültatif patojen olarak yaşarlar. Stres faktörleri nedeniyle hayvanlardaki direncin kırılması hastalıkların oluşmasını kolaylaştırır (Bisping ve Amtsberg, 1995; Quinn ve ark., 2004; Aydın, 2006).

Pastörellozis ilkbahar ve sonbahar aylarında merada ve ahırda beslenen hayvanlarda daha sık görülmektedir. Uzun ve yorucu yolculuk yapanlarda, fazla rutubetli ve soğuk havalarda, mevsim değişikliklerinde, aç ve hastalıklı olanlarda, iyi bakım ve hijyen şartlarında yetiştirilmeyen hayvanlarda pastörelloz yaygındır ve büyük ekonomik zararlara yol açar. Hastalık sporadik ve enzootik karakterde seyreder. Her yaştaki hayvanda görülebilen pastörellozda genel olarak bulaşmanın

etkenlerin solunum yolu, konjuktiva, derideki yaralar, sindirim yolu ile alınması sonucu olduğu bildirilmiştir (Quinn ve ark., 2004; Aydın, 2006).

1.4. Patogenezis

Pasteurella spp. enfeksiyonları endojen veya eksojen kaynaklı olabilir. Viral enfeksiyonlar ve çeşitli stres koşulları hastalığın oluşmasında hazırlayıcı faktörlerdendir (Quinn ve ark., 2004). *Pasteurella* türleri enfeksiyon bölgesinde çoğalarak dolaşım sistemine girerler. Kan damarlarında üreyen mikroorganizmalar, damar cidarının zedelenmesine neden olurlar. Kan ve dokularda mikroorganizmalar çok çabuk üreyerek, hayvanın 12-24 saat gibi kısa bir zamanda hemorajik septisemi sonucu ölümüne neden olurlar. Uzun süren olaylarda iç organlarda bakterinin ürediği ve yerleştiği yerlerde nekrotik odaklara rastlanır (Garrity ve ark., 2004; Aydın, 2006; Othman ve ark., 2012).

Pnömonik pastörellozis, akut fibrinli bronkopnömoni ve lobar pnömoni şeklindedir. Genellikle mikroorganizmaların yoğun ve hızlı proliferasyonu sonucu öldürücü fibrinli pnömoni şekillenir. Fibrinli lobar pnömonide kırmızı-siyahtan gri kahverengine değişen kraniyo-ventral yerleşimli konsolidasyon alanları, interlobuler septumun jelatinöz kalınlaşması, fibrinli plöritis ve kaogulasyon nekroz alanları karakteristiktir. Histolojik olarak mekik şekilli çekirdeklere sahip hücre kümelerinin bulunması ise yulaf hücreleri olarak tanımlanır. Yangılı alveol içinde toplanan lökositlerin, bakteri toksinlerinin etkisiyle bu şekilde görüldüğü belirtilmektedir (Hazıroğlu ve ark., 1997; Quinn ve ark., 2004; Aydın, 2006).

Kümes hayvanları ve yabani kuşlarda *P. multocida* serotip A:1, A:3 ve A:4 tavuk kolerasının primer etkenidir. Hastalık akut septisemi ile karakterizedir ve yaygın intravasküler koagülasyon, ekimotik hemoraji, multifokal nekrozis ve fibrinöz pneumoni şeklinde görülür (Christensen ve Bisgaard, 1997; Christensen ve Bisgaard, 2000).

1.5. Klinik Belirtiler

P. multocida ruminantlar ve diğer evcil hayvanlarda hemorajik septisemi, pnömonik pastörellozis, domuzlarda atrofik rinitis, kanatlılarda kolera enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Tablo 1.3). Deneysel enfeksiyonlarda inkübasyon süresi 6-24 saat kadar olmasına karşılık doğal enfeksiyonlarda 2-5 gün arasında değişmektedir (Quinn ve ark., 2004; Aydın, 2006).

Tablo 1.3 *Pasteurella multocida*'nın yerleştiği konakçılar ve oluşturduğu hastalıklar (Quinn ve ark., 2004)

<i>P. multocida</i>	Konakçı	Oluşturduğu Hastalıklar
Tip A	Sığır	Pnömonik Pastörellozis (Shipping fever), Buzağuların Enzootik Pnömonisi, Mastitis
	Koyun	Pnömoni, Mastitis
	Domuz	Pnömoni,
	Tavuk	Kolera (Fowl Cholera)
	Tavşan	Nezle (Snuffles), Plöropnömoni
	Diğer evcil ve vahşi hayvanlarda	Pnömoni
Tip B	Sığır, Manda	Hemorajik Septisemi
Tip D	Domuz	Atrofik Rinitis, Pnömoni
Tip E	Sığır, Manda	Hemorajik Septisemi

Pnömonik pastörellozis sığırlarda bronkopneumoni, 6 aylık ve daha küçük buzağılarda ise enzotik pneumoni şeklinde görülür. Solunum sistemi hastalıklarında serogrup A'nın yaygın olduğu saptanmıştır. Hemorajik septisemi Güneydoğu Asya'da *P. multocida* serogrup B ve E ile sığır, manda ve nadiren diğer türlerde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ayrıca geyiklerde *P. multocida*'dan kaynaklanan hemorajik septisemi salgınlarının da olduğu bildirilmiştir (De Alwis, 1999; Eriksen ve ark., 1999; Davies, 2004, Soike ve ark., 2012).

Pastörellozis, sığır ve mandalarda akut, subakut ve kronik formda seyreder. Akut seyreden olgularda, kısa süre içinde ölümler gözlenir. Bu nedenle de genellikle semptomlara rastlamak mümkün olmaz. Hayvanlar durgun ve iştahsızdırlar. Dışkı önceleri suludur, sonraları kan izleri içerir. Kaslarda tremorlar, epistaksis ve hematüri vardır. Subakut olgularda, hayvanın baş, boğaz ve göğüs bölgesinde gittikçe yayılma eğiliminde olan ödemler meydana gelir. Ödemler anüs, genital organlar, dil, bacaklar ve eklemlerde de görülebilir. Hayvanlar asfeksi veya kanlı ishal sonucunda ölürlür. Kronik olgularda solunum kısa ve hızlıdır. Hayvanın genel durumu bozulmuştur. Hayvan kuru ve ağrılı bir şekilde öksürür. Burundan önce mukoz sonraları mukopurulent ve kanlı bir akıntı gelir. Akciğerlerin oskültasyonunda kreptasyon sesi duyulur (De Alwis, 1999; Aydın, 2006).

Domuzlarda pastörellozis ekonomik olarak önemli olan atrofik rinitis ve bronkopnömoni enfeksiyonlarına neden olur. Atrofik rinitis vakalarının özellikle *P. multocida* serogrup D ile ilişkili olduğu, bununla birlikte daha az olarak *P. multocida* serogrup A ve *Bordetella bronchiseptica* izole edildiği bildirilmiştir. Atrofik rinitis domuzlarda, gelişim geriliği ve konka atrofisi ile karakterize ağır bir hastalığa neden olur. Enfeksiyonun atrofik rinitis ve ilerleyici atrofik rinitis olmak üzere iki formu vardır. Toksik *P. multocida* serogrup A ve D'nin sentezlediği dermonekrotik toksin (DNT) kromozomal *toxA* geni tarafından kodlanır. Önemli bir virülens faktörü olan bu toksin ilerleyici atrofik rinitisin başlıca karakteristik lezyonları oluşturur. Enfeksiyon, gözyaşı akıntısı, nazal akıntı, nazal konka atrofisi, burunda kısılma, bükülme ve hemoraji ile karakterizedir (Buttenschon ve Rosendal, 1990; Davies ve ark., 2003; Takada ve ark., 2007; OIE, 2008; Horiguchi, 2012).

Tavuk kolerası, evcil ve yabani kanatlıların perakut, akut, septisemik ve kronik olarak seyreden yüksek morbidite ve mortalite ile karakterize bir enfeksiyonudur. Tavuk kolerası vakalarında yaygın olarak *P. multocida* serogrup A izole edildiği rapor edilmiştir. Akut olgularda klinik belirtiler genellikle görülmez. Ancak enfeksiyonun geç safhasında depresyon, durgunluk, ateş, ağızdan mukoid bir akıntı gelmesi, ibik ve sakalların morarması, solunum sayısının artması gibi klinik belirtiler görülür. Perakut veya akut vakalarda teşhis ve tedavi sınırlıdır. Bu nedenle rezervuar

olanların elimine edilmesi önemlidir. Kronik formda mortalite oranı düşüktür, enfeksiyon çeşitli doku ve organlara yerleşerek lokalize enfeksiyonları oluşturur (Aydın, 2002; Christensen ve Bisgaard, 2000; Glisson ve ark., 2003; Mohamed ve ark., 2012).

Pastörellozis zoonotik önemi olan bir patojendir. Birçok *Pasteurella* spp. enfeksiyonunda insanlara hayvan ısırıklarıyla geçiş olduğu saptanmıştır. Enfeksiyonlarda *P. multocida* subsp. *multocida* ve *P. multocida* subsp. *septica*, *P. canis*, *P. dagmatis* ve *P. stomatis* izole edilmiştir *Pasteurella* enfeksiyonlarında insanlarda nekrotik fasya iltihabı, kronik akciğer absesi, endokarditis, meningitis, pnömoni, peritonitis, septisemi, perioküler abse, selülit ve granülomatöz hepatitis tespit edilmiştir (Holst ve ark., 1992; Escande ve Lion, 1993; Garrity ve ark., 2004; Christensen ve ark., 2005; Adler ve ark., 2011; Jüch ve ark., 2012). Ayrıca insandan insana bulaşmalar'da bildirilmiştir (Siahanidou ve ark., 2012).

1.6. Teşhis

Pasteurella türlerinin identifikasyonunda, konvansiyonel teknikler, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve serolojik testler kullanılmaktadır. Konvansiyonel teknikler etkenin besiyerlerinde üretilmesi ve biyokimyasal testlere dayanmaktadır. Kültür en güvenilir yöntemlerdendir, ancak uzun zaman alması, saf kültür elde etmenin zor olması gibi dezavantajları vardır. İdentifikasyonun uzun süre alması alternatif metotların ve özellikle de moleküler tekniklerin kullanımını arttırmıştır (Aydın, 2006; Dziva ve ark., 2008). Primer izolasyon genellikle Kanlı agar, Çokolata agar, Nutrient agar, Dextrose Starch agar, Tripticase Soy agar ve Casein Sucrose Yeast agar gibi besiyerlerine %5 kan (koyun-sığır) ilavesi ile yapılmaktadır. *P. multocida* izolasyonu için canlı hayvanlardan bronşial lavaj, nasal sıvap, tonsiller sıvap, eksudat ve süt örnekleri hemorajik septisemi ve kanatlı kolerası gibi septisemik durumlarda ise kan ve yeni ölmüş hayvanların iç organları kullanılabilir (Bisping ve Amtsberg, 1995; De Alwis, 1999; Christensen ve Bisgaard, 2000; Garrity ve ark., 2004; Quinn ve ark., 2004; Aydın, 2006).

İzole edilen saf *P. multocida* kolonileri Kanlı agarda kenarları ve üst yüzü düzgün, yuvarlak şekilli, gri renkli, nonhemolitik, tipik güzel kokulu, mukoid veya nonmukoid koloniler şeklindedir. Mukoid koloniler sığır, domuz ve tavşan pnömonilerinden izole edilirken, mukoid olmayan koloniler ise kanatlı ve köpeklerden izole edilmektedir. Karakteristik bipolar görünüm taze kültürlerin boyanmasında görülmektedir. Kapsüler materyal uzun süreli pasajlarla kaybolmaktadır (Dziva ve ark., 2008).

Soriano-Vargas ve ark. (2012) farklı hayvan türlerinden *P. multocida* izolasyonu için %10 koyun Kanlı agar kullandıklarını ve 24 saat 37 °C'de inkübe ettiklerini ve üreyen kolonilerin korunması içinde Brain Heart Infusion Broth içine %1 (v/v) hacimde at serumu eklediklerini bildirmişlerdir. Danimarka'da yapılan bir çalışmada, pnömonili buzağı akciğerinde *Pasteurella* spp. izolasyonu için %5 sığır kanlı Columbia Blood agar (sitratl), polimiksin (12,5 UI/ml) ve kloralhidrat (1,4 mg/ml) kullandıklarını ve %10 CO₂'li etüvde 37 °C'de 48 saat inkübe ettiklerini rapor etmişlerdir. Toplam 61 örneğin 18 (%29.5)'in de *P. multocida* izole edildiği bildirilmiştir (Madsen ve ark., 1985). Yapılan diğer bir çalışmada, 65 pnömonili sığır akciğerinden %30 oranında *M. haemolytica*, %6 oranında *P. multocida* izole edildiği bildirilmiştir (Houghton ve Gourlay, 1984). Pnömoni nedeniyle ölen veya kesilen 80 buzağı akciğerinde yapılan bir diğer çalışmada ise %73 oranında *M. haemolytica*, %15,8 oranında ise *P. multocida* tespit etmişlerdir (Allan ve ark., 1985). Tegtmeyer ve ark. (1999) Danimarka'da, pnömoni tablosu gösteren hastalıklı buzağular üzerinde yapmış oldukları bir araştırmada 72 akciğer örneğinin 35 (%49)'inde bakteriyel etkenleri izole etmişlerdir. Bunlardan 11'i *H. somnus*, 10'u *P. multocida*, 9'u *Arcanobacterium pyogenes*, 4'ü *M. haemolytica*, 2'si *Salmonella dublin*, 2'si *E. coli*, 1'i *Staphylococcus aureus* ve 1'i de *Streptococcus uberis* olarak tanımlanmıştır. Enfekte akciğerlerin çoğunda tek etken izole edilirken, 4 akciğerde *P. multocida* ve *A. pyogenes*, 1 akciğerde ise *H. somnus* ve *S. dublin* izole edilmiştir.

Girgin ve ark. (1989), 32 pnömonili buzağı akciğerinde yaptıkları çalışmada *E. coli*'yi %37,8 ve *Pasteurella* türlerini ise %18 oranında saptamıştır. Hazıroğlu ve ark. (1997), pnömoni lezyonu görülen 100 adet buzağı akciğerinin %42'sinde

M. haemolytica, %8'inde *P. multocida* ve %10'unda *Haemophilus somnus*, %7'sinde hem *M. haemolytica* hem de *H. somnus*, %2'sinde ise *M. haemolytica* ve *P. multocida* izole edildiğini rapor etmiştir. Dinler (1998), Erzurum'da pnömonili sığır akciğerlerinden %4,5 oranında *P. multocida* izole ettiğini bildirmiştir. Gündüz ve Erganiş (1998), Konya'da yaptıkları bir araştırmada *P. multocida* izolasyon oranının %15,9 olduğunu tespit etmişlerdir. Kılıç (2003), Elazığ'da yaptığı bir çalışmada sığır akciğerlerinden %6 oranında *P. multocida* izole edildiğini bildirmiştir.

P. multocida izolasyonu için selektif ve transport besiyerleri rapor edilmiştir (De Jong ve Borst, 1985; Moore ve ark., 1994; Kawamoto ve ark., 1997; Lee ve ark., 2000). Knight ve ark. (1983) selektif besiyerini klindamisin, gentamisin, potasyum tellurit, amfoterasin ve %5 at kanı ekleyerek hazırlamıştır. Bu yöntem potasyum tellurit ilave edilmeden Lariviere ve ark. (1993) tarafından domuz nazal boşluklarından *P. multocida* izolasyonu için en iyi yöntemlerden biri olarak bildirilmektedir. Ayrıca, *Pasteurella* selektif besiyeri için neomisin, eritromisin, amikasin ve vankomisin eklendiği de belirtilmiştir (Morris, 1958; Avril ve ark.,1990). *P. multocida* izolasyonunu için kullanılan selektif ekim yöntemleri ile, kanatlı kolerası şüpheli vakalarda Kanlı agarda elde edilen üreme oranlarına göre daha düşük sonuçlar alındığı tespit edilmiştir (Moore ve ark., 1994). Fare inokulasyonunun, *P. multocida*'nın selektif zenginleştirilmesinde ve taşıyıcı hayvanları belirlemede kullanılabileceği, bununla birlikte *P. multocida*'nın virulensinin farelerde değişken olduğu ve pratik olmadığı için çalışmalarda tercih edilmediği de belirtilmektedir (Lariviere ve ark., 1993).

P. multocida'nın analitik profil indeks (API) ile yarı otomatik sistemlerle identifikasyonu 1980'li yıllarda kullanılmaya başlanmıştır (Collins ve ark.,1981). Kolay ve hızlı kullanımları yanında, yüksek maliyet rutin kullanımlarına engel olmaktadır. Bununla birlikte Boot ve ark. (2004)'nin yaptıkları çalışmada API 20NE ile *P. multocida*'nın %42 oranında yanlış sınıflandırıldığı bildirilmektedir.

Geliştirilen PZR teknikleri tür spesifik olarak kromozomal gen bölgesindeki özel primerleri hedeflemektedir. Bu teknikle mikroorganizmalar kısa sürede doğru şekilde teşhis edildiğinden geleneksel metotlara göre daha avantajlıdır (Townsend ve ark.,1998). PZR'nin avantajları olmakla birlikte kontaminasyon ve ölü mikroorganizmaların DNA'larını da tespit etmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır. Ayrıca, kan, idrar, dışkı gibi materyaller ile çalışıldığında örnekler arasında kros kontaminasyon olduğu ve bu materyaller içindeki substansların PZR'ı inhibe ettiği rapor edilmektedir (Çetinkaya, 1998).

Townsend ve ark. (1998), tarafından geliştirilen 460 bp'lik özel primerin bütün *P. multocida* izolatlarında bulunan gen bölgesiyle spesifik olarak eşleştiği saptanmıştır. Miflin ve Blackall (2001), tarafından 23S'lik rRNA'ya dayalı geliştirilen 1432 bp'lik primer çiftinin, kanatlı ve domuz orjinli *P. multocida* teşhisinde spesifik olarak kullanılacağı bildirilmektedir. Townsend ve ark. (2001), *P. multocida* kapsüler gruplarını (A, B, D, E, F) multiplex PZR (mPZR) ile tiplendirerek serolojik gruplandırma metotlarına alternatif bir yöntem olabileceğini tespit etmişlerdir.

Domuzlarda atrofik rinitis vakalarında *P. multocida* toksini, önemli bir virulens faktörüdür. Yapılan çalışmalarda *toxA* geninin toksijenik *P. multocida* türlerindeki varlığı tespit edilmiştir (Buys ve ark., 1990; Lax ve ark., 1990). Kamp ve ark. (1996), toksin (*toxA*) genlerine spesifik olan primerleri kullanarak yaptıkları bir çalışmada, *tox A* geninin domuz nazal ve tonsiller sıvaplarında atrofik rinitisin nedeni olan toksijenik *P. multocida* türlerinin identifikasyonunda duyarlı ve etkili bir metot olduğunu belirtmektedirler.

P. multocida suşlarının kapsüler ve somatik serotiplendirilmesi için Lam Aglütinasyon, İndirekt Hemaglütinasyon (IHA) ve Agar Jel İmmunodifüzyon (AGID) testleri kullanılmaktadır (Anonim, 1981; Carter, 1955; Namioka ve Murata, 1961a; Heddleston ve ark., 1972). Batu ve Elverdi (1970) tarafından, Sakarya, Samsun, Çarşamba, Bafra ve Terme mezbahalarında kesilen sığır ve mandaların nazofarengeal

boşluklarından alınan 1106 sıvap örneğinin 28 (%2,53)'inde *P. multocida* izolasyon ve identifikasyonu yapılmış ve 24 (%85,7)'ü AGID testi sonucunda serogrup B olduğunu bildirilmiştir. Suudi Arabistan'da yapılan bir çalışmada 400 sığır akciğer sıvap örneğinden izole edilen 10 (%2,5) *P. multocida* suşunun AGID testi ile 4 (%50)'ü serogrup A, 2 (%25)'i serogrup C, 2 (%25)'si serogrup E olarak belirlenmiş ve 2'sinin ise tiplendirilemediği belirtilmiştir (Al-Humam ve ark., 2004). Erbaş (2007), Aydın ve İzmir'de yaptığı araştırmada, 570 sığır intratrakeal sıvap örneğinin 28 (%4,9)'inden *P. multocida* izolasyon ve identifikasyonu yaptığını, bunlardan 15 (%53,6)'ini serogrup B, 10 (%35,7)'unu serogrup A ve bir (%3,5)'ini serogrup D olarak tiplendirdiğini, izole edilen suşlardan 2 (%7,2)'sinin ise tiplendirilemediğini rapor etmiştir.

Malezya'da yapılan bir çalışmada evcil ve yabani farklı hayvan türlerinden izole edilen 114 *P. multocida* suşunun kapsüler grupları multipleks PZR ile belirlenmiştir. Kapsüler serogrubun 53'ü A, 33'ü B, 6'sı D olduğu ve 22'sinin ise tiplendirilemediği bildirilmiştir (Arumugam ve ark., 2011). Meksikada 2008-2010 yılları arasında farklı hayvan türlerinden (koyun (4), tavşan (25), sığır (2), domuz (1), keçi (1), ördek (1)) izole edilen 34 *P. multocida* suşunun, PZR ile kapsüler grupları belirlenmiştir. İzole edilen örneklerden 33 (%97,05)'ü serogrup A 1 (%2,95)'i ise serogrup D olarak gruplandırılmış ayrıca tavşan ve ördek kaynaklı *P. multocida* serogrup A'nın bu bölgede ilk olduğu bildirilmiştir (Soriano-Vargas ve ark., 2012). Yapılan diğer bir çalışmada Korede 2009 ve 2010 yılları arasında 182 farklı çiftlikten toplanan 443 domuz akciğer örneğininin 69'undan *P. multocida* izole edilmiş ve multipleks PZR ile kapsüler grupları belirlenmiştir. Suşlardan 47'si serogroup A (%68.1) ve 22'si serogroup D (%31.9) olarak belirlenmiştir (Lee ve ark., 2012).

Serolojik testler rutin teşhiste daha az kullanılmaktadır. *Pasteurella* enfeksiyonlarında antikor düzeyi serolojik olarak Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ile belirlenebilmektedir. Bu amaçla domuzlarda atrofik rinitise neden olan toksijenik suşların (Foged, 1988; De Jong, 1999) ve hemorajik septisemi vakalarında ise *P. multocida* dış membran proteinleri kullanılarak aşının veya enfeksiyonun neden olduğu antikor düzeyi belirlenebilmektedir (Prado, 2006). Ayrıca

kanatlılarda ve tavşanlarda enfeksiyonunun tespiti için ticari ELISA kitlerinin de kullanıldığı bildirilmiştir (Klaassen ve ark., 1985; Samuel ve ark., 2003).

1.7. Sağaltım

Hayvanların sağaltımında antibiyotiklerin kullanımı önemli bir yere sahiptir. Hastalar, sağlıklı olanlardan ayrıldıktan sonra sağaltıma en kısa zamanda başlanması önerilmektedir. Bununla birlikte *Pasteurella* enfeksiyonlarının tedavisinde yetersiz dozlarda, geniş spektrumlu antibiyotiklerin sık sık kullanılması antibiyotiklere karşı direncin gelişmesinde rol oynamaktadır (Quinn ve ark., 2004; Rose ve ark., 2012).

Rerat ve ark. (2012), buzağılardan alınan 79 lavaj örneğinin 18 (%23)'inden *P. multocida* izole edildiğini ve yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde ise *P. multocida* suşlarının yüksek oranda tylosin (%83) ve tilmikosin (%56)'e dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada 72 sığır ve 68 domuz kaynaklı *P. multocida* izolatları için 10 farklı antibiyotik diski (oksitetrasiklin, doksisiklin, tilmikosin, tiamfenikol, benzilpenisilin, aspoksilin, seftiofur, dihidrostreptomisin, kanamisin, enrofloksasin) kullanarak Agar Dilüsyon Metodu ile Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerlerini tespit etmişlerdir. Sığır ve domuz izolatlarının enrofloksasin ile seftiofura duyarlı, sığır izolatları dihidrostreptomisin ve benzilpenisiline, domuz izolatları ise oksitetrasiklin ile tiamfenikole dirençli olduğu bildirilmiştir (Yoshimura ve ark., 2001).

Yapılan bir başka çalışmada 6-18 aylık hasta buzağı akciğerlerinden izole edilen 160 *P. multocida* suşunun antibakteriyel duyarlılıkları ve yıllara göre bakterinin izolasyon oranları araştırılmış ve 1994-2002 yıllarında bu oran %20 - 47,4 arasında değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir. İzole edilen *P. multocida* suşlarının yıllara göre duyarlılıklarının, ampisilin için %76-100, seftiofur, sefalotin ve enrofloksasin için %96-100, sülfametoksazol-trimetoprim için %76-100, eritromisin için %34-93, florfenikol için %86-100, tilmikosin için %58-92, tetrasiklin için %40-

71 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Welsh ve ark., 2004). Wallmann (2006), sığırlardan elde edilen 132 *P. multocida* izolatının nalidik aside %3,7, enrofloksasine %0,2, sefoperazona %2,9, sefotaksime %1,1 ve seftiofura %0,7; domuzlardan elde edilen 442 *P. multocida* izolatının ise nalidik aside %10,6, enrofloksasine %1,5, sefoperazona %3, sefotaksime %6,8 ve seftiofura %1,5 oranında dirençli olduğunu saptamıştır. Aydın ve İzmir’de yapılan bir çalışmada 570 sığır akciğerinden izole edilen 28 (%4,9) *P. multocida* suşunun florfenikole %93, enrofloksasine %61 ve oksitetrasikline %54 oranında duyarlı, eritromisin, sũlfametoksazol-trimetoprim %82, gentamisine %64 ve amoksisilin klavulanik aside ise %61 oranında dirençli olduğu bildirilmiştir (Erbaş, 2007).

1.8. Korunma

Sığırlarda görũlen viral ve bakteriyel kaynaklı solunum yolu enfeksiyonlarında korunmanın en geçerli yolu aşılama olarak kabul edilmektedir. Enfeksiyonlardan korunmak amacıyla yapılacak aşılamanın hastalığın şiddetini ve insidensini azaltacağı bildirilmektedir (Quinn ve ark., 2004).

Pasteur, 1880’li yıllarda kanatlı kolerasından izole ettiği *P.multocida* izolatlarını *in vitro* pasajlarla attenu ederek ilk defa aşı olarak kullanmıştır. Gũnũmũzde kullanılan aşılar, inaktif veya canlı attenu aşılardan oluşmaktadır. İnaktif aşılar, yaygın olarak kullanılmaktadır; fakat immunitenin spesifik homolog serotipe karşı gelişmesi, etki sũresinin kısa olması ve immunitenin değişkenlik gũstermesi gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Canlı aşılarda ise immunitenin heterolog suşlara karşı gelişebilmekte ve uygulama kolaylığı bulunmaktadır. Fakat aşı suşlarının virũlens yeteneğini tekrar kazanması mortalitelere sebep olmaktadır (OIE, 2008). Pastorellozdan korunmak için buzağılarda aşılama ve hiperimmün serumların uygulanmasının, sũtten kesme ve taşımadan (yorgunluk, açlık, kũtũ bakım, hijyen ve çevre şartlarından) en az 15 gũn önce yapılmasının uygun olacağı bildirilmektedir (Aydın, 2006).

Bu çalışma ile Afyonkarahisar ilinde sığırlardan *P.multocida* izolasyonu, tiplendirilmesi, izole edilen suşların antibiyotik duyarlılıkları ve bazı virülens genlerinin PZR ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. *Pasteurella multocida* İzolasyonu İçin Örnekler

Bu çalışmada Afyonkarahisar ilinde bulunan mezbaha ve çiftliklerdeki sığırlardan *P. multocida* izolasyonu amacıyla 650 örnek toplandı (Tablo 2.1). Farklı hayvanlara ait; mezbahalardan 300 akciğer örneği, çiftliklerden 200 nazal sıvap (sağlıklı 170, hasta 30) ve 150 trakeal yıkantı (sağlıklı 130, hasta 20) örneği alındı. Akciğer örnekleri steril poşetlere, nazal sıvap örnekleri stuart transport sıvaplara ve trakeal yıkantı örnekleri ise steril serum fizyolojik (10 ml) ile steril enjektörlere alındı. Örnekler, soğuk zincirde Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına getirildi.

Tablo 2.1. Sığırlardan alınan örneklerin yaş ve cinsiyete göre dağılımı

Örnek	Klinik görünüm		Yaş						Erkek					
	Sağlıklı	Hasta	1 yaş altı		1-3 yaş		4-7 yaş ve üzeri		1 yaş altı		1-3 yaş	4-7 yaş ve üzeri		
			(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Akciğer	300	-	-	-	100	33,3	150	50	-	-	50	16,7	-	-
Nazal Sıvap	170	30	-	-	90	45	30	15	-	-	80	40	-	-
Trakeal Yıkantı	130	20	100	66,7	-	-	-	-	50	33,3	-	-	-	-
Toplam	600	50	100	15,4	190	29,2	180	27,7	50	7,7	130	20	-	-

2.1.2. Standart Suşlar

Çalışmada kullanılan standart *P. multocida* subsp. *multocida* (American Type Culture Collection (ATCC) 43137, ATCC 43017, ATCC 43019, ATCC 43020) suşları Amerika (Manassas, Virginia 20108, www.atcc.org.)’dan temin edildi.

2.1.3. Deneş Hayvanları

Standart *P. multocida* suşlarından hiperimmün serum hazırlamak amacıyla her bir suş için ikişer adet ve kontrol olmak üzere 3,5-4 kg ağırlığında 13 Yeni Zelanda ırkı tavşan kullanıldı. Yeni Zelanda ırkı tavşanlar, Afyon Kocatepe Üniversitesi Deneş Hayvanları Ünitesi'nden sağlandı. Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneşleri Yerel Etik Kurulu (04.05.2009 tarih ve 18-09 nolu çalışma) tarafından onay alınmasıyla yönergesine uygun şekilde yapıldı.

2.1.4. Antibiyotik Standartları

Sığırlardan izole edilen *P. multocida* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla, Amoksisilin (25 µl, Oxoid 47026), Amoksisilin-Klavulanik Asid (30 µl, Oxoid 794983), Enrofloksasin (5 µl, Oxoid 923249), Eritromisin (15 µl, Oxoid 879399), Florfenikol (30 µl, Oxoid 889513), Gentamisin (10 µl, Oxoid 869234), Linkomisin-Spektinomisin (109 µl, Oxoid 446092), Oksitetrasiklin (30 µl, Oxoid 882961), Penisilin G (10 units, Oxoid 870701), Seftiofur (30 µl, Oxoid 791581), Sulfametoksazol-Trimetoprim (25 µl, Oxoid 895798), Tilmikosin (15 µl, Oxoid 920833) ve Tulatromisin (30 µl, Pfizer 256244) antibiyotik diskleri kullanıldı.

2.1.5. Kullanılan Besiyerleri ve Solusyonlar

Columbia Blood Agar Base (Oxoid CM0331)

Peptone	23,0 g
Starch	1,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	10,0 g
Distile su	1000 ml
(25 °C pH 7,3±0,2)	

Karışım 39 g/L olacak şekilde hazırlanarak, 121 °C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra 50 °C'ye kadar soğutulup %5 oranında koyun kanı ilave edilerek steril petrilere döküldü.

Kanlı Agar Base (Fluka 70133)

Meat extract	10,0 g
Peptone	10,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	10,0 g
Distile su	1000 ml
(25 °C pH 7,3±0,2)	

Karışım 40 g/L olacak şekilde hazırlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra 50 °C'ye kadar soğutulup, %7 oranında koyun kanı ilave edildi ve steril petrilere döküldü.

Mac Conkey Agar (Merck 1.05465)

Peptone	20,0 g
Lactose	10,0 g
Bile salts	1,5 g
NaCl	5,0 g
Agar	13,5 g
Neutral red	0,03 g
Crystal violet	0,001 g
Distile su	1000 ml
(25 °C pH 7,4±0,2)	

Karışım 52 g/L olacak şekilde distile su içinde eritildi. 121 °C’de 15 dakika otoklav edildikten sonra 50 °C’ye kadar soğutulup steril petrilere döküldü.

Oksidasyon ve Fermentasyon Besiyeri (OF) (Merck 1.10282)

Peptone from casein	2,0 g
Yeast extract	1,0 g
NaCl	5,0 g
Na ₂ HPO ₄	0,2 g
Bromothymol blue	0,08 g
Agar	2,5 g
Distile su	1000 ml
(25 °C pH 7,1±0,2)	

Karışım 11 g/L olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra 121’de °C 15 dakika otoklav edildi. Daha sonra 55 °C’ye kadar soğutulup % 10’luk steril glukoz, laktoz ve sukroz solusyonlarından son konsantrasyonu % 1 olacak şekilde ilave edilerek, steril tüplere (13x100 mm) 5’er ml dağıtıldı.

Brain Heart Infusion Agar – BHIB (Merck 1.13825)

Nutrient substrate	27,5 g
D(+) Glucose	2,0 g
NaCl	5,0 g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g
Agar-agar	15,0 g
Distile su	1000 ml
(25 °C pH 7,4±0,2)	

Dehidre besiyeri 52,0 g/L olacak şekilde distile su içinde hazırlandı ve 121 °C'de 15 dakika sterilize edilerek steril petrilere döküldü.

Peptone Water (Oxoid CM9)

Peptone	10,0 g
NaCl	5,0 g
Distile su	100 ml

(25 °C pH 7,2 ±0,2)

Karışım 15 g/L olacak şekilde hazırlanarak, tüplere 5 ml dağıtıldı ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

Nitrat Broth (Merck 1.10204)

Peptone	8,6 g
KNO ₃	1,5 g
NaCl	6,4 g
Distile su	1000 ml

(25 °C pH 7,2 ±0,2)

Karışım 16,5 g/L olacak şekilde eritildikten sonra, tüplere 5 ml dağıtılıp 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Nitrat testi için Griess-Ilosvays nitrit çözeltisi (Merck 1.09023) ve çinko tozu (Merck 1.08774) ile birlikte kullanıldı.

Triple Sugar Iron Agar (Oxoid CM0277)

Lab-Lemco' powder	3,0 g
Yeast extract	3,0 g

Peptone	20 g
NaCl	5,0 g
Lactose	10,0 g
Sucrose	10,0 g
Glucose	1,0 g
Ferric citrate	0,3 g
Sodium thiosulphate	0,3 g
Phenol red	0,0024 g
Agar	12,0 g
Distile su	1000 ml

(25 °C pH 7,4 ±0,2)

Dehidre besiyeri 65 g/L olacak şekilde distile su içinde eritildi. Besiyeri sıvı halde iken, standart 16 x 160 mm tüplere 7'şer ml olacak şekilde dağıtılıp, tüpler 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Otoklav çıkışında besiyeri henüz sıvı iken tüpler 1-1,5 cm yüksekliğe yatırılarak besiyerinin katılaşması beklendi.

Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck 1.05459)

Pancreatic digest of casein	17,0 g
Enzymatic digest of soya bean	3,0 g
NaCl	5,0 g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g
Glucose	2,5 g
Distile su	1000 ml

(25 °C pH 7,3 ±0,2)

Dehidre besiyeri, 30 g/L olacak şekilde distile su içinde hazırlandı. 5 ml olacak şekilde tüplere dağıtılıp 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

Mueller -Hinton Agar (Merck 1.05437)

Meat infusion	2,0 g
Casein hydrolysate	17,5 g
Starch	1,5 g
Agar-agar	13,0 g
Distile su	1000 ml
(25 °C pH 7,4 ±0,2)	

Besiyeri, 34 g/L olacak şekilde distile su içinde eritildi 121 °C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra 55 °C'ye kadar soğutulup, % 5 oranında koyun kanı ilave edildi ve steril petrilere döküldü.

Tryptic Soy Agar (Merck 1.05458)

Peptone from casein	15,0 g
Peptone from soymeal	5,0 g
NaCl	5,0 g
Agar-agar	15,0 g
Distile su	1000 ml
(25 °C pH 7,3 ±0,2)	

Dehidre besiyeri, 40 g/L olacak şekilde distile su ile hazırlandı ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi.

MR-VP Broth (Merck 1.05712)

Peptone from meat	7,0 g
D(+) Glucose	5,0 g
Phosphate buffer	5,0 g

Distile su	1000 ml
(25 °C pH 7,3 ±0,2)	

Dehidre besiyeri, 17 g/L olacak şekilde distile su içinde eritilip, standart deney tüplerine 5'er ml olarak dağıtıldı ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi.

Simmons Citrate Agar (Merck 1.02501)

NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
NaCl	5,0 g
Sodium citrate	2,0 g
MgSO ₄	0,2 g
Bromothymol blue	0,08 g
Agar-agar	13,0 g
Distile su	1000 ml
(25 °C pH 6,6 ±0,2)	

Besiyeri, 22,3 g/L olacak şekilde distile su içinde eritildi. 121 °C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra besiyeri henüz sıvı iken tüpler 1-1,5 cm yüksekliğe yatırılarak besiyerinin katılaşması beklendi.

Moeller Decarboxylase Broth with Ornithine (BBL, 221663)

Peptic Digest of Animal Tissue	5,0 g
Beef Extract	5,0 g
Dextrose	0,5 g
Bromcresol Purple	0,01 g
Cresol Red	0,005 g
Pyridoxal	0,005 g

Distile su 1000 ml
(25 °C pH 6,0 ±0,2)

Besiyeri, 10,52 g/L olacak şekilde distile su içinde eritildi ve 10 g L-Ornithine (Fluka 75470) ilave edilerek 5 ml olacak şekilde tüplere dağıtılıp 121 °C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra kullanıldı.

Kovaks Ayıracı (Merck 1.09293)

n-Butanol 750ml
Hydrochloric acid(%37) 250ml
4-Dimethylaminobenzaldehyde 50g

10 ml peptonlu su besiyerinde geliştirilmiş saf kültür içerisinde 1 ml çözelti eklendi ve oluşan renk reaksiyonuna göre değerlendirildi.

2.1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

2.1.6.1. DNA Ekstraksiyonu

P. multocida kontrol suşları ve izolatlardan DNA ekstraksiyonu, Genejet Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, K0721) üretici firmanın önerdiği şekilde kullanıldı.

2.1.6.2. PZR'da Kullanılan Primer, Enzim, Buffer ve Solusyonlar

P. multocida ve kapsül geninin PZR ile tanısında kullanılan primerlere ait gen bölgeleri ve baz dizilimleri Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. *P. multocida*'nın PZR ile tanısında kullanılan primerler

Serogrup	Gen	Primer	Sekans (5' - 3')	Ürün Uzunluğu	Kaynak
-	<i>KMT1</i>	KMT1T7	5'-ATC-CGC-TAT-TTA-CCC-AGT-GG-3'	460	Townsend ve ark., 1998
		KMT1SP6	5'-GCT-GTA-AAC-GAA-CTC-GCC-AC-3'		
-	<i>OMP</i>	PMOut-F	5'-AGG-TGA-AAG-AGG-TTA-TG-3'	221	Neumann ve ark., 1998
		PMOut-R	5'-TAC-CTA-ACT-CAA-CCA-AC-3'		
A	<i>hyaD-hyaC</i>	CAPA-F	5'-TGC-CAA-AAT-CGC-AGT-GAG-3'	1044	Townsend ve ark., 2001
		CAPA-R	5'-TTG-CCA-TCA-TTG-TCA-GTG-3'		
B	<i>bcbD</i>	CAPB-F	5'-CAT-TTA-TCC-AAG-CTC-CAC-C-3'	760	Townsend ve ark., 2001
		CAPB-R	5'-GCC-CGA-GAG-TTT-CAA-TCC-3'		
D	<i>dcfF</i>	CAPD-F	5'-TTA-CAA-AAG-AAA-GAC-TAG-GAG-CCC-3'	657	Townsend ve ark., 2001
		CAPD-R	5'-CAT-CTA-CCC-ACT-CAA-CCA-TAT-CAG-3'		
E	<i>ecbJ</i>	CAPE-F	5'TCC-GCA-GAA-AAT-TAT-TGA-CTC-3'	511	Townsend ve ark., 2001
		CAPE-R	5'-GCT-TGC-TGC-TTG-ATT-TTG-TC-3'		

PZR reaksiyon karışımlarının hazırlanmasında 5 U/ μ l'lik Taq DNA Polimeraz (EP0402, Fermentas), 10 mM'lık dNTP (R0192, Fermentas), 25 mM'lık MgCl₂ (EP0402, Fermentas), 10X Taq Buffer (NH₄)₂SO₄ (EP0402, Fermentas), 10X Taq Buffer KCl (EP0402, Fermentas) reagentları kullanıldı.

Jeli hazırlamak için, Agaroz (101674PR, Basica Le Agarose) ve 10X Tris Borik asit EDTA tamponu (TBE) (B52, Fermentas), PZR ürünlerinin jelde görüntülenmesi

için Etidyum Bromür (17896, Thermo), yükleme boyası 6X DNA Loading Dye (R0611, Fermentas), marker olarak 100 bp DNA Ladder (SM0323, Fermentas) ve negatif kontrol olarak deiyonize su (DEPC-treated Water) (R0601, Fermentas) kullanıldı.

2.1.6.3. Kullanılan Cihazlar

PZR ürünlerini yürütmek için yatay DNA elektroforez cihazı (Thermo EC CSSU2020, USA), elektroforez güç kaynağı (Thermo EC 3000P, USA), testlerde kullanılan kuru kimyasalların tartım işlemlerinde hassas terazi (Ohaus Pioneer, USA) kullanıldı. PZR karışımları, negatif basınçla havadan kontaminasyonunu önleyen steril kabinde (ESCO Class II Type B2, USA) hazırlandı. PZR işlemleri sırasında örneklerin ve hazırlanan kimyasalların karıştırılmasında mekanik karıştırıcı (FineVortex, Kore), santrifüj işlemi için soğutmalı santrifüj (Sigma 1-15K, UK), spesifik gen bölgelerinin amplifikasyonunda ise Thermal Cycler (Techne TC-plus, UK) kullanıldı. PZR sonucu elde edilen amplifikasyon ürünleri jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat ETX-20M, France) değerlendirildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. *Pasteurella multocida*'nın İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Akciğer, nazal sıvı ve trakeal yıkantı örneklerinden %5'lik Columbia Blood agara ekimler yapıldı ve 37 °C'de 24-48 saat inkübe edildi. Columbia Blood agarda üreyen bakterilerin koloni morfolojileri ve hemoliz özellikleri incelendi. Elde edilen kültürlerden Gram boyama yapıldı. Gram negatif ve kokobasil şeklinde görülen kolonilerden %5'lik koyun Kanlı agara pasajlar yapılarak saf kültürleri elde edildi (Aydın, 2006; Garrity ve ark., 2004; Quinn ve ark., 2004).

2.2.1.1. Katalaz Testi

Test edilecek *P. multocida* suşlarının Brain Heart Infusion agarda 37°C'de 24 saatlik kültürleri hazırlandı. Taze kültürlerden öze ile alınarak lam üzerine konuldu ve üzerine bir damla %30'lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) damlatıldı. Hava kabarcıklarının görülmesi pozitif olarak değerlendirildi (Arda, 2006).

2.2.2.2. Oksidaz Testi

Bakterilerin oksidaz aktivitesinin belirlenmesinde oksidaz diski (Bacto, 1633-35-2) kullanıldı. Şüpheli kültürden Kanlı agara ekimi yapılan 37 °C'de 18-24 saatlik koloniler platin öze ile alınarak oksidaz diskine yayıldı. Diskin 10-15 saniye içinde kırmızı-mor bir renk alması pozitif olarak kabul edildi (Arda, 2006).

2.2.2.3. İndol Testi

Kanlı agarda 37 °C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra üreyen *P. multocida* şüpheli saf kültürden peptonlu buyyona ekim yapıldı. Kültürler, 37 °C'de 1-5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kültürlerin üzerine kovaks ayırıcından 0,5 ml ilave edildi. Tüplerin üst kısmında 1-2 dakika içinde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif olarak değerlendirildi (Arda, 2006).

2.2.2.4. Üreaz Testi

P. multocida'nın Kanlı agarda 18-24 saatlik saf kültüründen üreli buyyona geçilerek 37 °C'de 1-5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyeri renginin kırmızıya dönmesi pozitif olarak kabul edildi (Arda, 2006).

2.2.2.5. Nitrat Testi

Kanlı agarda 18-24 saatlik saf kültürden nitratlı besiyerine ekim yapıldıktan sonra 37 °C'de 1-5 gün inkübasyona bırakıldı. Tüplerin üzerine Griess-Ilosvays ayırıcından 5'şer damla damlatılarak hafifçe çalkalandı. Besiyerinde 1-2 dakika içinde kırmızı rengin oluşması pozitif olarak değerlendirildi (Arda, 2006).

2.2.2.6. Mac Conkey Agarda Üreme

P. multocida şüpheli bakterilerin 18-24 saatlik saf kültürlerinden Mac Conkey agara pasaj yapılarak, 37 °C'de 48-72 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda Mac Conkey agarda üreyen ve üremeyen koloniler, *P. multocida* yönünden değerlendirildi (Mutter ve ark., 1989).

2.2.2.7. Oksidasyon ve Fermentasyon (O/F) Testi

Kanlı agarda 37 °C'de 18-24 saat inkübasyon sonunda üreyen *P. multocida* şüpheli saf kültürden iğne uçlu öze ile alınan bir koloni tüpteki Hugh Leifson besiyerine ekildi. İkinci tüpe ise ekim sonucunda fermentasyon için 1 cm kalınlıkta sıvı parafin ilave edildi ve tüpler 37 °C'de 1-15 gün inkübasyona bırakıldı. Parafinsiz tüpte glikozun ayrışması sonucu rengin yeşilden sarıya dönmesi oksidatif; her iki tüpde de rengin sarıya çevrilmesi fermentatif olarak kabul edildi (Arda, 2006).

2.2.2.8. Hareket Testi

Pasteurella spp.'nin hareket testleri, yarı-katı agarda üreme ve lam-lamel arası yöntem kullanılarak yapıldı. Kanlı agarda 37 °C'de 18-24 saatlik saf bakteri kültüründen Hugh Leifson besiyerine iğne uçlu öze ile alınan bir koloni dik olarak tüplerdeki besiyerine ekildikten sonra 37 °C'de 1-15 gün inkübe edildi. Hareket,

pozitif olan suşlarda ekim hattı dışına doğru yayılma gözlenirken, hareket negatif olan suşların sadece ekim hattı boyunca ürediği belirlendi. Lam-lamel arası yöntemde ise buyyonda 37 °C'de 18-24 saat üretilen saf bakteri kültürü mikroskopta 40x'lık büyütmede diyafram kapalı olarak hareketli olup olmadıkları incelendi (Arda, 2006).

2.2.2.9. Triple Sugar Iron (TSI) Agar Testi

İzole edilen 18-24 saatlik saf kültürlerden iğne uçlu öze ile alınan koloniler TSI besiyerinin dip kısmına ve aynı hat boyunca çıkarılarak besiyerinin yatık yüzeyine sürüldü ve 37 °C'de 24-48 saat inkübe edildi. Süre sonunda besiyeri yüzeyi (laktoz ve sakkaroz) ve dip kısımlarında (glikoz) oluşan renk, gaz kabarcıkları ve siyahlaşma (H₂S) yönünden değerlendirildi (Arda, 2006).

2.2.2.10. Karbonhidrat Fermentasyon Testleri

Karbonhidrat fermentasyon testleri Hugh Leifson besiyerine % 1'lik karbonhidrat (D-sükroz, D-glikoz, D-mannitol, D-sorbitol, İnositol, Amigdalin, L-ramnoz, D-melibioz, L-arabinoz) ilave edilerek hazırlandı. Yirmidört saatlik saf bakteri kültüründen bir-iki koloni karbonhidratlı besiyerinde süspansiyon edilip 37 °C'de 3-7 gün inkübasyona bırakıldı. Normalde mavi olan besiyerinin sarı renge dönüşümü pozitif olarak, aynı kalması ise negatif olarak kabul edildi (Arda, 2006).

2.2.2.11. Sitrat Kullanım Testi

Kanlı agarda 18-24 saat üretilen *P. multocida* şüpheli saf kültürden Simmons Citrate agara ekim yapıldıktan sonra 1-5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda besiyeri renginin maviye dönüşümü pozitif olarak değerlendirildi (Arda, 2006).

2.2.2.12. Metil Red Testi

Kanlı agarda 37 °C’de 18-24 saat inkübasyondan sonra üreyen *P. multocida* şüpheli saf kültürler, MR-VP buyyona ekildikten sonra 37 °C’de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda kültürlerle 5-6 damla metil kırmızısı solusyonu damlatıldı. Besiyerinde kırmızı rengin oluşması pozitif olarak kabul edildi (Arda, 2006).

2.2.2.13. Voges-Proskauer Testi

Kanlı agarda üretilen 18-24 saatlik *P. multocida* şüpheli saf kültürler, MR-VP buyyona ekildikten sonra 37 °C’de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda kültür tüpüne 0,6 ml alfa-naftol ve 0,2 ml KOH ilave edildi. 5-10 dakika içinde kırmızı rengin oluşması pozitif olarak değerlendirildi (Arda, 2006).

2.2.2.14. Ornitin Dekarboksilaz Testi

P. multocida suşlarının Tryptic Soy agarda 18-24 saatlik kültürlerinden bir koloni alınarak ornitin ilaveli Moeller Decarboxylase Broth’a ekildi ve 1 ml sıvı steril parafin eklendi. Kültürler 37 °C’de 18-24 saat inkübasyondan sonra besiyeri renginin mor olması pozitif olarak kabul edildi (Arda, 2006).

2.2.3. *Pasteurella multocida* Suşlarının Serogruplandırılması

2.2.3.1. Hiperimmün Serum Hazırlanması

Hiperimmün serum elde etmek için Yeni Zelanda ırkı tavşanlar ve dört farklı gruba ait standart *P. multocida* suşları (ATCC 43137 (Carter Grup A), ATCC 43017 (Carter Grup B), ATCC 43019 (Carter Grup D), ATCC 43020 (Carter Grup E)) kullanıldı.

Standart suşlar 6-8 saat BHI Broth içerisinde üretildi ve suşların %5'lik koyun Kanlı agara ekimleri yapıldı. 37 °C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra üreyen standart suşlar %0,3'lük formollü FTS'de MacFarland Tüp No. 4'e göre ayarlandı. Hazırlanan antijenler tavşanlara 4'er gün ara ile intravenöz yolla 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 ve 2 ml olarak verildi. Son olarak 7 gün sonra formol kullanılmadan aynı şekilde hazırlanan canlı bakteri süspansiyonundan 0,5 ml deri altı yolla enjekte edildi. On gün sonra tavşanlardan kan alınarak kan serumları çıkartıldı ve -20 °C'de sero gruplandırma için saklandı (Carter, 1955; Carter, 1962; Namioka ve Murata; 1961a; OIE, 2008).

2.2.3.2. Lam Aglütinasyon Testi

P. multocida suşlarının sero gruplandırılması amacıyla Kanlı agarda 18-24 saatlik taze kültürlerden bir koloni alınarak bir damla FTS ile süspansiyon yapıldı. Daha sonra üzerine bir damla hiperimmün serum ilave edilerek karıştırıldı. Karışımın 30 saniye içinde verdiği aglütinasyonlar değerlendirildi (Namioka ve Murata; 1961a; OIE, 2008).

2.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Sığırlardan izole edilen ve sero gruplandırılan *P. multocida* suşlarına PZR yapıldı. PZR işlemi; DNA ekstraksiyonu, amplifikasyon, elektroforez ve görüntüleme olmak üzere dört aşamada gerçekleştirildi.

2.2.4.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için Genejet Genomic DNA Purification Kit (Fermentas K0721) kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi üretici firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirildi. Her bir örneğin bulunduğu kültür 1,5 ml'lik steril endorflara aktarılarak + 4° C'de 5000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pelete 180 µl

lizis (Digestion) solusyonu ve 20 µl proteinaz K ilave edilerek, 56° C’de 30 dakika su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Lizata 20 µl RNase A solusyonundan ilave edildi ve 10 dakika oda ısısında bekletildi. Lizis solusyonundan 200 µl eklenerek 15 saniye vortekslendi ve üzerine %50’lik etanolden 400 µl ilave edilerek tekrar 15 saniye vortekslendi. Bu sıvı Genejet Purification kolonuna aktarılarak ependorfun içine yerleştirilip 6000xg 1 dakika santrifüj edildi. Kolona 500 µl yıkama sulusyonu I (Wash Buffer I) eklendi 8000xg 1 dakika santrifüj edildi ve tekrar 500 µl yıkama sulusyonu II (Wash Buffer II) ilave edilerek 15 000xg 3 dakika santrifüj edildi. Kolon yeni ependorfa aktarılarak 200 µl elüsyon solusyonu (Elution Buffer) eklendi ve 2 dakika oda ısısında bekletildi. İnkübasyon sonunda 8000xg 1 dakika santrifüj edilerek PZR’da kullanılana kadar -20°C’de saklandı.

2.2.4.2. PZR’da Kullanılan Primerler

Sığırlardan izole edilen suşlara *P. multocida* PZR spesifik genlerine ait (KMT1 geni 460 bp, OMP geni 221 bp) primerler kullanılarak yapıldı (Neumann ve ark., 1998; Townsend ve ark., 1998). Kapsüler grupların belirlenmesinde ise Townsend ve ark. (2001)’nın geliştirdiği spesifik genlere (*hyaD-hyaC* geni 1044 bp, *bcbD* geni 760 bp, *dcbF* geni 657 bp, *ecbJ* geni 511 bp) ait primerler kullanıldı. Liyofilize primerler, konsantrasyonları 10 pmol olacak şekilde sulandırıldıktan sonra vortekslenerek -20 °C’de saklandı.

2.2.4.3. PZR Karışımının Hazırlanması

Reaksiyon karışımları toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı ve ince duvarlı steril PZR tüplerine dağıtıldı (Neumann ve ark., 1998; Townsend ve ark., 1998; Townsend ve ark., 2001). PZR işleminde kullanılan karışımlar kontaminasyonu önlemek için steril kabinde hazırlandı (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. PZR protokollerinde kullanılan karışımlar

Reagent	KMT1	PMOut	CAP A,B,D,E
	Forward/Reverse (μ l)	Forward/Reverse (μ l)	Forward/Reverse (μ l)
10X PZR Buffer	2,5	2,5	2,5
dNTP (10mM)	0,5	0,5	0,5
MgCl ₂ (25mM)	2	2,5	2
Primer F (10 μ mol)	1	1	1
Primer R (10 μ mol)	1	1	1
Taq DNA polimeraz (5u/ μ l)	0,4	0,4	0,4
Steril H ₂ O	13,6	13,1	13,6
Template DNA	4	4	4
Toplam	25	25	25

2.2.4.4. Nükleik Asitlerin Çoğaltılması (Amplifikasyon)

Optimizasyon, orijinal yönteme uygun olarak pozitif kontrollerin verdiği en iyi amplifikasyon sonucuna göre yapıldı (Neumann ve ark., 1998; Townsend ve ark., 1998; Townsend ve ark., 2001). Örneklere ait kalıp DNA ve PZR bileşenleri Thermal Cycler cihazına yerleştirilene kadar buz kalıbında bekletildi. Çalışmada uygulanan PZR protokolleri Tablo 2.4’te sunulmuştur.

Tablo 2.4. Uygulanan PZR protokolleri

Reagent	KMT1 Forward/Reverse (μl)	PMOut Forward/Reverse (μl)	CAP A,B,D,E Forward/Reverse (μl)
Denatürasyon	95°C 4 dk 30 siklus	94°C 5 dk 30 siklus	95°C 5 dk 30 siklus
Bağlanma	95 °C 1 dk 55 °C 1 dk 72 °C 1 dk	94 °C 1 dk 56 °C 1 dk 72 °C 2 dk	95 °C 30 sn 55 °C 30 sn 72 °C 30 sn
Uzama	72 °C 9 dk	-	72 °C 5 dk

2.2.4.5. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Elektroforez İşlemi

Amplifiye edilen PZR ürünleri orijinal yonteme uygun olarak %2'lik agaroz jelde yürütüldü. Jeli hazırlamak için 2g agaroz, steril erlene konduktan sonra 100 ml 1x TBE ile çözdürüldü ve mikrodalga fırında 45 sn bekletilerek eritildi. Eriyen agaroz 15 dakika kadar oda sıcaklığında tutulduktan sonra 45 °C'ye kadar soğutuldu ve üzerine 10 mg/ml etidyum bromid eklendi. Jel, kabarcık oluşmayacak şekilde hafifçe karıştırıldıktan sonra yatay DNA elektroforez kalıbına döküldü. Ardından jele aplikasyon tarakları yerleştirilerek, jelin 25-45 dakika süresince soğuması beklendi. Daha sonra taraklar yavaşça çıkarıldıktan sonra jel, DNA elektroforez cihazına yerleştirildi. PZR ürünlerini yükmeden önce elektroforez tankına jel yüzeyini örtecek şekilde 1x TBE ilave edildi. Soldan sağa doğru ilk göze 3 μ l DNA marker konuldu. İkinci gözde negatif kontrol olarak deiyonize su (DEPC-treated Water) kullanıldı. Üç ve altıncı göz arasına pozitif kontrol ve diğer gözlere her biri 2 μ l olan jel yükleme solusyonu ile karıştırılmış 10 μ l PZR ürünü ilave edildi. Elektroforez

cihazı 150 volt/saat sabit akımda çalıştırılarak, PZR ürünleri agaroz jelde yürütüldü. Örneklere ait DNA bantları, DNA marker yardımıyla pozitif ve negatif kontrollere ait diğer bantlarla karşılaştırılarak değerlendirildi.

2.2.4.6. Görüntüleme İşlemi

Elektroforez sonucunda jeldeki örnekler bilgisayarlı UV transillüminatör kutusu içine yerleştirilerek görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

2.2.5. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Sığırlardan izole ve identifiye edilen *P. multocida* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları CLSI'e standartlarına göre Mueller Hinton agarda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirildi (CLSI, 2006).

Kanlı agarda 37 °C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra elde edilen kültürlerden alınan koloniler Mac Farland Tüp No.5 bulanıklığına eşit olacak şekilde steril FTS içerisinde hazırlandı. Daha sonra hazırlanan kültürlerden 0,1 ml Mueller Hinton agara aktararak steril bagetle yayıldı. Standart antibakteriyel diskler steril bir pens yardımı ile eşit aralıklarla petrilere yerleştirilerek 37 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında her diskin çevresinde bulunan inhibisyon zon çapları ölçülerek CLSI standartlarında belirtilen zon çaplarına göre değerlendirildi.

2.2.6. İstatistiksel Analiz

İzole ve identifiye edilen *P. multocida* suşlarının, örneklenen hayvan gruplarında cinsiyete dayalı taşıyıcılık oranları ve örnekler arasındaki taşıyıcılık oranları arasında farklılık bulunup bulunmadığı ki-kare testi kullanılarak değerlendirildi (SPSS 13,0 for Windows/SPSS Inc, USA). İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değeri önemli kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Mikrobiyolojik Muayeneler

Sığırlardan alınan toplam 650 örneğin (akciğer, trakeal yıkantı ve nazal sıvap) 48 (%7,4)'inden *P. multocida* izolasyon ve identifikasyonu yapıldı. Üçyüz akciğer örneğinden 22 (%7,3), 200 nazal sıvap örneğinden 10 (%5,0) ve 150 trakeal yıkantı örneğinden ise 16 (%10,7) *P. multocida* suşu identifiye edildi (Tablo 3.1). Örneklerden izole edilen *P. multocida* oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 3.1. Sığır akciğeri, nazal sıvap ve trakeal yıkantı örneklerinden *P. multocida* identifikasyonu

Örnek	İzole edilen <i>P. multocida</i> suşları *									
	Klinik görünüm		Dişi			Erkek			Genel Toplam	
	Sağlıklı	Hasta	1 yaş altı	1-3 yaş	4-7 yaş ve üzeri	1 yaş altı	1-3 yaş	4-7 yaş ve üzeri	(n)	(%)
Akciğer	22	-	-	7	11	-	4	-	22	7,3
Nazal Sıvap	6	4	-	4	2	-	4	-	10	5,0
Trakeal Yıkantı	10	6	10	-	-	6	-	-	16	10,7
Toplam	38	10	10	11	13	6	8	-	48	7,4

*($p>0,05$).

3.2. *Pasteurella multocida* Suşlarının Biyokimyasal Özellikleri

İzole edilen *P. multocida* suşlarının hiçbiri %5 koyun Kanlı agarda hemoliz özelliği göstermedi. Suşların katalaz, oksidaz, indol, ornitin dekarboksilaz testleri ve nitrat redüksiyonu pozitif, üreaz, sitrat, metil red, voges-proskauer, TSI'da H₂S, ve hareket aktiviteleri negatif bulundu. *P. multocida* suşlarının Mac Conkey agarda üremediği ve Hugh Leifson besiyerinde fermentatif karakterde olduğu gözlemlendi. Karbonhidrat fermentasyon testinde D-sükroz, D-glikoz, D-mannitol pozitif, inositol, amigdalin, L-ramnoz, D-melibioz, L-arabinoz fermentasyonları negatif, D-sorbitol fermentasyonları ise değişken olarak belirlendi. İdentifiye edilen *P. multocida* ve standart suşların biyokimyasal özellikleri Tablo 3.2'de gösterildi (Aydın, 2006; Garrity ve ark., 2004; Quinn ve ark., 2004).

Tablo 3.2. İdentifiye edilen *P. multocida* ve standart suşların biyokimyasal özellikleri

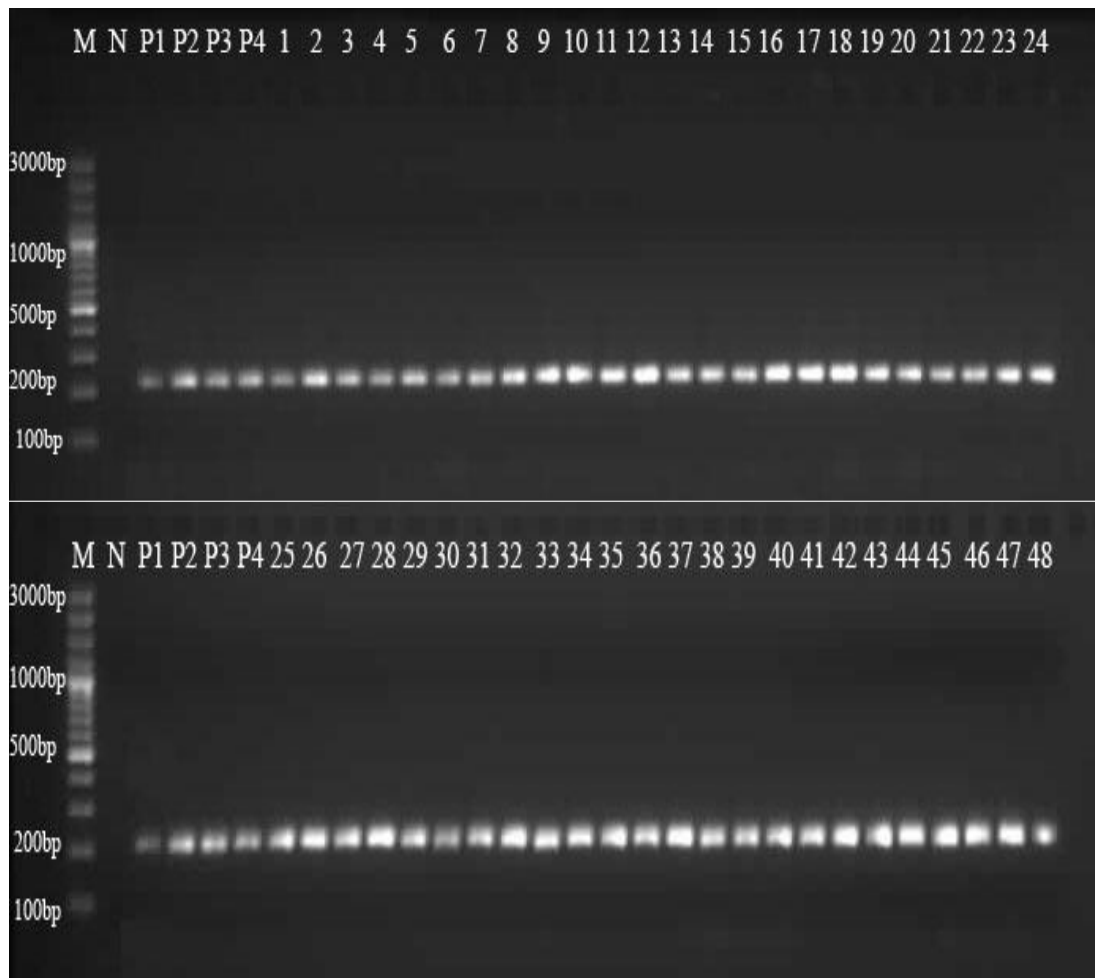
Biyokimyasal Özellikler	<i>P. multocida</i>	ATCC 43137	ATCC 43017	ATCC 43019	ATCC 43020
Gram Boyama	-	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+
Oksidaz	+	+	+	+	+
Hemoliz (Kanlı Agar)	-	-	-	-	-
Hareket (37 °C)	-	-	-	-	-
İndol	+	+	+	+	+
Nitrat	+	+	+	+	+
Üreaz	-	-	-	-	-
Mac Conkey Agar	-	-	-	-	-
H ₂ S/TSI	-	-	-	-	-
Sitrat	-	-	-	-	-
Metil Red	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-
Glukoz (Hugh-Leifson)	Fermentatif	Fermentatif	Fermentatif	Fermentatif	Fermentatif

3.3. *Pasteurella multocida* Suşlarının Serogruplandırılması

P. multocida suşlarının serogruplandırılması amacıyla Lam Aglütinasyon Testi uygulandı. Hiperimmün serumların oluşturulması için dört farklı gruba ait standart suş (ATCC 43137, ATCC 43017, ATCC 43019, ATCC 43020) kullanıldı. Çalışmada izole edilen 48 adet *P. multocida* suşunun 46'sı Lam Aglütinasyon Testi sonucunda serogrup A olarak belirlendi. Suşlardan ikisi tiplendirilememiştir.

3.4. PZR Bulguları

Bu çalışmada identifiye edilen 48 *P. multocida* suşunun tamamı KMT1 (Townsend ve ark., 1998) ve OMP (Neumann ve ark., 1998) genlerine spesifik olan primerler ile *P. multocida* olarak doğrulandı. Yapılan PZR'da pozitif örneklerde OMP geni 221 bp'de ve KMT1 geni 460 bp'de pozitif bantlar verdi (Şekil 3.1, 3.2.).



Şekil 3.1. Agaroz jel elektroforezde *P. multocida* OMP (221 bp) geni pozitif bulunan suşların oluşturduğu bantlar.

M: Marker (100 bp 3kbp)

N: Negatif kontrol (DEPC-treated Water)

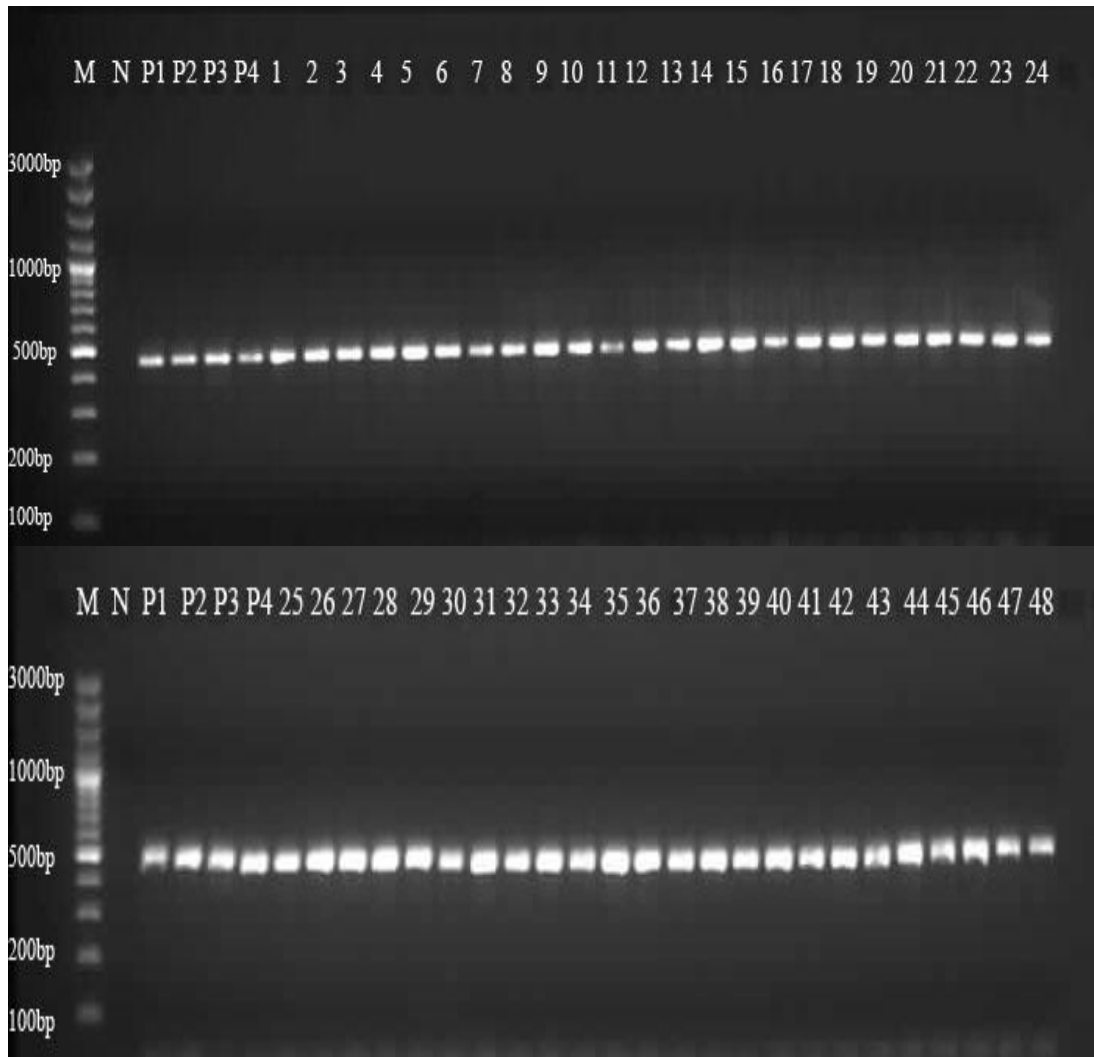
P1: Pozitif kontrol, ATCC 43137 (OMP 221 bp)

P2: Pozitif kontrol, ATCC 43020 (OMP 221 bp)

P3: Pozitif kontrol, ATCC 43019 (OMP 221 bp)

P4: Pozitif kontrol, ATCC 43017 (OMP 221 bp)

1-48: İncelenen örnekler



Şekil 3.2. Agaroz jel elektroforezde *P. multocida* KMT1 (460 bp) geni pozitif bulunan suşların oluşturduğu bantlar.

M: Marker (100 bp 3kbp)

N: Negatif kontrol (DEPC-treated Water)

P1: Pozitif kontrol, ATCC 43137 (KMT1 460 bp)

P2: Pozitif kontrol, ATCC 43017 (KMT1 460 bp)

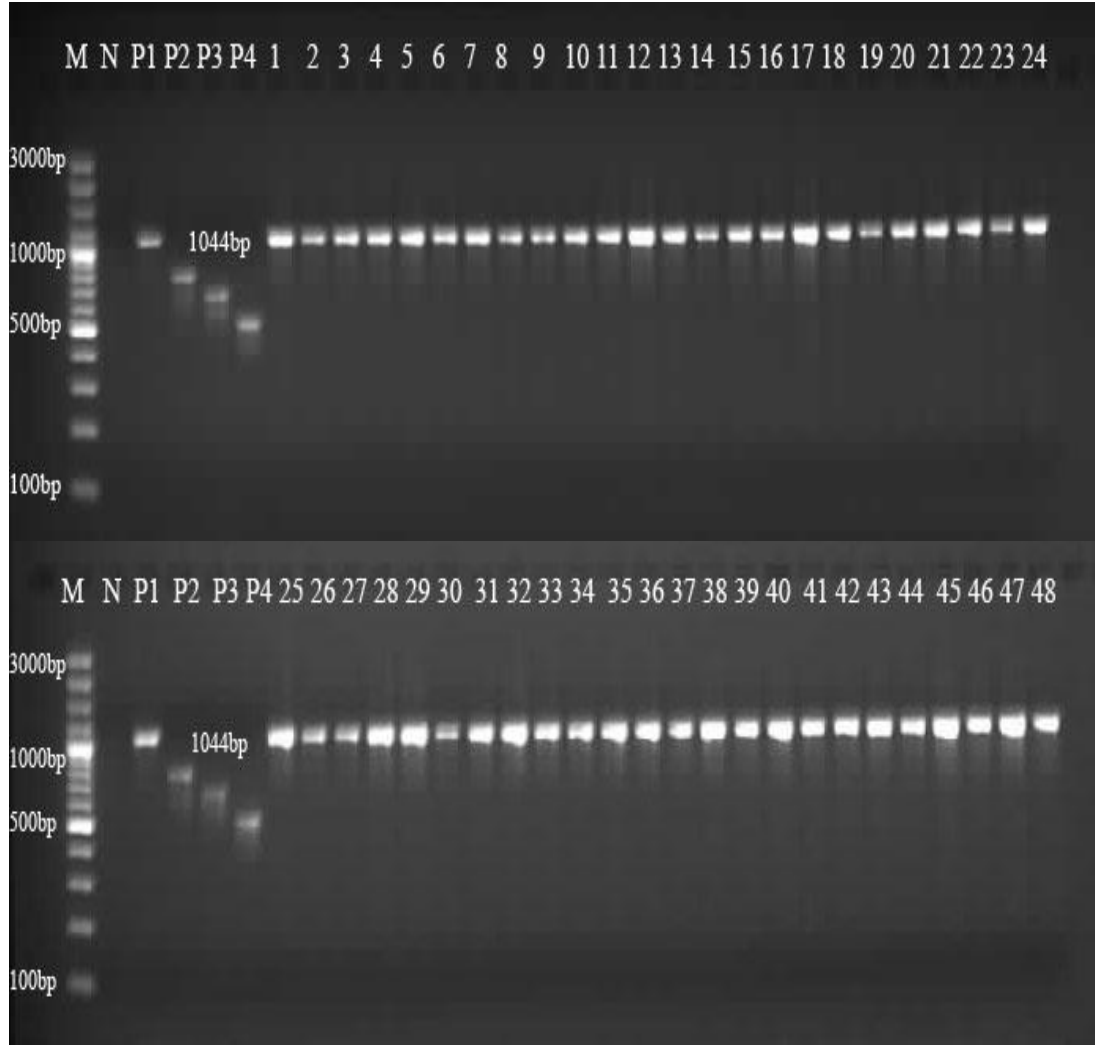
P3: Pozitif kontrol, ATCC 43019 (KMT1 460 bp)

P4: Pozitif kontrol, ATCC 43020 (KMT1 460 bp)

1-48: İncelenen örnekler

PZR ile *P. multocida* olarak tanımlanan suşların kapsül grubunun belirlenmesinde ise Townsend ve ark. (2001)'nin geliştirdiği spesifik genlere (*hyaD-hyaC* geni 1044 bp, *bcbD* geni 760 bp, *dcbF* geni 657 bp, *ecbJ* geni 511 bp) ait

primerler kullanıldı. *P. multocida* suşlarının tamamı 1044 bp'lik pozitif bantlar oluşturdu. Böylece PZR ile Carter kapsüler grup A olarak tespit edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Agaroz jel elektroforezde *P. multocida hyaD-hyaC* (Carter kapsüler grup A, 1044 bp) geni pozitif bulunan suşların oluşturduğu bantlar.

M: Marker (100 bp 3kbp)

N: Negatif kontrol (DEPC-treated Water)

P1: ATCC 43137 Carter grup A (1044 bp)

P2: ATCC 43017 Carter grup B (760 bp)

P3: ATCC 43019 Carter grup D (657 bp)

P4: ATCC 43020 Carter grup E (511 bp)

1-48:İncelenen örnekler

3.5. *Pasteurella multocida* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları

Yapılan çalışmada izole edilen 48 *P. multocida* suşunun antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. *P. multocida* suşlarının %95,8 florfenikole, %93,8 seftiofura ve %91,7 oranında amoksisilin-klavulanik aside duyarlı olduğu tespit edildi.

P. multocida suşlarının oksitetrasikline %22,9, penisilin G ve eritromisine %20,8 oranında dirençli oldukları gözlemlendi. İzole edilen *P. multocida* suşlarının antibiyotik duyarlılık profilleri Tablo 3.3’de verildi.

Tablo 3.3. İzole edilen *P. multocida* suşlarının antibiyotik duyarlılık profilleri

Antibiyotikler	Antibakteriyel Duyarlılık Dereceleri					
	R		I		S	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Amoksisilin (25 µl)	5	10,4	1	2,1	42	87,5
Amoksisilin-Klavulanik Asit (30µl)	2	4,2	2	4,2	44	91,7
Enrofloksasin (5 µl)	2	4,2	4	8,3	42	87,5
Eritromisin (15 µl)	10	20,8	14	29,1	24	50,0
Florfenikol (30 µl)	2	4,2	-	-	46	95,8
Gentamisin (10 µl)	2	4,2	3	6,3	43	89,6
Linkomisin-Spektinomisin (109 µl)	7	14,6	7	14,6	34	70,8
Oksitetrasiklin (30 µl)	11	22,9	8	16,7	29	60,4
Penisilin G (10 Units)	10	20,8	-	-	38	79,2
Seftiofur (30 µl)	-	-	3	6,3	45	93,8
Sulfametaksazol-Trimetoprim (25 µl)	5	10,4	6	12,5	37	77,1
Tilmikosin (15 µl)	3	6,3	3	6,3	42	87,5
Tulatromisin (30 µl)	2	4,2	3	6,3	43	89,6

R: Dirençli

I: Orta Derecede Duyarlı

S: Duyarlı

4. TARTIŞMA

Pasteurella enfeksiyonları hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde ekonomik bir öneme sahiptir. İşletme ve üretici açısından iş gücü ve verim kaybının yanında, ölümler ve sağaltım masrafları nedeniyle büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (De Alvis, 1999). Amerika Birleşik Devletleri'nde sığırların solunum sistemi hastalıklarından dolayı hayvan başına sağaltım masraflarının yaklaşık 15,57 dolar (Snowder ve ark., 2006) ve yıllık ekonomik kaybın 640 milyon doların üzerinde olduğu bildirilmektedir (Bowland ve Shewen, 2000).

Pnömonilerin oluşumu etiyolojik olarak çevresel faktörler, viral, bakteriyel, mikotik ve paraziter etkenler nedeniyle kompleks bir yapı gösterir. Pnömonik pastörelloz, dünyanın birçok ülkesinde görülmekle birlikte çok geniş bir konak çeşitliliğine sahiptir. Sığırların solunum yolu enfeksiyonlarından *P. multocida* ve *M. haemolytica* suşlarının yaygın olarak izole edildiği birçok araştırmacı (Yates, 1982; Davies, ve ark., 2004; Boyce ve ark., 2010) tarafından rapor edilmiştir.

Madsen ve ark. (1985), 61 pnömonili buzağı akciğerinin 18 (%29,5)'inde *P. multocida* izole edildiğini bildirmiştir. Houghton ve Gourlay (1984) ise pnömonili sığır akciğerlerinden *P. multocida* izolasyon oranını %6 olarak rapor etmişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada pnömoni nedeniyle ölen veya kesilen buzağı akciğerlerinden %15,8 oranında *P. multocida* izole edildiği bildirilmiştir (Allan ve ark.,1985). Danimarka'da yapılan bir çalışmada bronkopnömoni ve pnömoni tablosu gösteren hastalıklı buzağıda 72 örneğin 10 (%13,8)'unda *P. multocida* izole edildiği bildirilmiştir (Tegtmeier ve ark., 1999). 1994-2002 yılları arasında yapılan bir çalışmada 6-18 aylık pnömonili buzağı akciğerlerinde toplam *P. multocida* izolasyon oranı %34,7 (292) olduğunu ve bu oranın yıllar arasında ise %20-%47,4 arasında değişiklik gösterdiğini saptamışlardır (Welsh ve ark., 2004). Yapılan bir diğer çalışmada 1-4 aylık sağlıklı buzağılara ait 61 nazal sıvı örneğinin 35 (%57,4)'inde *P. multocida* suşu identifiye edilmiştir (Catry ve ark., 2006). Diğer bir çalışmada 84

buzağıdan toplanan trakeal lavaj örneğinin 17 (%14.3)'sinden *P. multocida* suşu izole edildiği bildirilmiştir (Nikunen ve ark., 2007). Solunum sistemine ait hastalık belirtisi gösteren 99 buzağıda yapılan bir diğer çalışmada *P. multocida* izolasyon oranını %19,1 olarak rapor edilmiştir (Gagea ve ark., 2006). Yapılan bir diğer çalışmada 396 buzağıya ait trakeal lavaj örneklerinde izole edilen *P. multocida* oranının %34 olduğu bildirilmiştir. Hayvanların klinik durumu dikkate alındığında bu oran 144 sağlıklı hayvanda %26,4 olarak bildirilirken, şüpheli 89 vakada %32,6 ve 163 hasta hayvanda ise %42,3 olarak tespit edilmiştir (Autio ve ark., 2007). Bir diğer çalışmada 166 sığira ait; nazal sıvap, akciğer ve süt örneklerinin 10(%6,02)'unda *P. multocida* izole edildiği bildirilmiştir (Shayegh ve ark., 2010).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda sığırlarda *P. multocida* izolasyon oranları birbirinden farklı bulunmuştur. Girgin ve ark. (1989), pnömonili buzağı akciğerlerinden *Pasteurella* türlerini %18 oranında izole etmişlerdir. Hazıroğlu ve ark. (1997), pnömoni lezyonu görülen 100 buzağı akciğeri örneğinin %8'inde *P. multocida* izolasyonunun yapıldığını bildirmişlerdir. Erzurum'da yapılan bir çalışmada pnömonili sığır akciğerlerinden %4,5 oranında *P. multocida* izole edildiği rapor edilmiştir (Dinler, 1998). Konya'da yapılan bir araştırmada *P. multocida* izolasyon oranının %15,9 olduğu bildirilmiştir (Gündüz ve Erganiş, 1998). Kılıç (2003), Elazığ'da yaptığı bir çalışmada mezbahada kesilen 500 pnömonili sığır akciğerlerine ait örneklerin %6'sından *P. multocida* izole edildiğini rapor etmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada Aydın ve İzmir'de bulunan mezbahalardan alınan 570 sığır intratrakeal svabın 28 (%4,9)'inden *P. multocida* izole ve tanımlanmış olduğu bildirilmiştir (Erbaş, 2007).

Bu çalışmada sığırlardan alınan 650 örnekte 48 (%7,4) *P. multocida* suşu tanımlanmış ve izolasyon oranı araştırmacıların (Houghton ve Gourlay, 1984; Hazıroğlu ve ark., 1997; Kılıç, 2003; Shayegh ve ark., 2010) bulguları ile uyumlu bulunmuştur. Ancak yapılan bazı çalışmalara (Allan ve ark., 1985; Gündüz ve Erganiş, 1998; Tegtmeier ve ark., 1999; Welsh ve ark., 2004; Catry ve ark., 2006; Gagea ve ark., 2006; Autio ve ark., 2007; Nikunen ve ark., 2007) göre *P. multocida* izolasyon oranı düşük, bazı çalışmalardan ise yüksek (Dinler, 1998; Erbaş, 2007)

oranlarda bulunmuştur. Bununla birlikte pnömonik pastörellozisin yayılışı genel olarak ülkeler ve bölgeler arasında farklılık gösterebilmektedir. Bu farklılıkların iklim değişikliklerine, mevsimsel döneme, hayvan nakillerine, yaş ve ırk farklılıklarına, kemoterapötiklerin kullanımına, stres faktörlerine, hayvanların bireysel dirençlerine, beslenme durumuna ve buldukları yerin hijyenik şartlarına bağlı olabileceği düşünülmektedir. *P. multocida* izolasyon oranının yüksek bulunduğu çalışmalarda (Tegtmeier ve ark.,1999; Welsh ve ark., 2004; Catry ve ark., 2006; Gagea ve ark.,2006; Autio ve ark., 2007; Nikunen ve ark., 2007) materyal sayısı genellikle düşük olup, araştırmalar sadece belirli sayıda hayvan popülasyonu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, bu sınırlı sayıdaki gruplarda, hayvanların genel olarak bulaşıcı bir hastalık etkisi altında bulunduğu dikkati çekmektedir.

P. multocida suşlarının tiplendirilmesi, kapsül antijenine göre A, B, D, E ve F olmak üzere 5 kapsüler grup ve 16 (1-16) somatik serotipe göre yapılmıştır (Carter,1955; Hedleston ve ark., 1972). *P. multocida* suşlarının kapsüler ve somatik tiplendirilmesi için Lam Aglütinasyon, IHA ve AGID testlerinden yararlanılmaktadır (Carter, 1955; Namioka ve Murata, 1961a; Heddleston ve ark., 1972; Rimler ve Rhoades, 1989).

Blanco Viera ve ark. (1995), Meksika’da 224 pnömonili akciğer örneğinin mikrobiyolojik muayenesi sonunda izole edilen bakterilerin 72 (%32,1)’sinin *P. multocida* olarak identifikasyonunun yapıldığını bildirmişlerdir. *P. multocida* izolatları akriflavin ve hyaluronidaz tekniği ile %61’i serogrup A, %25’i serogrup D olarak belirlenirken %14’ü ise tiplendirilememiştir. *P. multocida* serogrup A içinde AGID testi ile en yaygın olan serotip 3 olarak saptandığı belirtilmiştir.

Purdy ve ark. (1997), ABD’de yapılan bir araştırmada izole ettikleri 50 *P. multocida* suşunun 42’sinin serogrup A olarak tiplendirildiğini, 8’inin ise tiplendirilemediğini rapor etmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada 10 pnömonili sığırdan izole edilen *P. multocida* suşu AGID testi ile 7'sini A:3, 2'sini A:4 ve 1'ini ise A:3,4 olarak tiplendirmişlerdir (Dabo ve ark., 1997). Yapılan bir diğer çalışmada ise 40 buzağıya ait nazal ve trakeal sıvap örneklerinden izole edilen 4 (%10) *P. multocida* suşunun 3'ünün serogrup A olduğunu, 1'inin ise tiplendirilemediğini rapor etmişlerdir (De Rosa ve ark., 2000).

Suudi Arabistan'da yapılan bir çalışmada 400 sığır akciğer sıvap örneğinden izole edilen 10 (%2,5) *P. multocida* suşunun 4'ünü serogrup A, 2'sini serogrup D, 2'sini serogrup E olarak tiplendirmişler, diğer 2 suşun ise tiplendirilemediğini bildirmişlerdir (Al-Humam ve ark., 2004).

Townsend ve ark. (2001), multipleks PZR (mPZR) ile kapsüler gruplarının belirlenmesinde (*capA,B,D,E,F*) spesifik *P. multocida* primerleri kullanılarak, mPZR geleneksel serotiplendirme metotlarına alternatif bir gruplandırma yöntemi olabileceğini saptamışlardır. Ewers ve ark. (2006), sığırlardaki çeşitli klinik vakalardan izole ettikleri 91 *P. multocida* suşunu kullanarak yaptıkları PZR'da kapsül genlerini (*capA,B,D,E,F*) incelemişlerdir. İzole edilen 91 adet *P. multocida* suşundan 84 (%92,3)'ünü grup A, 3 (%3,2)'ünü grup D, 2 (%2,19)'sini grup F olarak gruplandırmışlar, 2 (%2,19) suşun ise tiplendirilemediğini rapor etmişlerdir.

Batu ve Elverdi (1970), Sakarya, Samsun, Çarşamba, Bafra ve Terme mezbahalarında kesilen sığır ve mandaların nazofarengial boşluklarından aldıkları 1106 sıvap örneğinden izole ettikleri *P. multocida* suşundan kapsüler serogruplarının belirlenmesi amacıyla 28 (%2,53) *P. multocida* suşundan 24'ünü AGID testi ile serotip B olarak tiplendirildiğini, suşlardan dördünün ise tiplendirilemediğini bildirmişlerdir.

Erbaş (2007), Aydın ve İzmir'de 570 adet sığır intratrakeal sıvap örneğinden 28 (%4,9) *P. multocida* suşu izole edildiğini ve bu suşları Lam Aglütinasyon ve AGID testi ile 15 (%53,6)'i serogrup B, 10 (%35,7)'u serogrup A ve 1 (%3,5)'i de serogrup

D olarak tiplendirmiştir. Suşlardan 2 (%7,2)'sinin ise tiplendirilemediği belirtilmektedir.

Bu çalışmada sığırlardan izole edilen 48 *P. multocida* suşunun Lam Aglütinasyon Testi sonucunda 46 (%95,8)'sı Carter kapsüler serogrup A olarak tespit edilmiş ve ikisi ise tiplendirilememiştir. Spesifik primerler kullanılarak yapılan PZR testi sonucuna göre de suşların tümü Carter kapsüler grup A olarak tiplendirilmiştir. Sığır suşlarının *P. multocida* serogrup A olarak biyotiplendirilmesi yapılan bazı çalışmalarla (Blanco Viera ve ark. 1995; Dabo ve ark., 1997; Purdy ve ark. 1997; De Rosa ve ark., 2000; Kumar ve ark., 2004; Ewers ve ark., 2006) paralellik gösterirken, bazı çalışmalardan (Batu ve Elverdi, 1970; Erbaş, 2007) farklı bulunmuştur. Bu durum serogrupların ülkeler ve bölgeler arasında farklılıklarına işaret etmektedir. Ülkemizdeki duruma bakıldığında; *P. multocida* serogruplarının bölgesel dağılımlarının tam olarak bilinmediği ve kapsüler gruplandırma çalışmalarının sayısının çok az olduğu görülmektedir. Çalışmada serolojik olarak gruplandırılan *P. multocida* suşları aynı zamanda PZR yöntemi ile de gruplandırılmıştır. *P. multocida*'nın serolojik yöntemler yanısıra PZR ile de gruplandırılabilceği ortaya konmuş ve serolojik yöntemlere alternatif olarak kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

Geliştirilen PZR teknikleri, tür spesifik olarak *P. multocida*'ya ait kromozomal gen bölgesindeki özel primerleri hedeflemektedir. Bu teknikle mikroorganizmalar kısa sürede doğru şekilde teşhis edildiğinden geleneksel metotlara göre daha avantajlıdır (Townsend ve ark., 1998). Townsend ve ark. (1998), tarafından geliştirilen KMT1 genine özel 460 bp primer ve Neumann ve ark. (1998),'nın geliştirmiş oldukları OMP genine özel 221 bp primer ile *P. multocida* izolatları spesifik olarak eşleştiğini tespit etmişlerdir.

Kumar ve ark. (2004), hastalık belirtisi gösteren farklı hayvan türlerine ait örneklerin 206'sında klasik yöntemler ve PZR ile *P. multocida*'yı tanımlamışlar ve bu örneklerin 20'sinin sığır orjinli olduğunu rapor etmişlerdir. PZR'da spesifik KMT1 klonu ile *P. multocida* olarak tanımlanması yapılan 20 adet suşun IHA ve

AGID testi ile 9'u A:1, 1'i A:3, 1'i A:4, 3'ü A:1-A:3 ve 2'si B:2 olarak tiplendirilmiş, 4'ünün ise tiplendirilemediği bildirilmiştir.

Bu çalışmada, sığır akciğerlerinden *P. multocida*'nın PZR ile identifikasyonuna yönelik OMP ve KMT1 genlerinden hazırlanan spesifik primer çiftlerinin kullanılması ile farklı bakterilerin yanlış pozitif vermesi önlenmiştir. Çalışmada, kültür ile pozitif bulunan 48 *P. multocida* suşu PZR ile de pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada, *P. multocida* identifikasyonunda kullanılan spesifik primerler ile yapılan diğer çalışmalarla (Townsend ve ark., 1998; Townsend ve ark., 2001; Kumar ve ark., 2004; Ewers ve ark., 2006) uyumlu bulunmuştur. *P. multocida* identifikasyonunda konvansiyonel yöntemler yanısıra moleküler metotlardan olan PZR ile identifiye edilebileceği ortaya konmuş ve *P. multocida*'nın identifikasyonunda ve tiplendirilmesinde kültüre alternatif olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Yoshimura ve ark. (2001), 72 sığır ve 68 domuz kaynaklı *P. multocida* izolatları için 10 farklı antibiyotik (aspoksilin, benzilpenisilin, dihidrostreptomisin, doksisisiklin, enrofloksasin, kanamisin, oksitetrasiklin, seftiofur, tiamfenikol, tilmikosin) kullanarak agar dilüsyon metodu ile Minimal İnhibitör Konsatrasyon (MİK) değerlerini tespit etmişlerdir. Sığır ve domuz izolatlarında en etkili olan antibiyotikler MİK 90 değeri ile enrofloksasin ve seftiofur olarak belirtilmiştir. Sığır izolatlarında en fazla direnç gösteren antimikrobiyel ajanların dihidrostreptomisin ve benzilpenisilin, domuz izolatlarında ise oksitetrasiklin ve tiamfenikol olduğu bildirilmiştir.

Yapılan bir diğer araştırmada 6-18 aylık hastalıklı buzağı akciğerlerinden izole edilen 160 adet *P. multocida* suşunun antibakteriyel duyarlılıklarını ve yıllara göre identifikasyon oranlarını kontrol etmişlerdir. İzolasyon oranları 1994-2002 yılları arasında %20-47,4 arasında değişkenlik gösterdiğini saptamışlardır. İzole edilen *P. multocida* suşlarının 1994-2002 yılları arasındaki duyarlılıkları ise ampisilin için %76-100, seftiofur, sefalotin ve enrofloksasin için %96-100, sülfametoksazol-trimetoprim için %76-100, eritromisin %34-93, florfenikol %86-100, tilmikosin

%58-92, tetrasiklin için %40-71 arası değişen yüzdelerde tespit edilmiştir (Welsh ve ark., 2004).

Erbaş (2007), Aydın ve İzmir’de yaptığı araştırmada 570 sığır akciğerlerinden izole edilen 28 (%4,9) *P. multocida* suşlarının florfenikole %93, enrofloksasine %61, oksitetrasikline %54 oranında duyarlı olduğunu, ayrıca eritromisin ile sülfametoksazol-trimetoprim %82, gentamisine %64 ve amoksisilin-klavulanik aside ise %61 oranında dirençli olduğunu saptamıştır. Önat ve ark. (2010) tarafından, klinik olarak sağlıklı ve örneklemeden önce antibiyotik kullanılmamış 47 Holstein ırkı sığırdan aldıkları burun sıvı örneklerinin 27 (%57,4)’si *P. multocida* olarak bildirilmiştir. *P. multocida* izolatlarının tümünün florfenikole ve ampisiline karşı duyarlı bulunduğu, enrofloksasine karşı % 85,1, sülfametoksazol-trimetoprim karşı % 92,6 ve eritromisine karşı % 44,5 oranlarında duyarlılık belirlendiği bildirilmiştir.

Bir diğer çalışmada sığır ve domuzlarda *P. multocida* izolatlarının antibiyotik duyarlılık düzeyleri belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre sığır ve domuzlardan elde edilen *P. multocida* izolatları sırasıyla nalidik aside %3,7-10,6, enrofloksasine %0,2-1,5, sefoperazona %2,9-3, sefotaksime %-1,1-6,8 ve seftiofura %0,7-1,5 oranında dirençli olduğu bildirilmiştir (Wallmann, 2006).

Bu çalışmada izole edilen 48 *P. multocida* suşlarının antibiyotik duyarlılık test bulguları sonucunda *P. multocida* suşlarının %95,8 florfenikole, %93,8 seftiofura, %91,7 amoksisilin-klavulanik aside, %89,6 gentamisin ve tulatromisine, %87,5 amoksisilin ve enrofloksasine, %79,2 penisilin G’ye, %77,1 sulfometaksazol-trimetoprim, %70,8 linkomisin-spektinomisine ve %50 oranında eritromisine duyarlı olduğu bulunmuştur. *P. multocida* suşlarının oksitetrasikline %22,9, penisilin G ve eritromisine %20,8 oranında dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen antibiyotik dirençlilik oranları hayvanlarda bilinçsiz ve yaygın bir şekilde antibiyotik kullanımını göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması, sığırlardan *P. multocida* izolasyonu, identifikasyonu (fenotipik ve genotipik), suşların tiplendirilmesi (serolojik ve moleküler) ve antibiyotik duyarlılıklarını saptamak amacıyla yapılmıştır.

1. Sığırlardan alınan 650 örnekten *P. multocida* izolasyonu, identifikasyonu ve tiplendirilmesi amacıyla kültür, seroloji ve PZR yöntemleri kullanılmıştır. Örneklerin 48 (%7,4)'inden *P. multocida* izole edilmiştir.

2. İzolatların identifikasyonunda konvansiyonel yöntemlerin yanısıra moleküler metodlardan olan PZR ile de identifiye edilmiş ve *P. multocida*'nın teşhisinde hızlı, pratik, güvenilir ve kültüre alternatif bir yöntem olarak kullanılabilceği kanaatine varılmıştır.

3. Çalışmada identifiye edilen 48 (%7,4) adet *P. multocida* suşunun 46 (%95,8)'sı Lam Aglütinasyon Testi ile kapsüller serogrup A olarak sınıflandırılırken ikisi (%4,2) ise tiplendirilememiştir.

4. Serolojik olarak gruplandırılan *P. multocida* suşları Türkiye'de ilk kez PZR yöntemi ile gruplandırılmıştır. *P. multocida*'nın serolojik yöntemlerin yanısıra PZR ile de gruplandırılabilceği ortaya konmuş ve serolojik yöntemlere alternatif olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

5. Sağlıklı ve pnömoni belirtisi gösteren sığırlardan alınan örneklerden izole edilen suşlarının tamamının Carter kapsüller grup A olarak belirlenmesi, yörede pnömonik pastörellozis enfeksiyonuna neden olan suşlar içerisinde kapsüller grup A'nın baskın olduğunu göstermektedir.

6. İzole edilen 48 *P. multocida* suşunun antibiyotik duyarlılık testi sonucunda % 95,8 florfenikole, % 93,8 seftiofura ve % 91,7 oranında amoksisilin-klavulanik aside duyarlı olduğu gözlenirken oksitetrasikline % 22,9, penisilin G ve eritromisine % 20,8 oranında dirençli olduğu tespit edilmiştir.

7. Bu çalışmada elde edilen bulguların ülkemizde *P. multocida*'ya yönelik yapılacak diğer araştırmalara katkı sağlayabileceği kanaatine varılmıştır.

6. ÖZET

Afyonkarahisar İlinde Sığırlardan *Pasteurella multocida* İzolasyonu, Tiplendirilmesi, Antibiyotik Duyarlılığı ve Bazı Virülens Genlerinin PZR ile Belirlenmesi

Yapılan bu tez çalışmasında Afyonkarahisar ilinde sığırlardan *P. multocida* izolasyonu ve tiplendirilmesi amacıyla 650 örnek toplandı. Mezbahalardan 300 akciğer örneği, çiftliklerden 200 nazal sıvı (sağlıklı 170, hasta 30) ve 150 trakeal yıkantı (sağlıklı 130, hasta 20) örneği alındı.

Sığırlardan alınan 650 örnekten izole edilen 48 (%7,4) *P. multocida* suşu fenotipik, serolojik ve PZR yöntemleri ile tanımlanmıştır. Kapsül grupları serolojik ve genotipik olarak belirlendi. Serolojik yöntemde, standart *P. multocida* suşu kullanılarak Yeni Zelanda ırkı tavşanlardan hiperimmün serumlar hazırlandı. Sığırlardan izole edilen 48 *P. multocida* suşu, hiperimmün serumlar kullanılarak Lam Aglutinasyon Testi ile 46 (%95,8)'sı Carter kapsül serogrup A olarak tiplendirildi, 2 suş gruplandırılmadı. Genotipik yöntemde, izolatların tamamı KMT1 ve OMP genlerine spesifik olan primerler kullanılarak PZR ile *P. multocida* olarak doğrulandı. Kapsül grubunun belirlenmesinde spesifik primerler kullanılarak yapılan PZR ile 48 suşun tamamı Carter kapsül grup A (%100) olarak tiplendirildi.

Yapılan çalışmada izole edilen 48 (%7,4) *P. multocida* suşunun antibiyotik duyarlılıkları belirlendi ve *P. multocida* suşlarının % 95,8 florfenikole , % 93,8 seftiofura, % 91,7 amoksisilin-klavulanik aside duyarlı olduğu gözlenirken, oksitetrasikline % 22,9 oranında, penisilin G ve eritromisine % 20,8 oranında dirençli olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler : Sığır, *P. multocida*, Tiplendirme, PZR, Antibiyotik Duyarlılık

6. SUMMARY

The Isolation, Typing, Antimicrobial Susceptibility and Detecting of Some Virulence Genes by PCR of *Pasteurella multocida* Strains in Cattle in Region of Afyonkarahisar

In this study, 650 samples have been collected for the isolation and typing of *P. multocida* from slaughterhouse and cattle farms in the province of Afyonkarahisar. 300 lung samples from slaughterhouses, 200 swap (healthy 170, unhealthy 30), and 150 tracheal lavage (healthy 130, unhealthy 20) from farms were obtained.

In the study, 48 (7.4%) *P. multocida* strain were identified in all of 650 samples of cattles by phenotypic, serological and PCR method. Genotypic and serological methods were used in the determination of the capsular groups. Hyperimmune sera from New Zealand rabbits immunized with standard *P. multocida* strain were prepared. In the study isolated 48 *P. multocida* strains with Slayt Agglutination test 46 (95.8%) were found as serogroup capsular A and 2 strains were untyped. Also these strain were confirmed using by primers specific to KMT1 and OMP genes by PCR. Using specific primers of the capsular group (Townsend et al., 2001) 48 strain were confirmed as in Carter A (100%) capsular group by PCR .

In this study, isolates of 48 (7.4%) *P. multocida* strains were determined by antibiotic susceptibility test. Of the strains 95.8% florfenicol, 93.8% ceftiofur, 91.7% amoxicillin-clavulanic acid were observed to be sensitive. Resistance rates were 22.9% oksitetrasikline, 20.8% peniciline G and erythtomisine.

Keywords: Cattle, *P. multocida*, Typing, PCR, Antibiotic Susceptibility

KAYNAKLAR

- ADLER, A.C., CESTERO, C., BROWN, R.B. (2011). Septic shock from *Pasteurella multocida* following a cat bite: case report and review of literature *Conn. Med.*, **75**: 603-605.
- ALI, H.A., SAWADA, T., NODA, K. (2004). Protectivity of an immunoaffinity-purified 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* in mice. *J. Vet. Med. Sci.*, **66**: 1603-1604.
- AL HUMAM, N.A., AL DUGHAYM, A.M., MOHAMMED, G.E., HOUSAWI, F.M., GAMEEL, A.A. (2004). Study on the isolation and pathogenicity of *Pasteurella multocida* Type A in calves in Suudi Arabia. *Pak. J. Biol. Sci.*, **7**: 460-463.
- ALLAN, E.M., WISEMAN, A., GIBBS, H.A., SELMAN, I.E. (1985). *Pasteurella* species isolated from the bovine respiratory tract and their antimicrobial sensitivity patterns. *Vet. Rec.*, **117**: 629-631.
- ANONİM (1981). Simple serological technique recommended for HS diagnosis. *Asian Livestock*, **6**: 41-42.
- ANONİM (2012a). Erişim tarihi: 15.06.12. Erişim: LIST OF BACTERIAL NAMES with STANDING in NOMENCLATURE [<http://www.bacterio.cict.fr/p/pasteurella.html>]
- ANONİM (2012b). Erişim tarihi: 15.06.12. Erişim: INTERNATIONAL COMMITTEE on SYSTEMATICS of PROKARYOTES [<http://www.the-icsp.org/taxa/Pasteurellaceaealist.htm>]
- ARDA, M. (2006). *TEMEL MİKROBİYOLOJİ*. Medisan Yayınları, Ankara.
- ARUMUGAM, N.D., AJAM, N., BLACKALL, P.J., ASIAH, N.M., RAMLAN, M., MARIA, J., YUSLAN, S., THONG, K.L. (2011). Capsular serotyping of *Pasteurella multocida* from various animal hosts - a comparison of phenotypic and genotypic methods. *Trop. Biomed.*, **28**:55-63.
- AUTIO, T., POHJANVIRTA, T., HOLOPAINEN, R., RIKULA, U., PENTIKAINEN, J., HUOVILAINEN, A., RUSANEN, H., SOVERI, T., SIHVONEN, L., PELKONEN, S. (2007). Etiology of respiratory disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds. *Vet. Microbiol.*, **119**: 256-265.
- AVRIL, J.L., DONNIO, P.Y., POUEDRAS, P. (1990). Selective medium for *Pasteurella multocida* and its use to detect oropharyngeal carriage in pig breeders. *J. Clin. Microbiol.*, **28**: 1438-1440.
- AYDIN, N. (2002). Tavuk Kolerası. *KANATLI HAYVAN HASTALIKLARI*. ARDA, M., MİNBAŞ, A., AYDIN, N., AKAY, Ö., İZGÜR, M., YARDIMCI, H., ESENDAL, Ö.M., ERDEĞER, J., AKAN, M. Medisan Yayınları, Ankara.
- AYDIN, N. (2006). *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Haemophilus* ve *Actinobacillus* İnfeksiyonları. *VETERİNER MİKROBİYOLOJİ*. AYDIN, N., PARACIKOĞLU, J. İlke Emek Yayınları, Ankara.173-193.

- BATU, A., ELVERDİ, R. (1970). Türkiye’de sığır ve mandalardan izole edilen *Pasteurella* serotiplerinin tayini. *Pendik. Vet. Kont. ve Arast. Enst. Derg.*, **1**: 50-60.
- BISPING, W., AMTSBERG, G. (1995). Gram-negative, aerobic or microaerophilic or facultatively anaerobic rods, with simple culture requirements. COLOUR ATLAS for the DIAGNOSIS of BACTERIAL PATHOGENS in ANIMALS. Paul Parey Scientific Publishers, Hamburg, 108-120.
- BLANCO VIERA, F.J., TRIGO, F.J., JARAMILLO-MEZA, L., AGUILAR-ROMERO, F. (1995). Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from Mexico. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, **37**:121-126.
- BOOT, R., VAN DEN BRINK, M., HANDGRAAF, P., TIMMERMANS, R. (2004). The use of the API 20 NE bacteria classification procedure to identify *Pasteurellaceae* strains in rodents and rabbits. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.*, **31**: 177-183.
- BORRATHYBAY, E., SAWADA, T., KATAOKA, Y., OHTSU, N., TAKAGI, M., NAKAMURA, S., KAWAMOTO, E. (2003a). A 39 kDa protein mediates adhesion of avian *Pasteurella multocida* to chicken embryo fibroblast cells. *Vet. Microbiol.*, **97**: 229-243.
- BORRATHYBAY, E., SAWADA, T., KATAOKA, Y., OKIYAMA, E., KAWAMOTO, E., AMAO, H. (2003b). Capsule thickness and amounts of a 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* type A strains correlate with their pathogenicity for chickens. *Vet. Microbiol.*, **97**: 215-227.
- BOSCH, M., GARRIDO, M.E., LLAGOSTERA, M., PEREZ DE ROZAS, A.M., BADIOLA, I., BARBE, J., (2002a). Characterization of the *Pasteurella multocida* hgbA gene encoding a hemoglobin-binding protein. *Infect. Immun.*, **70**: 5955-5964.
- BOSCH, M., GARRIDO, E., LLAGOSTERA, M., DE ROZAS, AMP., BADIOLA, I., BARBE, J. (2002b). *Pasteurella multocida* exbB, exbD and tonB genes are physically linked but independently transcribed. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **210**: 201-208.
- BROGDEN, K.A., PACKER, R.A. (1979). Comparison of *Pasteurella multocida* serotyping systems. *Am. J. Vet. Res.*, **40**: 1332-1335.
- BOYCE, J.D., CHUNG, Y.J., ADLER, B. (2000). *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. *J. Biotechnol.*, **83**: 153-160.
- BOYCE, J.D., HAERPER, M., WILKIE, I.W., ADLER, B. (2010). *Pasteurella*. *PATHOGENESIS OF BACTERIAL INFECTIONS in ANIMALS*. GYLES, C.L., PRESCOTT, J.F., SONGER, G., THOEN, C.O. Blackwell Publishing, USA. 325-337.
- BOWLAND, S.L., SHEWEN, P.E. (2000). Bovine respiratory disease commercial vaccines currently available in Canada. *Can. Vet. J.*, **41**: 33-48.
- BUTTENSCHON, J., ROSENDAL, S. (1990). Phenotypical and genotypic characteristics of paired isolates of *Pasteurella multocida* from the lungs and kidneys of slaughtered pigs. *Vet. Microbiol.*, **25**: 67-75.

- BUYS, W.E., SMITH, H.E., KAMPS, A.M., KAMP, E.M., SMITS, M.A. (1990). Sequence of the dermonecrotic toxin of *Pasteurella multocida ssp. multocida*. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 2815-2816.
- CARTER, G.R. (1952). Type specific capsular antigens of *Pasteurella multocida*. *C. J. Med. Sci.*, **30**: 48-53.
- CARTER, G.R. (1955). A haemagglutination test for identification of serological types. *Am. J. Vet. Res.*, **16**: 481-484.
- CARTER, G.R. (1961). A new serological type of *Pasteurella multocida* from Central Africa. *Vet. Rec.*, **73**: 1052.
- CARTER, G.R. (1962). Further observations on typing *Pasteurella multocida* by the indirect Hemagglutination test. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, **26**: 238-240.
- CARTER, G.R. (1963). Proposed modification to the serological classification of *Pasteurella multocida*. *Vet. Rec.*, **75**: 1264.
- CARTER, G.R., CHENGAPPA, M.M. (1980). Hyaluronidase production by type B *Pasteurella multocida* from cases of hemorrhagic septicemia. *J. Clin. Microbiol.*, **11**: 94-96.
- CATRY, B., DECOSTERE, A., SCHWARZ, S., KEHRENBURG, C., DE KRUIF, A., HAESEBROUCK, F. (2006). Detection of tetracycline-resistant and susceptible *Pasteurellaceae* in the nasopharynx of loose group-housed calves. *Vet. Res. Commun.*, **30**: 707-715.
- CHOI KIM, K., MAHESWARAN, S.K., FELICE, L.J., MOLITOR, T.W. (1991). Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of in vivo grown *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.*, **28**: 75-92.
- CHRISTENSEN, J.P., BISGAARD, M. (1997). Avian pasteurellosis taxonomy of the organisms involved and aspects of pathogenesis. *Avian. Pathol.*, **26**: 461-483.
- CHRISTENSEN, J.P., BISGAARD, M. (2000). Fowl cholera. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **19**: 626-637.
- CHRISTENSEN, H., BISGAARD, M., ANGEN, Q., FREDERIKSEN, W., OLSEN, J.E., (2005). Characterization of sucrose negative variants of *Pasteurella multocida* including isolates from large cat bite wounds. *J. Clin. Microbiol.*, **43**: 259-270.
- CHRISTENSEN, H., BISGAARD M. (2006). The Genus *Pasteurella*. DWORKIN, M., FALKOW, S., SCHLEIFER, K.H., STACKEBRANDT, E. *THE PROKARYOTES*. Springer Science Business Media. New York. 1062-1090.
- CHUNG, J.Y., ZHANG, Y., ADLER, B. (1998). The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A: 1. *FEMS. Microbiology. Letters.*, **166**: 289-296.
- CHUNG, J.Y., WILKIE, I., BOYCE, J.D., TOWNSEND, K.M., FROST, A.J., GHODDUSI, M., ADLER, B. (2001). Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. *Infect. Immun.*, **69**: 2487-2492.

- CHUNG, J.Y., WILKIE, I., BOYCE, J.D., ADLER, B. (2005). Vaccination against fowl cholera with acapsular *Pasteurella multocida* A:1. *Vaccine*, **23**: 2751–2755.
- COLLINS, M.T., WEAVER, N., ELLIS, R.P. (1981). Identification of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* by API 20E, Minitek and Oxi/Ferm systems. *J. Clin. Microbiol.*, **13**: 433-437.
- COLLINS, C., FLANAGAN, B., HENNING, J.S. (2012). An atypical presentation of a *Pasteurella multocida* infection following a cat bite: a case report. *Cutis*, **89**: 269-72.
- CLSI (2006). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 16th Informational Supplement. CLSI Document M100-S16, 26. Wayne, PA.
- COX, A.J., HUNT, M.L., BOYCE, J.D., ADLER, B. (2003). Functional characterization of HgbB, a new hemoglobin binding protein of *Pasteurella multocida*. *Microb. Pathog.*, **34**: 287-296.
- ÇETİNKAYA, B. (1998). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temel prensipleri. *F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi*. **12**: 149-156.
- DABO, S.M., CONFER, A.W., MURPHY, G.L. (1997). Outer membrane proteins of bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates. *Vet. Microbiol.*, **54**:167-183.
- DABO, S.M., CONFER, A.W., QUIJANO BLAS, R.A. (2003). Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. *Microb. Pathog.*, **35**: 147-157.
- DABO, SM., TAYLOR, JD., CONFER, A.W. (2007). *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Anim. Health. Res. Rev.*, **8**: 129-50.
- DAVIES, R.L., MACCORQUODALE, R., BAILLIE, S., CAFFREY, B. (2003). Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. *J. Med. Microbiol.*, **52**: 59-67.
- DAVIES, R.L., MACCORQUODALE, R., REILLY, S. (2004). Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Vet. Microbiol.*, **99**: 145-158.
- DE ALVIS, M.C.L. (1999). *HAEMORRHAGIC SEPTICAEMIA*. Australian Centre for International Agricultural Research. ACIAR Monograph, Australia. 1-141.
- DE ANGELIS, P.L., PADGETT MCCUE, A.J. (2000). Identification and molecular cloning of a chondroitin synthase from *Pasteurella multocida* type F. *J. Biol. Chem.*, **275**: 24124–24129.
- DE ANGELIS, P.L., WHITE, C.L. (2004). Identification of a distinct, cryptic heparosan synthase from *Pasteurella multocida* types A, D, and F. *J. Bacteriol.*, **186**: 8529–8532.
- DE JONG, M.F., BORST, G.H. (1985). Selective medium for the isolation of *P. multocida* and *B. bronchiseptica*. *Vet. Rec.*, 116:167.
- DE JONG, M.F. (1999). Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis. STRAW, B.E., D'ALLAIRE, S., MENGELING, W.L., TAYLOR, D.J. *DISEASES OF SWINE*. Iowa State University Press, Iowa. 355-384.

- DE ROSA, D.C., MECHOR, G.D., STAATS, J.J., CHENGAPPA, M.M., SHRYOCK, T.R. (2000). Comparison of *Pasteurella* spp. Simultaneously isolated from nasal and transtracheal swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. *J Clin. Microbiol.*, **38**: 327-332.
- DİNLER, U. (1998). Pnömonili sığır akciğerlerinden *Pasteurella multocida*'nın izolasyonu ve identifikasyonu (Uzmanlık Tezi). Ankara.
- DOUGHTY, S.W., RUFFOLO, C.G., ADLER, B. (2000). The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.*, **72**: 79-90.
- DZIVA, F., MUHAIRWA, A.P., BISGAARD, M., CHRISTENSEN, H. (2008). Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.*, **128**: 1-22.
- ERBAŞ, G. (2007). Aydın ve İzmir bölgesindeki sığırlardan *Pasteurella multocida*'nın izolasyonu, tiplendirilmesi ve antibiyotiklere duyarlılıkları (Doktora Tezi), Aydın.
- ERIKSEN, L., AALBAEK, B., LEIFSSON, P.S., BASSE, A., CHRISTIANSEN, T. ERIKSEN, E. RIMLER, R.B. (1999). Hemorrhagic septicemia in fallow deer (*Dama dama*) caused by *Pasteurella multocida* subsp. *multocida*. *J. Zoo. Wildl. Med.*, **30**: 285-292.
- ESCANDE, F., LION, C. (1993). Epidemiology of human infections by *Pasteurella* and related groups in France. *Zentrabl. Bakteriolog.*, **279**: 131-139.
- EWERS, C., LUBKE BECKER, A., BETHE, A., KIEBLING, S., FILTER, M., WIELER, L.H. (2006). Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Vet. Microbiol.*, **114**: 304-317.
- FAO. (1991). Proceedings of the Fourth International Workshop on Haemorrhagic Septicaemia. Sri Lanka. FAO-APHC Publication No.13.
- FOGED, N.T., NIELSEN, J.P., PEDERSEN, K.B. (1988). Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by enzyme linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **26**: 1419-1420.
- FREY, J., (2011). The role of RTX toxins in host specificity of animal pathogenic *Pasteurellaceae*. *Vet. Mic.*, **153**: 51-58
- FULLER, TE., KENNEDY, M.J., LOWERY, D.E. (2000). Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic Mouse model using signature-tagged mutagenesis. *Microb. Pathog.*, **29**: 25-38.
- FULTON, R.W., (2009). Bovine respiratory disease research (1983-2009). *Anim. Health. Res. Rev.*, **10**: 13-139
- GAGEA, M.I., BATEMAN, K.G., VAN DREUMEL, T., MCEWEN, B.J., CARMAN, S., ARCHAMBAULT, M., SHANAHAN, R.A., CASWELL, J.L. (2006). Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **18**: 18-28.

- GARRITY, G.M., BRENNER, D. J., KRIEG, N.R., STALEY J.R. (2004). *BERGEY'S MANUAL of SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*, Vol., 2 The Proteobacteria, Part B. The Gammaproteobacteria.
- GİRĞİN, H., NEDRET, A., CANBAZOĞLU, M., AKSOY, E. (1989). İç Anadolu Bölgesinde buzağı pnömonisinde rol oynayan bakteriler ile bunların meydana getirdiği lezyonların patolojik özellikleri. I. Uluslararası Önemli Buzağı Hastalıkları Sempozyumu. Etlik, Ankara.
- GLISSON, J.R., HOFACRE, C.L., CHRISTENSEN, J.P., 2003. Fowl Cholera. SAIF, Y.M., BARNES, H.J., GLISSON, J.R., FADLY, A.M., MC- DOUGALD, L.R., SWAYNE, D.E. *DISEASES OF POULTRY*. Iowa State University Press, Iowa. 658-676.
- GRAY OWEN, S.D., SCHRYVERS, A.B. (1996). Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends. Microbiol.*, **4**: 185-191.
- GÜNDÜZ, K., ERGANİŞ, O. (1998). Pnömonili sığır akciğerlerinden izole edilen *Pasteurella haemolytica* suslarının biyotiplendirilmesi ve serotiplendirilmesi. *Veterinarium*, **9**: 11-19.
- HARPER, M., BOYCE, J.D., WILKIE, I.W., ADLER, B. (2003). Signature tagged mutagenesis of *Pasteurella multocida* identifies mutants displaying differential virulence characteristics in mice and chickens. *Infect. Immun.*, **71**: 5440-5446.
- HARPER, M., BOYCE, J.D., ADLER, B. (2006). *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **265**:1-10.
- HARPER, M., COX, A., ST MICHAEL, F., PARNAS, H., WILKIE, I., BLACKALL, P. J., ADLER, BEN., BOYCE, J.D. (2007). Decoration of *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide with phosphocholine is important for virulence. *J. Bacteriol.*, **189**: 7384-7391.
- HARPER, M., COX, A.D., ADLER, B., BOYCE, J.D. (2011). *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide: the long and the short of it. *Vet Microbiol.*, **153**:109-15.
- HATFALUDI, T., AL-HASANI, K., BOYCE, J.D., ADLER, B. (2010). Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.*, **144**: 1-17.
- HAZIROĞLU, R., ERDEĞER, J., GÜLBAHAR, M.Y., KUL, O. (1997). Association of *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* and *Haemophilus somnus* with pneumonia in calves. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.*, **104**: 125-164.
- HEDDLESTON, K.L., GALLAGHER, J.E., REBERS, P.A. (1972). Fowl cholera gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian. Dis.*, **16**: 925-936.
- HICK, P., READ, A., LUGTON, I., BUSFIELD, F., DAWOOD, K., GABOR, L., HORNITZKY, M., KIRKLAND, P. (2012). Coronavirus infection in intensively managed cattle with respiratory disease. *Aust. Vet. J.*, **90**: 381-86.
- HOLST, E., ROLLOF, J., LARSSON, L., NIELSEN, J.P. (1992). Characterization and distribution of *Pasteurella* species recovered from infected humans. *J. Clin. Microbiol.*, **30**: 2984-2987.

- HORADAGODA, N.U., HODGSON, J.C., MOON, G.M., WIJewardana, T.G., ECKERSALL, P.D. (2002). Development of a clinical syndrome resembling haemorrhagic septicaemia in the buffalo following intravenous inoculation of *Pasteurella multocida* serotype B:2 endotoxin and the role of tumour necrosis factor-alpha. *Res. Vet. Sci.*, **72**: 194-200.
- HOUGHTON, S.B., GOURLAY, R.N. (1984). Bacteria associated with calf pneumonia and their effect on gnotobiotic calves. *Res. Vet. Sci.*, **37**: 194-198.
- HORIGUCHI, Y. (2012). Swine Atrophic Rhinitis Caused by *Pasteurella multocida* Toxin and Bordetella Dermonecrotic Toxin. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **361**:113-29.
- HUBBERT, W.T., ROSEN, M.N. (1970). *Pasteurella multocida* infections. II. *Pasteurella multocida* infection in man unrelated to animal bite. *Am. J. Publ. Health.*, **60**: 1109-1117.
- HUNT, M.L., ADLER, B., TOWNSEND, K.M. (2000). The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.*, **72**: 3-25.
- JACQUES, M., KOBISCH, M., BELANGER, M., DUGAL, F. (1993). Virulence of capsulated and noncapsulated isolates of *Pasteurella multocida* and their adherence to porcine respiratory tract cells and mucus. *Infect. Immun.*, **61**: 4785-4792.
- JÜCH, M., BÖTTCHER-LORENZ, J., GROß, M. (2012). A 76-year-old dog owner with fever and dyspnea. *Internist*, **53**:1114-18.
- KAMP, E.M., BOKKEN, G.C., VERMEULEN, T.M., DE JONG, M.F., BUYS, H.E., REEK, F.H., SMĪTS, M.A.(1996). A specific and sensitive PCR assay suitable for large-scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**:304-9.
- KLAASSEN, J.M., BERNARD, B.L., DIGIACOMO, R.F. (1985). Enzyme linked immunosorbent assay for immunoglobulin G antibody to *Pasteurella multocida* in rabbits. *J. Clin. Microbiol.*, **21**: 617-621.
- KASTEN, R.W., HANSEN, L.M., HINOJOZA, J., BIEBER, D., RUEHL, W.W., HIRSH, D.C. (1995). *Pasteurella multocida* produces a protein with homology to the P6 outer membrane protein of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.*, **63**: 989-993.
- KAWAMOTO, E., SAWADA, T., MARUYAMA, T. (1997). Evaluation of transport media for *Pasteurella multocida* isolates from rabbit nasal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **35**: 1948-1951.
- KHAN, M.F., MOVAHED, M.R., JUNG, J. (2012). *Pasteurella multocida* endocarditis. *J. Heart. Valve., Dis.*, **21**:260-2.
- KILIÇ, A. (2003). Sığır akciğerlerinden bakteri izolasyonları ve izole *Pasteurella*'ların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Saptanması (Doktora Tezi). Elazığ.
- KNIGHT, D.P., PAINE, J.E., SPELLER, D.C.E. (1983). A selective medium for *Pasteurella multocida* and its use with animal and human specimens. *J. Clin. Pathol.*, **36**: 591-594.
- KREWULAK, K.D., VOGEL, H.J. (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1778**: 1781-1804.

- KUBATZKY, K.F. (2012). *Pasteurella multocida* and Immune Cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **361**:53-72.
- KUHNERT, P., CHRISTENSEN, H. (2008). *PASTEURELLACEAE: BIOLOGY, GENOMICS AND MOLECULAR ASPECTS*. Caister Academic Press., UK.
- KUMAR, A.A., SHIVACHANDRA, S.B., BISWAS, A., SINGH V.P., SINGH V.P., SRIVASTAVA, S.K. (2004). Prevalent serotypes of *Pasteurella multocida* isolated from different animal and avian species in India. *Vet. Res. Commun.*, **28**: 657-67.
- LARIVIERE, S., LEBLANC, L., MITTAL, K.R., MARTINEAU, G.P. (1993). Comparisons of isolation methods for the recovery of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from nasal cavities of piglets. *J. Clin. Microbiol.*, **31**: 364-367.
- LAX, A.J., CHANTER, N. (1990). Cloning of the toxin gene from *Pasteurella multocida* and its role in atrophic rhinitis. *J. Gen. Microbiol.*, **136**: 81-87.
- LAX, A.J., CHANTER, N., PULLINGER, G.D., HIGGINS, T., STADDON, J.M., ROZENGURT, E. (1990). Sequence analysis of the potent mitogenic toxin of *Pasteurella multocida*. *FEBS. Lett.*, **277**: 59-64.
- LEE, C.W., WILKIE, I.W., TOWNSEND, K.M., FROST, A.J. (2000). The demonstration of *Pasteurella multocida* in the alimentary tract of chickens after experimental oral infection. *Vet. Microbiol.*, **72**: 47-55.
- LEE, J., KIM, Y.B., KWON, M. (2007). Outer membrane protein H for protective immunity against *Pasteurella multocida*. *J. Microbiol.*, **45**: 179-184.
- LEE, J., KANG, H.E., WOO, H.J. (2012). Protective immunity conferred by the C-terminal fragment of recombinant *Pasteurella multocida* toxin. *Clin Vaccine Immunol.* **19**:1526-31.
- LEE, K.E., JEOUNG, H.Y., LEE, J.Y., LEE, M.H., CHOI, H.W., CHANG, K.S., OH, Y.H., AN, D.J. (2012). Phenotypic characterization and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Pasteurella multocida* isolated from Korean pigs. *J. Vet. Med. Sci.*, **74**:567-73.
- LIN, J., HUANG, S., ZHANG, Q. (2002). Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microb. Infect.*, **4**: 325-331.
- LIU, W., CHEMALY, R.F., TUOHY, M.J., LASALVIA, M.M., PROCOP, G.W. (2003). *Pasteurella multocida* urinary tract infection with molecular evidence of zoonotic transmission. *Clin. Infect. Dis.* **36**: E58-E60.
- LU, Y.S., AFENDIS, S.J., PAKES, S.P. (1988). Identification of immunogenic outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* 3:A in rabbits. *Infect. Immun.*, **56**: 1532-1537.
- LUO, Y., ZENG, Q., GLISSON, J.R., JACKWOOD, M.W., CHENG, I.H., WANG, C. (1999). Sequence analysis of *Pasteurella multocida* major outer membrane protein (OmpH) and application of synthetic peptides in vaccination of chickens against homologous strain challenge. *Vaccine.*, **17**: 821-831.

- MADSEN, E.B., BISGAARD, M., MUTTERS, R., PEDERSEN, K.B. (1985). Characterization of *Pasteurella* species isolated from the lungs of calves with pneumonia. *Can. J. Comp. Med.*, **49**: 63-67.
- MAY, B.J., ZHANG, Q., LI, L.L., PAUSTIAN, M.L., WHITTAM, T.S., KAPUR, V. (2001). Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**: 3460-3465.
- MIZAN, S., HENK, A., STALLINGS, A., MAIER, M., LEE, M.D. (2000). Cloning and characterization of sialidases with 2-6' and 2-3' sialyl lactose specificity from *Pasteurella multocida*. *J. Bacteriol.*, **182**: 6874-6883.
- MIFLIN, J.K., BLACKALL, P.J. (2001). Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **33**: 216-221.
- MOHAMED, M.A., MOHAMED, M.W., AHMED, A.I., IBRAHİM, A.A., AHMED, M.S. (2012). *Pasteurella multocida* in backyard chickens in Upper Egypt: incidence with polymerase chain reaction analysis for capsule type, virulence in chicken embryos and antimicrobial resistance. *Vet. Ital.*, **48**: 77-86.
- MOORE, M.K., CICNIAKCHUBBS, L., GATES, R.J. (1994). A new selective enrichment procedure for isolating *Pasteurella multocida* from avian and environmental samples. *Avian. Dis.*, **38**: 317-324.
- MORRIS, E.J., (1958). Selective media for some *Pasteurella* species. *J. Gen. Microbiol.*, **19**: 305-311.
- MUTTERS, R., IHM, P., POHL, S., FREDERIKSEN, W., MANNHEIM, W. (1985). Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **35**: 309-322.
- MUTTER, R., MANNHEIM, W., BISGAARD, M. (1989). Taxonomy of the Group. ADLAM, C., RUTTER, J.M. *PASTEURELLA and PASTEURELLOSIS*. Academic Press Inc., New York.
- NAMIOKA, M., MURATA, S. (1961a). Serological studies on *Pasteurella multocida*. I: A simplified method for capsular typing of the organisms. *Cornell. Vet.*, **51**: 498-507.
- NAMIOKA, M., MURATA, S. (1961b). Serological studies on *Pasteurella multocida*. II: Characteristics of the somatic 'O' antigen of the organism. *Cornell. Vet.*, **51**: 507-521.
- NAMIOKA, M., MURATA, S. (1961c). Serological studies on *Pasteurella multocida*. III: 'O' antigen analysis of cultures isolated from various animals. *Cornell. Vet.*, **51**: 522-528.
- NAMIOKA, S., BRUNER, D.W. (1963). Serological studies on *Pasteurella multocida*. IV: Type distribution of organisms on the basis of their capsular and O groups. *Cornell. Vet.*, **53**: 41-43.
- NAMIOKA, S., MURATA, M. (1964). Serological studies on *Pasteurella multocida*. V: Some epizootiological findings resulting from 'O' antigen analysis. *Cornell. Vet.*, **54**: 520-534.

- NEUMANN, S., LEEB, T., BRENIG, B. (1998). Vergleich Zwischen PCR und Kultureller Untersuchung zum Nachweis von Infektionen mit *Pasteurella multocida* beim Hund. *Kleintierpraxis*, **43**: 69-74.
- NIKAIDO, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **67**: 593-656.
- NIKUNEN, S., HARTEL, H., ORRO, T., NEUVONEN, E., TANSKANEN, R., KIVELA, S.L., SANKARI, S., AHO, P., PYÖRALA, S., SALONIEMI, H., SOVERI, T. (2007). Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **30**:143-151.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). (2008). MANUAL OF DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES FOR TERRESTRIAL ANIMALS (Terrestrial Manual), Paris. 739-1091.
- OGUNNARIWO, J.A., SCHRYVERS, A.B. (2001). Characterization of a novel transferrin receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*. *J. Bacteriol.*, **183**: 890-896.
- OKAY, S., OZCENGİZ, E., GÜRSEL, I., OZCENGİZ, G. (2012). Immunogenicity and protective efficacy of the recombinant *Pasteurella* lipoprotein E and outer membrane protein H from *Pasteurella multocida* A:3 in mice. *Res. Vet. Sci.*, **93**:1261-65.
- OTHMAN, S., PARTON, R., COOTE, J. (2012). Interaction between mammalian cells and *Pasteurella multocida* B:2. Adherence, invasion and intracellular survival. *Microb. Pathog.*, **52**:353-8.
- ÖNAT, K., KAHYA, S., ÇARLI, K.T. (2010). Frequency and antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* isolates from nasal cavities of cattle. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **34**: 91-94.
- PORTIS, E., LINDEMAN, C., JOHANSEN, L., STOLTMAN, G. (2012). A ten-year (2000-2009) study of antimicrobial susceptibility of bacteria that cause bovine respiratory disease complex *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni* in the United States and Canada. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **24**:932-44.
- PRADO, M.E., PRADO, T.M., PAYTON, M., CONFER, A.W. (2006). Maternally and naturally acquired antibodies to *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **111**: 301-307.
- PRATT, J., COOLEY, J.D., PURDY, C.V., STRAUS, DC. (2000). Lipase activity from strains of *Pasteurella multocida*. *Curr. Microbiol.*, **40**: 306-309.
- PULLINGER, G.D., BEVIR, T., LAX, A.J. (2004). The *Pasteurella multocida* toxin is encoded within a lysogenic bacteriophage. *Mol. Microbiol.*, **51**: 255-269.
- PURDY, W.C., RALEIGH, H.R., COLLINS, K.J., WATTS, D.J., STRAUS, C.D. (1997). Serotyping and enzyme characterization of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolats recovered from pneumonic lungs of stressed feeder calves. *Curr. Microbiol.*, **34**: 224-249.
- QUINN, P.J., MARKEY, B.K., CARTER, M.E., DONNELLY, W.J., LEONARD, F.C. (2004). *VETERINARY MICROBIOLOGY and MICROBIAL DISEASES*. Blackwell, UK.

- RERAT, M., ALBINI, S., JAQUIER, V., HUSSY D. (2012). Bovine respiratory disease: efficacy of different prophylactic treatments in veal calves and antimicrobial resistance of isolated *Pasteurellaceae*. *Prev. Vet. Med.*, **103**:265-73.
- RHOADES, K.R., RIMLER., R.B. (1987). Effects of *Pasteurella multocida* endotoxins on turkey poult. *Avian Dis.*, **31**: 523-526.
- RIMLER, R.B., RHOADES, K.R. (1987). Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. *J. Clin. Microbiol.*, **25**: 615-618.
- RIMLER, R.B., RHOADES, K.R. (1989). *Pasteurella multocida*. ADLAM, C., RUTTER, J.M. *PASTEURELLA and PASTEURELLOSIS*. Academic Press Inc. UK. 37-73.
- RIMLER, R.B. (2001). Purification of a cross-protective antigen from *Pasteurella multocida* grown in vitro and in vivo. *Avian Dis.*, **45**: 572-580.
- ROSE, S., DESMOLAIZE, B., JAJU, P., WILHELM, C., WARRASS, R., DOUTHWAITE, S. (2012). Multiplex PCR to identify macrolide resistance determinants in *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**: 3664-9.
- ROSENBUSCH, C.T., MERCHANT, I.A. (1939). A study of the hemorrhagic septicemia *pasteurella*. *J. Bacteriol.*, **37**: 69-89.
- RUFFOLO, C.G., ADLER, B. (1996). Cloning, sequencing, expression, and protective capacity of the *oma87* gene encoding the *Pasteurella multocida* 87-kilodalton outer membrane antigen. *Infect. Immun.*, **64**: 3161-3167.
- RUFFOLO, C.G., TENNENT, J.M., MICHALSKI, W.P., ADLER, B. (1997). Identification, purification, and characterization of the type 4 fimbriae of *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.*, **65**: 339-343.
- SAMUEL, M.D., SHADDUCK, D.J., GOLDBERG, D.R., JOHNSON, W.P. (2003). Comparison of methods to detect *Pasteurella multocida* in carrier waterfowl. *J. Wildl. Dis.*, **39**: 125-135.
- SCHARMANN, W.R., DRZENIEK, R., BLOBEL, H. (1970). Neuraminidase of *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.*, **1**: 319-320.
- SHAYEGH, J., ATASHPAZ, S., SALEHI, T.Z., HEJAZI, M.S. (2010). Potential of *Pasteurella multocida* isolated from healthy and diseased cattle and buffaloes in induction of diseases. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.*, **54**: 299-304.
- SHIVACHANDRA, S.B., VISWAS, K.N., KUMAR, A.A. (2011). A review of hemorrhagic septicemia in cattle and buffalo. *Anim. Health. Res. Rev.*, **12**:67-82.
- SIAHANIDOU, T., GIKA, G., SKIATHITOU, A.V., OIKONOMOPOULOS, T., ALEXANDROU-ATHANASSOULIS, H., KOUTOUZIS, E.I., SYRIOPOULOU, V.P. (2012). *Pasteurella multocida* infection in a neonate: evidence for a human-to-human horizontal transmission. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **31**: 536-7.
- SNEATH, P. H. A. (1982). Status of nomenclatural types in the approved lists of bacterial names. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* **32**: 459-460.

- SNEATH, P.H., STEVENS, M. (1990). *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov. and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**: 48-53.
- SNIPES, K.P., GHAZIKHANIAN, G.Y., HIRSH, D.C. (1987). Fate of *Pasteurella multocida* in the blood vascular system of turkeys following intravenous inoculation comparison of an encapsulated, virulent strain with its avirulent, acapsular variant. *Avian Dis.*, **31**: 254-259.
- SNOWDER, G. D., VAN VLECK, L. D., CUNDIFF L. V., BENNETT, G. L. (2006). Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic, and economic factors. *J. Anim. Sci.*, **84**: 1999-2008.
- SOIKE, D., SCHULZE, C., KUTZER, P., EWERT, B., VAN DER GRINTEN, E., SCHLIEPHAKE, A., EWERS, C., BETHE, A., RAU, J. (2012). Acute pasteurellosis in fallow deer, cattle and pigs in a region of Eastern Germany. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, **125**:122-8.
- SORIANO-VARGAS, E., VEGA-SÁNCHEZ, V., ZAMORA-ESPINOSA, J.L., ACOSTA-DIBARRAT, J., AGUILAR-ROMERO, F., NEGRETE-ABASCAL, E. (2012). Identification of *Pasteurella multocida* capsular types isolated from rabbits and other domestic animals in Mexico with respiratory diseases. *Trop. Anim. Health. Prod.*, **44**: 935-7.
- ST MICHAEL, F., VINOGRADOV, E., LI, J., COX, A.D. (2005). Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Pasteurella multocida* genome strain Pm70 and identification of the putative lipopolysaccharide glycosyltransferases. *Glycobiology*, **15**: 323-333.
- TAKADA IWAO, A., UTO, T., MUKAI, T., OKADA, M., FUTO, S., SHIBATA, I. (2007). Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant toxin for detection of antibodies against *Pasteurella multocida* toxin. *J. Vet. Med. Sci.*, **69**: 581-586.
- TAN, H.Y., NAGOOR, N.H., SEKARAN, S.D. (2010). Cloning, expression and protective capacity of 37 kDa outer membrane protein gene (ompH) of *Pasteurella multocida* serotype B:2. *Trop. Biomed.*, **27**:430-41.
- TATUM, F.M., YERSIN, A.G., BRIGGS, R.E. (2005). Construction and virulence of a *Pasteurella multocida* fhaB2 mutant in turkeys. *Microb. Pathog.*, **39**: 9-17.
- TEGTMEIER, C., UTTETHAL, A., FRIIS, N.F., JENSEN, N.E., JENSEN, H.E. (1999). Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. *Zentralbl. Veterinarmed. B.*, **46**: 693-700.
- TOWNSEND, K.M., FROST, A.J., LEE, C.W., PAPADIMITRIOU, J.M., DAWKINS, H.J. (1998). Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **36**: 1096-100.
- TOWNSEND, K.M., BOYCE, J.D., CHUNG, J.Y., FROST, A.J., ADLER, B., (2001). Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.*, **39**: 924-929.
- VASFI MARANDI, M., MITTAL, K.R. (1997). Role of outer membrane protein H (OmpH)- and OmpA-specific monoclonal antibodies from hybridoma tumors in protection of mice against *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.*, **65**, 4502-4508.

- WALLMANN, J. (2006) Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. *Int. J. Med. Microbiol.*, **41**: 81-86.
- WELSH, R.D., DYE, L.B., PAYTON, M.E., CONFER, A.W. (2004). Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia. *J. Vet. Diagn. Invest.* **16**: 426-431.
- WILSON, B.A., HO, M. (2005). *Pasteurella multocida* Toxin. ALOUF, J.E., POPOFF, M.R. *THE COMPREHENSIVE SOURCEBOOK OF BACTERIAL PROTEIN TOXINS*. Academic Press is an imprint of Elsevier, USA. 430-447.
- WIJewardana, T.G., Wilson, C.F., Gilmour, N.J., Poxtton, I.R. (1990). Production of mouse monoclonal antibodies to *Pasteurella multocida* type A and the immunological properties of a protective anti-lipopolysaccharide antibody. *J. Med. Microbiol.*, **33**: 217-222.
- YATES, W.D.G. (1982). A review of infectious ovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can. J. Comp. Med.*, **46**: 225-263.
- YOSHIMURA, H., ISHIMARU, M., ENDOH, Y.S., KOJIMA, A. (2001). Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs. *J. Vet. Med. B.*, **48**: 555-560.

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı	Selahattin
Soyadı	KONAK
Doğum yeri ve tarihi	21.01.1981
Uyruğu	T.C.
Medeni durumu	Evli
İletişim Adresi ve telefonu	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji A.D. 555 6685250
E-posta	skonak@aku.edu.tr

II-Eğitimi

1999-2005	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakóltesi
1992-1998	Afyon Fatih Lisesi ve Ortaokulu
1992-1987	Afyon Fatih İlköğretim Okulu

III- Ünvanı

Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

2006- ... Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Derneği