

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Mannheimia haemolytica SUŞLARININ FARKLI
BESİYERLERİNDE ÜREME VE LÖKOTOKSİN
OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Mehmet ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK

ŞANLIURFA

2019

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Mannheimia haemolytica SUŞLARININ FARKLI
BESİYERLERİNDE ÜREME VE LÖKOTOKSİN
OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Mehmet ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK

Bu tez, HÜBAK tarafından 16107 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA

2019

T. C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Mehmet ÇELİK'in hazırladığı "MANNHEIMIA HAEMOLYTICA SUŞLARININ FARKLI BESİYERLERİNDE ÜREME VE LÖKOTOKSİN OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ" başlıklı çalışması 18/06/2019 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek Mikrobiyoloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak kabul edilmiştir.



BAŞKAN

Prof. Dr. Oktay KESKİN

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi



ÜYE

Prof. Dr. Hasan Hüseyin HADİMLİ

Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi



ÜYE

Doç. Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20.04.2019 tarih ve 2019.10.27... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aőamasında benden yardımlarını esirgemeyen, tezimin en mükemmel hale gelmesi için çabalayan başta tez danışmanım hocam sayın Doç. Dr. Sevil ERDENLİŐ GÜRBİLEK hanımefendiye teőekkürü bir borç bilirim. Mikrobiyoloji Anabilim Dalında görevli Anabilim Dalı Baőkanı hocam Prof. Dr. Oktay KESKİN ve bölüm hocam Prof. Dr. Osman Yaşar TEL 'e tez sürecinde yardımları için teşekkür ederim. Yüksek lisans tez çalıőmam süresince benden yardımlarını esirgemeyen arkadaőım Ahmet Selman MIZRAKLIDAŐ'a ve başta annem Hacer Nida ÇELİK olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

Mehmet ÇELİK

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
TABLolar DİZİNİ.....	vi
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Pasteurellaceae Familyası.....	3
2.2. <i>Mannheimia haemolytica</i>	5
2.2.1. <i>M. haemolytica</i> Virülans Faktörleri.....	9
2.2.2. <i>M. haemolytica</i> 'nın Üreme ve Lökotoksin Salgılama Özellikleri.....	15
2.3. Teşhis Tedavi Kontrol.....	16
2.4. Aşı Çalışmaları.....	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM	20
3.1. Gereç	20
3.1.1. Bakteriyel Suşlar.....	20
3.1.2. Suşların Üretilmesinde Kullanılan Besiyerleri ve Hazırlanması.....	20
3.1.3. Testler için Kullanılan Besiyeri ve Solüsyonlar.....	22
3.1.4. ELISA için kullanılan solüsyonlar.....	24
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Test Suşlarının Biyokimyasal Testler ile İdentifikasyonu.....	25
3.2.2. PCR.....	25
3.2.3. Test Besiyerlerinde Test Suşlarının Üretimi.....	26
3.2.4. Test Besiyerlerin Kültür Süpernatantlarında Lökotoksin Seviyelerinin Karşılaştırılması.....	26
3.2.5. Direkt ELISA.....	27
3.2.6. İstatiksel Analiz.....	27
4. BULGULAR	28

4.1. Test Suşlarının Biyokimyasal Testler ile İdentifikasyonu	28
4.2. PCR.....	28
4.3. Test Besiyerlerinde Test Suşlarının Üreme Sonuçları.....	29
4.4. Test Besiyerlerin Kültür Süpernatantlarında Lökotoksin Seviyelerinin Karşılaştırılması Sonuçları.....	34
5. TARTIŞMA.....	36
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	39
7. KAYNAKLAR.....	40
8. EKLER.....	46
8.1. Etik Kurul.....	46
8.2. Orjinallik Beyanı	48
8.3. Turnitin	49
8.4. Tez Veri Giriş Formu.....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>M. haemolytica</i> LktA ve fonksiyonel alanları	11
Şekil 4.1. PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.	29
Şekil 4.2. <i>M. haemolytica</i> 03 suşun 4 farklı besiyerinde üreme durumları	32
Şekil 4.3. <i>M. haemolytica</i> 04 suşun 4 farklı besiyerinde üreme durumları	33
Şekil 4.4. <i>M. haemolytica</i> 05 suşun 4 farklı besiyerinde üreme durumları	33
Şekil 4.5. <i>M. haemolytica</i> 06 suşun 4 farklı besiyerinde üreme durumları	34
Şekil 4.6. RPMI besiyerinde 4 farklı suşun üreme durumları	34



TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. SSHK kompleksinin etyolojisinde rol oynayan faktörler	3
Tablo 2.2. Pasteurella ve Mannheimia cinslerinin identifikasyonundaki bazı özellikler	5
Tablo 2.3. <i>M. haemolytica</i> 'nın biyokimyasal testleri ve identifikasyon ölçütleri	6
Tablo 2.4. <i>M. haemolytica</i> suşlarının karbonhidrat fermantasyonuna göre biyotiplendirme kriterleri.....	6
Tablo 4.1. Test suşlarının biyokimyasal test sonuçları	28
Tablo 4.2. <i>M. haemolytica</i> suşlarının farklı besiyerlerinde üreme sonuçları.....	30
Tablo 4.3. <i>M. haemolytica</i> suşlarının RPMI besiyerinde üreme sonuçları	31
Tablo 4.4. <i>M. haemolytica</i> BAA-410 referens suşunun 4 farklı besiyerinde üreme sonuçları. 31	
Tablo 4.5. <i>M. haemolytica</i> MH 04 test suşunun 4 farklı besiyerinde üreme sonuçları.....	31
Tablo 4.6. <i>M. haemolytica</i> MH 05 test suşunun 4 farklı besiyerinde üreme sonuçları.....	32
Tablo 4.7. <i>M. haemolytica</i> MH 06 test suşunun 4 farklı besiyerinde üreme sonuçları.....	32
Tablo 4.8. Test besiyerlerin kültür süpernatantlarında lökotosin seviyelerinin direkt ELISA ile karşılaştırılması	35

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

BHIB	Brain Heart Infusion Broth
BVD	Bovine Viral Diarrhea Virüs
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
HRPO	Horse radish peroxidase
IBR	İnfeksiyöz Bovine Rhinotracheitis
Lkt	Lökotoksin
LPS	Lipopolisakkarit
NH	Natif Hapten
OD	Optik Dansite
OMP	Outer Membrane Proteins
PI-3	Parainfluenza-3
Poly B	Polisakkarit B
R	Rough
R-LPS	Rough Lipopolisakkarit
RSV	Respiratory Syncytial virüs
SSHK	Sığır solunum yolu hastalığı kompleksi
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

ÖZET

***Mannheimia haemolytica* SUŞLARININ FARKLI BESİYERLERİNDE ÜREME VE LÖKOTOKSİN OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Mehmet ÇELİK

Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Mannheimia haemolytica hayvanlarda pnömoniye sebebiyet veren en etkili bakterilerden biridir. *M. haemolytica*'nın neden olduğu hastalığın kontrolünde aşılamanın önemli bir araç olduğu belirtilmektedir. Etkenin en önemli virülans faktörü olan lökotoksine karşı gelişen antikolar, hastalığa karşı dirençte önemli bir rol oynarlar. Bu nedenle aşılama çalışmalarında uygun miktarda lökotoksin üretecek suşun ve besiyerinin seçimi önemlidir. Bu amaçla, çalışmada 4 ayrı besiyeri ve 4 ayrı suş test edildi. Test edilen besiyerlerinde canlılık sayımı bakımından RPMI besiyeri diğer test edilen besiyerlerinden önemli derecede farklı bulundu ($P<0.001$). Öbür taraftan BHIB, BHIB+ %5 serum ve BHIB+%1 yeast extract besiyerleri canlılık sayımı açısından birbirlerinden istatistiki olarak önemsiz bulundular ($P>0.05$). Ancak, test edilen suşların tümünün 24 saatlik kültürleri en fazla canlılık sayımını BHIB + %5 at serumu içeren besiyerinde gösterdiler. Suşlar arasında bakteriyel sayıma ilişkin istatistiki olarak önemli bir fark saptanmadı ($P>0.05$).

RPMI besiyeri üretilen lökotoksin açısından diğer besiyerlerine göre istatistiki olarak önemli derecede farklı bulundu ($P<0.001$). Tüm test suşları RPMI besiyerinde diğer 3 besiyerine göre çok daha fazla miktarda lökotoksin üretti. Sonuçlarımıza göre, MH05 suşu en fazla miktarda lökotoksin üretti ve bunu MH06 suşu izledi. MH04 ve MH03 suşları arasında bu yönden bir farklılık saptanmadı. Test edilen kültür besiyerlerinde üreyen mikroorganizma sayısı ile üretilen lökotoksin arasında bir korelasyon olmadığı gözlemlendi. Hatta bu ikisi arasında ters bir korelasyon olabileceği düşünüldü. Sonuç olarak, açlık ve kısıtlı demir varlığı gibi stress faktörlerinin *Mannheimia haemolytica*'nın daha fazla lökotoksin ve muhtemelen diğer virülans faktörleri üretmesine yol açtığı kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Mannheimia haemolytica*, pnömoni, lökotoksin, virülans

ABSTRACT

INVESTIGATION OF REPRODUCTIVE AND LEUKOTOXIN GENERATION PROPERTIES IN DIFFERENT MEDIUM OF *Mannheimia haemolytica*

Mehmet ÇELİK

Department of Veterinary Microbiology, Master Thesis

Mannheimia haemolytica is one of the most effective bacteria causing pneumonia in animals. It is stated that vaccination against *M. haemolytica* is an important means of control of the disease. Since antibodies against leukotoxin, which is the most important virulence factor of the agent, play an important role in resistance to disease, selection of strain and medium that produce leukotoxin is most important in vaccination studies. For this purpose, 4 different strains and 4 different strains tested in the study were evaluated. Based on the viability counts in tested media, RPMI media was found significantly different from the rest of media ($P < 0.001$). On the other hand, BHIB, BHIB+5% serum and BHIB+%1 Yeast extract media were not found statistically different from each others ($P > 0.05$) for the viability counts. However, the viability counts measured after 24 hours of culture of tested strains were found to be highest in medium containing BHIB + 5% horse serum. There were no significant differences among strains related to bacterial counts in tested media ($P > 0.05$).

RPMI media was significantly different from the rest of media regarding to produced leukotoxin amount in direct ELISA ($P < 0.001$). All the strains produced more leukotoxins in RPMI media compared to other 3 tested media. According to our results, the strain MH05 produced the highest amount of leukotoxin followed by MH06. There was no significant differences between MH03 and MH04 in this regard. There was no correlation between number of the bacteria and the leukotoxin amount in tested media. It was even thought that there might be inverse correlation between viability count and leukotoxin production. As conclusion, it was assumed that stress factors like starvation or iron restriction cause *Mannheimia haemolytica* to produce more leukotoxin and possibly other virulence factors.

Keywords: *Mannheimia haemolytica*, pneumonia, leukotoxin, virulence

1. GİRİŞ

Ülkemizde ve dünyada önemli ekonomik kayıplara neden olan solunum sistemi hastalıkları daha çok sığır, koyun ve keçi gibi hayvanlarda görülmektedir. Pnömoniler, sığır ve koyun türlerinde çok görülen ve ekonomik kayıplara sebebiyet veren hastalıkların başında gelmektedir. Ruminant pnömonilerinde çevresel faktörlerle (taşıma, süttten kesme, kalabalık, yetersiz beslenme, ani iklim değişiklikleri gibi stres faktörleri) birlikte, birden fazla infeksiyöz etkenin (çeşitli bakteriler, virüsler, mantar, parazit vs.) rol oynadığı kabul edilmektedir. Nakliye ateşi olarak bilinen bu hastalık (shipping fever) multifaktöriyel bir hastalık olmakla birlikte, *Mannheimia haemolytica* potansiyel hayvan patojeni olarak kabul edilmektedir. Hastalığa karşı korunmada bakterinin en önemli virülans faktörü olarak kabul edilen lökotoksine karşı oluşan antikorlar önemlidir. Hastalığın kontrolünde gerek ölü bakteri süşlarından hazırlanmış bakterinlerin ve gerekse kültür filtratlarından hazırlanan aşular kullanılmaktadır. Aşı için seçilecek süşların lökotoksin üretme kabiliyetinin fazla olması oluşacak bağışıklık ile paralellik göstereceğinden bu süşların seçimi önemlidir. Bunun dışında endüstriyel aşı üretiminde hedef, birim besiyerinden alınan üretim miktarının en fazla olmasıdır. Bu bağlamda birim besiyerinde gerçekleşen canlı bakteri sayısının en fazla olduğu besiyeri seçimi de hedeflenmelidir. Bu amaçla, bu çalışmada daha önceki çalışmalarda sığırların pnömoni vakalarından izole edilmiş olan 3 farklı *M. haemolytica* süşu referens *M. haemolytica* süşu ile birlikte biri minimal ve üçü zenginleştirilmiş olmak üzere toplamda 4 farklı besiyerlerinde üretilmiştir. Test kültürlerinin üremelerinin çeşitli safhalarında alınan örneklerinden canlılık sayımları yapılmış ve en iyi üreme sağlayan besiyeri belirlenmiştir. Ayrıca bu test süşlarının zenginleştirilmiş ve minimal besi yerinde üretilmesi sonucu elde edilen kültür filtratlarının lökotoksin seviyeleri ELISA ile karşılaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Sığırlarda *Mannheimia haemolytica*'nın neden olduğu solunum sistemi hastalığı (Mannheimiosis, shipping fever, pnömonik pastörelloz) Amerika, Kanada, İngiltere ve Avrupa basta olmak üzere dünyanın birçok ülkesinde önemli ölçüde maddi kayıplara neden önemli bir enfeksiyondur (1). Hastalık dünya genelinde belirgin bir ekonomik öneme sahiptir. Örneğin Amerika'da sığır endüstrisine verdiği zarar yıllık 1 milyar doların üzerindedir. Bunun yanında koruyucu tedbirler ve tedavi giderlerinin yıllık 3 milyar doları aştığı bildirilmektedir (2).

Mannheimiosis yemden faydalanamama, süt verimliliğinde azalma, canlı vücut ağırlığının düşüşüne ayrıca ilaç ve bakım giderlerinin artışına neden olmaktadır. Oluşan zararın çeşitli stres etkileri ile ve/veya virüs ve bakteriler sebebiyle ile daha da arttığı tespit edilmiştir. Bunlar, süttten kesme, kötü beslenme, nakliye, normalden fazla sayıda hayvan içeren ahırda yaşama ve ani iklim değişiklikleri gibi stres faktörleri önemli rol oynamaktadır (1, 2). Hastalığın etiyojisinde virüsler (İnfeksiyöz Bovine Rhinotracheitis (IBR), Bovine Viral Diarrhea Virüs (BVD), Parainfluenza-3 (PI-3), Respiratory Syncytial virüs (RSV) bakteriler (*Pasteurella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Echerichia coli*, *Acinetobacter spp.*, *Mycoplasma spp.* vb) çeşitli mantar ve parazit türlerinin etkili olduğu bildirilmektedir (3, 4).

Mannheimia ismi Alman bir biyolog olan ve *Pasteurellaceae* ailesinin taksonomisinin anlaşılmasına çok önemli bilimsel katkılar sağlayan Walter Manheim'in anısına ithafen verilmiştir. Hastalığın etiyojisinde rol oynayan *M. haemolytica* heterojen bir bakteriyel patojendir. Bu bakterinin heterojenliğini L arabinozu fermente eden A biyotipleri ve trehalozu fermente eden T biyotiplerinin toplamda bugün için kabul edilen kapsüller antijenlere bağlı 17 serotipi oluşturmasından kaynaklanmaktadır. *M. haemolytica* A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 ve A17 serotiplerini içerir iken, T3, T4, T10 ve T15 serotipleri *P. trehalosi* olarak isimlendirilmiştir. Geriye kalan A11 serotipi *M. glucosida* olarak yeni bir tür olarak kabul edilmiştir (5). Yakın zamanda yapılan yeni taksonomik çalışmalar *P. trehalosi*'yi Bibersteinia cinsine reklasifiye etmiştir (6).

İçinde *M. haemolytica*'nın da bulunduğu sığır solunum yolu hastalığı kompleksi (SSHK) multifaktöriyel bir fenomendir (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. SSHK kompleksinin etyolojisinde rol oynayan faktörler (4)

Stres Faktörleri	Viral Etkenler	Bakteriyel Etkenler
Sıcaklık	PI-3	Pasteurella
Soğuk	IBR	Mannheimia
Toz	BVD	Haemophilus
Gebelik	RSV	Mycoplasma
Hasar	Adenovirus	
Yorgunluk	Rhinovirus	
Açlık	Herpes virus IV	
Kaygı	Enterovirus	
Tahriş edici gazlar	Reovirus	
Beslenme yetersizlikleri		
Cerrahi		
İklim		
Nem		
Havalandırma		
Nakliye Mesafesi		
Stoklama yoğunluğu		

2.1. Pasteurellaceae Familyası

Mannheimia haemolytica, *Eubacteria* alemi, *Proteobacteria* şubesi, *Gammaproteobacteria* sınıfı, *Pasteurellales* takımı, *Pasteurellaceae* ailesi içerisinde yer alan bir sistematikte bulunurlar (5).

Pasteurellaceae ailesine mensup üyelerden memeliler ve kanatlı hayvanlarda üst solunum yolu ve alt genital kanal mukozasının normal florasında bulunurlar ve fırsatçı patojenler olarak tanımlanırlar. *Pasteurellaceae* ailesinin tüm üyeleri Gram negatif olup kokobasil görünümündedir. Fakültatif anaerob olan etkenler oksidaz pozitifdir. Bu durum bunları *Enterobacteriaceae* ailesinin üyelerinden ayırır. Hareketsizdirler ve beslenme gereksinimlerinde çok titiz davranırlar (7).

Pasteurella' ların izolasyonu ve identifikasyonunda yaşanan önemli bir problem özgül etkenin her zaman izolasyonu ve identifikasyonunun mümkün olamamasıdır. Bunun en önemli nedeni primer etken yerine sekonder bakterilerin daha kolay izole edilebilmesi ve sonuçta yaşanan teşhis ve sağaltımda yaşanan zorluklardır (1, 3, 7).

Pasteurellaceae familyası, hayvan hastalıklarına katkıda bulunan birçok organizmayı içerir. Birçoğu, üst solunum ve gastrointestinal yolların normal sakinleri

olup, diğerk faktörlerin bu bakterilerin daha derin seviyelerine ilerleme kabiliyetlerini arttırdığı durumlarda fırsatçı karakterleri ile hastalığa neden olurlar (8, 9, 10).

16S rRNA sekans kombinasyonu ve diğerk moleküler teknikler ile yapılan çalışmalar, Pasteurellaceae familyasında bulunan birçok yeni cinsi ortaya koymuştur.

Güncel taksonomiye göre Pasteurellaceae ailesinde 29 cins bulunur. Bunlar; *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Avibacterium*, *Basfia*, *Bibersteinia*, *Bisgaardia*, *Caviibacterium*, *Chelonobacter*, *Conservatibacter*, *Cricetibacter*, *Frederiksenia*, *Gallibacterium*, *Glaesserella*, *Haemophilus*, *Histophilus*, *Lonepinella*, *Mannheimia*, *Mesocricetibacter*, *Mribacter*, *Necropsobacter*, *Nicoletella*, *Otariodibacter*, *Pasteurella*, *Seminibacterium*, *Terraemophilus*, *testidunibacter*, *Ursidibacter*, *Verpertiliibacter* ve *Volucribacter*. *Avibacterium*, *Bibersteinia*, *Mannheimia* ve *Pasteurella* cinsleri üyeleri çeşitli hayvan türlerinin hastalıklarında önemli bir rol oynarlar (11).

Geniş bir konakçı yelpazesine sahip olan *Pasteurella* cinsi bakteriler sığırlarda akut ve subakut seyreden, ateşli, infeksiyöz karakterde pnömoni, hemorajik septisemi, meningoensefalitis ve mastitis, koyunlarda pnömoni ve mastitis, domuzlarda atrofik rinitis ve pnömoni, kanatlılarda tavuk kolerası, deney hayvanlarında ise rinitis ve solunum sistemi infeksiyonlarına sebebiyet vermektedir (7).

Pasteurellaceae ailesindeki bakteriler glikozun fermantasyonundan asit oluştururlar, nitratlar ise nitritlere indirgenirler. Metil Red ve Voges Proskauer testleri negatiftir. Lysine ve arjinin dekarboksilaz enzimleri açısından negatiftirler. Glukoz ve diğerk fermente edilebilir bileşikleri asit oluşturarak fermente ederler. Bunun yanında *Pasteurellaceae* ailesi bünyesindeki bakterilerin proteolitik özellikleri yoktur, sütü koagüle edemez ve jelâtini eriyik hale getiremezler (Tablo 2.2.) (12).

Pasteurellaceae familyasında yer alan *Pasteurella* ve *Mannheimia* cinsleri içindeki ajanların serolojik teşhisinde birçok test kullanılmaktadır. Bunlar İndirekt Hemaglutinasyon, Çabuk İndirekt Hemaglutinasyon, Çabuk Lam Aglutinasyon, Counter Immunelektrophoresis, Agar Jel Immunodiffüzyon, koaglutinasyon testi ve Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dir (13).

Tablo 2.2. Pasteurella ve Mannheimia cinslerinin identifikasyonundaki bazı özellikler (12)

Bakteri Türleri	Gram Boyama	Hemoliz	İndol	Katalaz	Üreaz	Nitrat	Oksidaz	Mac Conkey üreme
<i>M. haemolytica</i>	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>P. multocida</i>	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>P. pneumotropica</i>	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>P. aerogenes</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>P. dagmatis</i>	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>P. caballi</i>	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>P. gallinarum</i>	-	-	-	+	-	-	+	-

2.2. Mannheimia haemolytica

M. haemolytica Proteobacteria'ların Gammaproteobacteria sınıfı Pasteurellales takımı, Pasteurellaceae ailesi, Mannheimia cinsi içerisinde yer alır (5).

Mannheimia cinsinin önemli bir türü olan *M. haemolytica* Gram negatif, hareketsiz, sporsuz, kapsüllü, kokobasil tarzında, fermentatif, oksidaz pozitif, katalaz pozitif, fakültatif anaerobik bir bakteridir. Koyun kanlı agarda *M. haemolytica* kolonilerinin 37°C'de 24 saat içerisinde düzgün kenarlı, S-tipli, grimsi, 0,3–1,0 µm çapında, 1,2–2,0 µm uzunluğunda oldukları gözlemlenir. Suşların çoğunluğu sığır, tavşan ve koyun kanlı agarda β-hemoliz meydana getirir. Suşlar, besiyerini homojen biçimde bulanıklaştırır ve dip kısımda tortulaşma oluşturmak suretiyle üreme gösterir. MacConkey agarda laktozun fermentasyonuna yol açtığı için küçük olarak, pembe renkli, toplu iğne başı genişliğinde koloniler oluşturur. TSI (Triple Sugar Iron) agarda glikozu, laktozu ve sükrozu fermente eder. Lakin gaz ve H₂S oluşumuna neden olmaz Bakteri üreaz negatif oluşu ile *Actinobacillus* cinsi türlerinin birçoğundan, mannitol-pozitif oluşu ile de *Haemophilus* cinsi türlerinin birçoğundan ayrılır. Mannitol, glikoz, maltoz, sorbitol ve sukroz, gaz üretimi olmaksızın *M. haemolytica*'nın tüm suşları tarafından fermente edilirler. İndol, üreaz ve Voges-Proskauer biyokimyasal reaksiyonları negatiftir ve oksidaz pozitifdir (Tablo 2.3.) (14).

Tablo 2.3. *M. haemolytica*' nın biyokimyasal testleri ve identifikasyon ölçütleri (14)

Biyokimyasal Özellikler		<i>M. haemolytica</i>
Oksidaz		+
β hemoliz		+
Mac Conkey Agarda Üreme		+
Hareket		-
Üre		-
İndol		-
Nitrat		+
Üreaz		-
TSI Agarda	Glukoz	+
	Sukroz	+
	Laktoz	+
	H ₂ S	-
Ornitin dekarboksilaz		+
Maltoz		+
Arabidoz		+
Trehaloz		-
Mannitol		+

Bakterinin ilk başarılı serotiplendirilmesi Biberstein ve arkadaşları tarafından indirekt hemaglutinasyon testi ile gerçekleştirilmiştir. Bu tiplendirmeye temel olan tip özgül yapıların eriyebilir ve çıkartılabilir nitelikte olduğu bildirilmiştir. Bunu takiben Smith de *M. haemolytica* suşlarını biyokimyasal özelliklerine ve çeşitli hastalık tablolarındaki dağılımlarına göre iki farklı biyotipe ayırmış ve arabinozu fermente eden *M. haemolytica* suşları A, trehalozu fermente eden *M. haemolytica* suşları ise T biyotip olarak adlandırmıştır (Tablo 2.4.) (13).

Tablo 2.4. *M. haemolytica* suşlarının karbonhidrat fermantasyonuna göre biyotiplendirme kriterleri

Karbonhidratlar	Biyotip A	Biyotip T
L-Arabinoz	+	-
Trehaloz	-	-
D-Ksiloz	+	-
Salisin	-	+

M. haemolytica kapsül antijenlere göre 17 serotipe ayrılmıştır. A serotipleri A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 ve A17; T serotipleri T3, T4, T10 ve T15

olarak belirlenmiştir. A11 serotipi *M. glucosida* olarak yeni bir tür olarak tanınırken T serotipleri *Bibersteinia trehalosi* cinsi altında toplanmıştır. *M. haemolytica* ve *M. glucosida* türleri dışında *M. ruminalis*, *M. granulomatis* ve *M. varigena* olarak adlandırılan yeni türler de bulunmaktadır. Bu yeni türler *Actinobacillus* cinsi ile (özellikle *A. lignieresii*) yakın akrabalık göstermektedir (15, 16).

M. haemolytica'nın 12 kapsüler serotipinden A1 ve A2'nin tüm dünyada yaygın olduğu ve her ikisinin de sığır ve koyunların üst solunum yollarında kolonize olduğu belirtilmiştir. Hastalığın etyolojisinde A6, A7, A9 ve A12 gibi diğer serotipler bildirilse de, sığır manheimiozisinin en önemli etkeni A1 olarak kabul edilmektedir. Araştırmalar solunum sistemi hastalığı olan bireylerde serotip 1'in %70,7 oranında bulunduğu bildirilmektedir (17,18). Sağlıklı sığırlar sıklıkla üst solunum kanalında her iki serotipi taşımaya rağmen, takip eden stres veya hasta hayvanlardan horizontal bulaşma ile A2'nin yerini öncelikli serotip olarak A1 alır. Hastalığın en ağır formlarının başlıca nedeninin A1 serotipi olduğu bildirilmektedir. Nasofarengeal bölgenin selektif olarak A1 serotipi ile kolonizasyonu manheimiosis başlaması için ön koşuldur. Bu durumun sonucunda, bakteri içeren hava damlacıklarının trachea ve akciğerlere inhalale edilmesi hastalığın başlamasına katkıda bulunur (19).

Davies ve arkadaşları (20), A1 ve A6 serotipinin sığır pnömonik manheimiozisinin hemen hemen tüm vakalarının sebebi olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte her serotipdeki kapsül yapısından ayrı olarak, lipopolisakarit yapıları ve dış membran proteinleri (OMP) baz alındığında A1 ve A6 serotiplerinin son derece benzer olduğu görülmüştür.

M. haemolytica sağlıklı sığırlarda kommensal bir mikroorganizma şeklinde nazofarinks ve tonsillerde yaşamını sürdürür ve konakçısı ile simbiyotik bir ilişkisi bulunur. Ancak süttten kesilme, kötü hava şartları, hayvan transferleri, beslenme değişikliği, sürüye yeni katılımlar gibi stres oluşturan olgular sırasında bakteri üst solunum yolunda artış gösterir. *M. haemolytica* infeksiyonlarının patogeneğinde virüsler (Parainfluenza virüs 3, Bovine herpes virüs 1, Bovine respiratory sinsityal virüs) ve diğer bazı bakteriler de (*Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis*, *Trueperella pyogenes*) rol oynar (4). Bu faktörlerin tümü üst solunum yolu kanalı epitelyumunda A1 serotipinin çoğalarak kolonize olmasına ve bakteri içeren aerosollerin inhalasyonuna neden olarak etkenin nazofarinksden trachea ve akciğerlere inmesini sağlar ve akciğerlerde bronko-

alveolar pnömoniye sebep olur (17, 18). Klinik olarak depresyon, yüksek ateş, nabızda artış, önemli derecede kilo kaybı, mukopurulent nazal akıntı ve öksürük gibi bulgular gözlemlenebilir (7).

SSHK ile ilgili çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Houghton ve Gourlay (21), pnömonili sığır akciğerlerinden % 30,0 oranında *M. haemolytica*'yı ve % 3,0 oranında *P. multocida*'yı izole etmişlerdir. Bir diğer çalışmada Allan ve ark. (22) , pnömoni nedeniyle ölen veya kesilen buzağuların, akciğerlerinden % 73,0 oranında *M. haemolytica*, % 15,8 oranında ise *P. multocida* izole etmişlerdir.

Tegtmeier ve ark. (23), Danimarka'da, bronkopnömoni ve pnömoni vakası gösteren hastalıklı buzağular üzerinde yapmış oldukları çalışmada topladıkları 72 örnekte 35 adet bakteriyel patojen izole etmişlerdir. Bu bakteriyel patojenler ise; 11 *Histophilus somnus*, 10 *P. multocida*, 9 *Trueperella pyogenes* (*Arcanobacterium pyogenes*), 4 *M. haemolytica*, 2 *Salmonella* Dublin, 2 *Escherichia coli*, 1 *Staphylococcus aureus* ve 1 *Streptococcus uberis* olmak üzere bir dağılım göstermiştir. İnfekte akciğerlerden çoğu yalnızca bir bakteri ile infekteyken 4'ünün hem *P. multocida* hem de *A. pyogenes* ile birinin ise *H. somnus* ve *S. Dublin* ile birlikte 2 tür bakteri barındırmakta olduğu saptanmıştır.

Erdağ ve ark. (24), ölümcül seyreden buzağı pnömonilerinden izole edilen bakteriyel etkenler içinde *M. haemolytica*'nın %75 lik oranı ile ilk sırada yer aldığını bildirmektedirler. Erdağ ve ark. (24), tarafından Trakya ve Marmara bölgesinde pnömonili buzağı akciğerlerinden bakteriyolojik inceleme sonucu %70 *M. haemolytica*, %4,3 *Streptococcus pneumonia*, %30 *E.coli*, %30 *Corynebacterium pyogenes*, %11,5 *S. aureus* ve %3 *Mycoplasma bovis*'i izole etmişlerdir.

Hazıroğlu ve ark. (25), yayınladığı çalışmada, 1995 Mart ile 1996 Haziran ayları arasında pnömoni lezyonu görülen 100 adet buzağı üzerinde araştırma yapmışlardır. Yürüttükleri çalışmada lezyonlu akciğerlerden 42'sinde *M. haemolytica*, 8'inde *P. multocida* ve 10 adedinde de *H. somnus* bakteriyel etkenlerini, vakaların 7'sinde hem *M. haemolytica* hem de *H. somnus*' u, 2'sinde ise hem *M. haemolytica* hem de *P. multocida*'yı izole ederek kayıt altına almışlardır. 1997 yılında Hazıroğlu' nun yapmış olduğu çalışmada ise % 48,0 *M. haemolytica* ve % 8,0 *P. multocida* izole edilmiştir.

Özkan ve ark. (26), Kars yöresi sığırlarında yaptıkları epidemiyolojik bir çalışmada, pnömoni vakalarının buzağularda daha ölümcül seyrettiğini ve infeksiyonda

etiyojik olarak *M. haemolytica*, *Streptococcus pneumonia*, *Mycoplasma spp.* izole ettiklerini, bakteriyel izolasyon yapılamayan olgularda ise viral etkenlerin rol oynayabileceğini ifade etmektedir.

Al-Ghamdi ve ark. (27), *M. haemolytica* biyotip A'nın pnömonik pastörellozun pato-fizyolojik bozukluklar ile klinik belirtilerinin oluşmasından sorumlu birincil bakteriyel ajan olduğunu kaydetmişlerdir.

2.2.1. *M. haemolytica* Virülans Faktörleri

Etkenin tüm genom sekansının yapılması ile hastalığın patogenezi ve mücadelesinde kullanılacak araçlar ve bakterinin virülans faktörleri hakkında detaylı bilgilere ulaşılmıştır (5, 28).

M. haemolytica, hastalığın patogenezinde önemli rol üstlenen birçok virülans faktörüne sahiptir. Bunlar konak savunmasını atlatıp hastalığın yerleşmesine ortam sağlar (29). *M. haemolytica*'nın potansiyel virülans faktörleri arasında lökotosin (Lkt), Lipopolisakkarit (LPS) dış membran proteinleri (outer membran proteins, OMP), kapsüler polisakkaritler, adhesinler, fimbriae, lipoproteins, neuraminidaz, süperoksit dizmutaz (metallo-enzim), sialoglikoproteaz ve transferrin bağlayıcı proteinler sayılabilir (18, 30). Ayrıca son zamanlarda *M. haemolytica* için yukarıda sayılan bu virülans faktörleri koordineli bir şekilde regüle eden bir *quorum sensing* (nisap algılama) sistemi tanımlanmıştır (31).

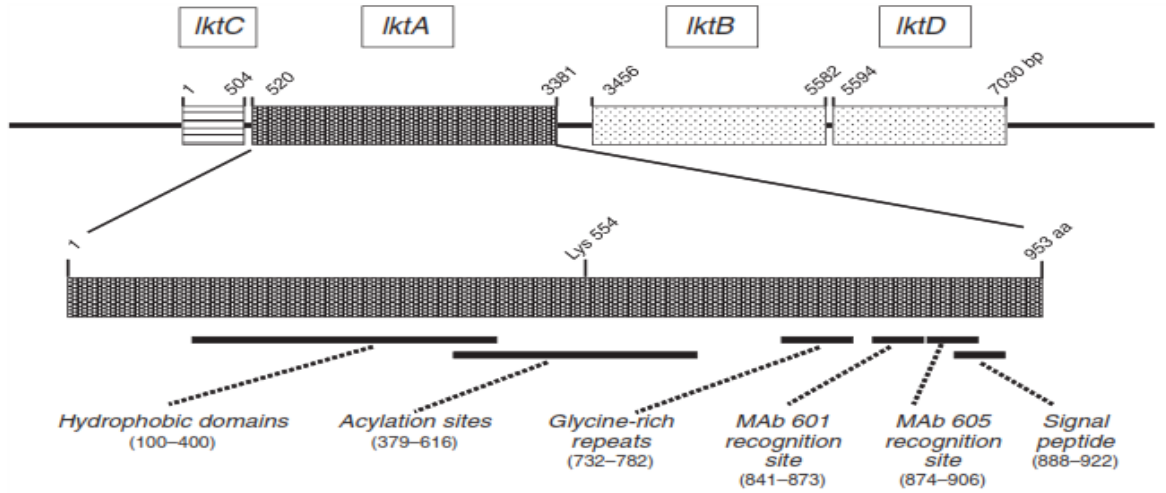
Bunlardan Lkt pnömoninin gelişmesinde en önemli role sahiptir. Lkt-aracılı infiltrasyon ve nötrofillerin ve diğer lökositlerin yıkımı bakterilerin yok edilme mekanizmasını bozmakta ve yıkım sonucu açığa çıkan lizosomal enzimler, araşidonik asit metabolitleri, nitrik oksid ve diğer serbest radikaller pulmoner parankim dokusuna yayılmakta ve Mannheimiosis için tipik olan fibrinöz ve nekrotizan bronkopnömoniye yol açmaktadır. LPS Lkt ile sinerjistik olarak etki ederek etkisini ve endotoksik aktivitesini artırmaktadır (17, 29).

Lökotosin (Lkt)

Lkt, 102-105 kDa'lık bir *M. haemolytica* ekzotoksinidir ve logaritmik üreme fazında bakterinin tüm serotipleri tarafından salgılanır. *M. haemolytica*'nın önemli bir

patogenez faktörüdür ve tüm lökositlerin parçalanmasına neden olur. Günümüzde Lkt keşfinden sonra Lkt'in kendisini ve hastalığın patogeneziindeki işlevi etrafında yoğunlaşan çok sayıda araştırma yapılmıştır. Lökotoksin bir ekzotoksindir ve tekrarlayan toksinler toksin familyasının bir üyesidir. Bu toksinler genetik olarak birbirleri ile ilişkilidir ve Lkt protein molekülünün karboksit terminal ucunun son üçte birinde glisin ve aspartik asit nonapeptid tekrarlarından oluşan son derece korunmalı bir motif bölgesine sahiptirler. Bu glisin ve aspartat bakımından zengin korunmalı motifler toksisitenin uyarılması için gereklidir (17, 32).

Lkt gen kompleksinin genetik organizasyonu yukarıda sınırlandırılmış olmuş lkt A ve lkt C, kompleksin aşağısında yer almış lkt B ve lkt D olmak üzere 4 genden oluşur. Lkt B ve lkt D gen ürünleri Lkt A 'nin bakteri sitoplasmasından dış ortama naklinde rol oynarlar. Lkt A reseptör bağlama, por oluşturma ve kalsiyum bağlama işlemlerinden sorumlu domainler içerir. Lkt A'nın yapısal gen ürünü biyolojik olarak inaktif bir protoksindir. Lkt C geni bu protoksini translasyon sonrası modifiye ederek biyolojik olarak aktif Lkt A'ya dönüştürür. Bu süreç sırasında, Lkt A üzerindeki lizin residülerine yağ asit grupları eklenir ve molekülün hidrofobisitesini artırır. Bu durum da Lkt A'nın konakçı hücrelerine girmesine ve transmembran porları açmasına katkıda bulunur. Bu porların çapı 0.001-0.002µm çapındadırlar ve hücre içi K^+ iyonunun konakçı hücre içinden dışarıya hızlıca kaybına, Na^+ moleküllerinin internalizasyonuna neden olarak kolloid-ozmotik dengesizlikler yaratırlar. Sonuç olarak su molekülleri bu dengesizliği gidermek için hücre içine girerek hızlıca hücre şişmesine neden olurlar. Bu modifikasyon kalsiyumun kontrolsüz olarak transmembran akışına neden olarak hücre içi kalsiyum iyon konsantrasyonunu artırır ve hücre iskelet yapısının bozulmasına neden olur. Bu değişimlerin sonucu olarak hücre membranı parçalanır ve takiben lökositlerin sitolizi gerçekleşir. Kalsiyumun sitolizisteki önemi kritiktir. Hücre içi kalsiyum iyonlarının kalsiyum şelatör ile kaldırılması sitolitik etkiyi önlemiştir. Benzer bir şekilde sığır lösemi hücre hattına (BL-3) kalsiyum iyonlarının katılması sitolizi tekrar oluşturmuştur. Molekülün N terminal bölgesi konakçı hücre membranının ayrılması ve hidrofilik por oluşumu ile ilgili iken karboksiterminal bölgesi glisin ve aspartattan zengin tekrarları ve nötralize edici epitoplara içerir (17, 33).



Şekil 2.1. *M. haemolytica* LktA ve fonksiyonel alanları (29)

Bağışıklık sistemi aktivasyonu açısından konakçının maruz kaldığı Lkt konsantrasyonu önemlidir. Bu bağlamda Lkt, sığır lökositleri üzerinde tür spesifik ve doza bağımlı bir etki mekanizması oluşturur. Tüm *M. haemolytica* suşları Lkt üretmesine rağmen, aralarında üretilen Lkt miktarı ve aktivitesi ile ilgili farklar mevcuttur (18, 34). Az miktarda Lkt, nötrofilleri ve makrofajları oksidatif patlama, degranulasyon ve TNF α , IL-1 ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini açısından uyarır. Ayrıca mitojen aracılı lenfoid proliferasyonunu azaltır (33, 35). Yüksek konsantrasyonlarda, Lkt bazı mekanizmalar ile sığır lökositlerinin apoptozise uğramalarını sağlar. En yüksek konsantrasyonlarında ise, Lkt yarattığı transmembran porlar ile hücrelerin şişmesine ve sonrasında nekrozuna (onkotik hücre ölümü) neden olur (17, 36, 37). Onkotik hücre nekrozu hücre içindeki ürünlerin (solunumsal patlama ürünleri, lizosomal enzimler, nitrik oksit, lökotrienler vb.) pulmoner parankimaya sızmasına pulmoner hasara yol açar. Dolayısı ile Lkt hastalıkta şekillenen pulmoner nekrozun ve yangının anahtar molekülüdür. Lökotoksin etkileri ruminant lökositleri, makrofajları ve trombositleri için spesifiktir. Bu tür özgüllüğü lökotoksinin konakçı hedef hücreleri üzerinde bulunan β_2 integrin Lenfosit fonksiyon ilişkili antijen 1 (LFA-1);CD11a/CD18 etkileşiminden kaynaklanır. Integrinlerin birçok hücre tipleri üzerinde salgılanmasına karşın β_2 alt tipi özellikle lökositler (T lenfosit, nötrofil, monosit, makrofaj ve dendritik hücre vb) üzerinde bulunur (17, 31). Lökotoksine doğal ya da deneysel yol ile maruz kalan sığır ve koyunlarda lkt'a karşı gelişen antikorların hastalığa karşı bağışıklık ile ilişkili olduğu

gösterilmiştir. Sığır ve koyunlardaki *M. haemolytica* suşlarının çoğu lkt üretmesine rağmen bu suşların hepsi eşit miktarda lkt üretmezler ve benzer lökotosik aktivite göstermezler. *M. haemolytica*'nın farklı serotiplerinin farklı tipte lkt oluşturduğu saptanmıştır. Ayrıca üretilen lkt miktarı değişkendir ve dolayısı ile hastalığın patogenezi salgılanan Lkt miktarı ile doğrusal orantılıdır (38, 39).

M. haemolytica'nın virülans için Lkt'in önemi fark edildikten sonra *M. haemolytica* A1 kültür süpernatantı, mannheimiosa karşı aşılama için kullanılmaya başlanmıştır (18).

Lipopolisakkarit (LPS)

LPS Mannheimiosisin patogenezinde kritik öneme sahip bir virülans faktörüdür. Son çalışmalar LPS'nin çeşitli kompleks mekanizmalar ile pulmoner lezyonlara katkıda bulunduğunu göstermektedir. LPS sitokin üretimini sağlamak için lökosit uyarımı, kompleman aktivasyonu ve hücre lizisinin uyarılmasını içeren çeşitli mekanizmalara sahiptir (40, 41). LPS alveolar makrofajlardan yangisel sitokinleri, reaktif nitrojen ve oksijen bileşiklerin salınmasını sağlayarak akciğerlerde yangıyı başlatır. Önceki ve ön çalışmalar, LPS enjeksiyonunun intravenöz hipotansif şoka yol açtığını düşündürmektedir (42). Ek olarak, Lkt ve LPS'nin kimerik karışımı, birbirlerinin patojenitesini arttırmak için sinerjik olarak birlikte çalışmaktadır. Yapılan çalışmalar sığır alveolar makrofajların LPS ve Lkt ile simultane olarak uyarıldığında daha çok TNF α ve IL-8 salgıladıklarını göstermiştir. Bu iki molekül birbirleri ile fiziksel olarak etkileşim halindedir ve Lkt olmadan saf olarak LPS molekülünü purifiye etmek oldukça zordur (28). LPS, yangıda aktif olarak rol oynayan proinflamatuvar sitokinleri, reaktif oksijen bileşikleri, reaktif nitrojen bileşikleri ve diğer aracı molekülleri salgılatmak için alveolar makrofajları uyarır. Bu bileşiklerden bazıları IL-1 β , lökotrien 4, prostaglandin E2, IL8, ve TNF α gibi sitokinlerdir. LPS güçlü bir vasodilatördür. Damardan sızma ile uyumlu olarak akciğer epitel hücrelerinde değişiklik meydana getirir. Pulmoner epitele direkt toksik etkisi vardır ve nötrofillerin toplanmasına yol açarak pulmoner hasar meydana getirir. LPS'nin toksisitesi akciğer surfektanında bulunan fosfolipidlerle kompleks yapması ile artar ve LPS akciğerde persiste kalarak yangıyı başlatmış olur. LPS'nin etkisi Lkt gibi doza bağımlı bir etki gösterir. Az dozda LPS nötrofillerin fagositik kabiliyetini

azaltır yüksek dozda ise artırır. Orta dozda ise mononükleer hücreler için mitojenik bir etkiye sahiptir (17).

Kapsüler polisakkarit

Kapsüler polisakkarit antijen tiplendirmesine göre *M. haemolytica*'nın 12 serotipi bulunmaktadır (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16, A17). Üremenin log fazında kapsüllenme iyi derecede iken lag fazında ise oldukça azdır. Kapsüler polisakkariti *M. haemolytica* 'nın, β 1-4 bağı ile bağlı *N* asetimannozaminüronik asit (ManNAcA) ve *N*-asetilmannozamin'in (ManNAc) oluşturduğu disakkaritin tekrarlamasından meydana gelir ve patogeneizde farklı mekanizmalar ile önemli rol oynar (33, 35). Kapsüler polisakkarit solunum sisteminde *M. haemolytica* 'nın adhezyonunu ve kolonizasyonunu kolaylaştırır. Nötrofillerin bakterisit ve fagositik hareketlerinin elimine edilmesi yanı sıra bileşenleri vasıtası ile lizisin inhibisyonunda kilit görev üstlenerek bakterinin ölmesinin önüne geçen bir virülans faktörüdür. Kapsüler polisakkaritin antijenik özelliğini kültür şartlarında gösterdiği ve konaktaki büyüme boyunca üretilen kapsüler polisakkaritin koruyucu immun cevabı uyardığını tespit edilmiştir (36).

Yüzey Proteinleri ve Karbonhidratlar

Hastalığın gelişimi ve hastalığın ilerlemesi sırasında bakterinin epitel yüzeye adezyonu ve proliferasyonu hastalığın temel ön şartıdır. De la Mora ve ark. (43), infekte olmuş konakçının nazofarenksinden alınan örnekten hazırlanan inokulumun in vitro hücre kültürüne verilmesi sonucunda 68 kDa olan adhezif proteini göstermiştir. Ayrıca nötrofiller, *M. haemolytica* adhesin proteinlerinin bağlanabileceği glikoprotein reseptörü taşımaktadır. Bu bağlanma, oksidatif strese ve patlamaya neden olan nötrofilleri uyarır. Retzer ve ark. (44), yayınladıkları çalışmada, demir elde etmede (TbpA ve TbpB) işlev gören *M. haemolytica* dış zar proteinlerinin muhtemelen bir yapışma molekülü olarak işlev gördüğünü belirtmiştir.

M. haemolytica 'nın immun cevaptan korunmasını sağlayan önemli yüzey antijenleri dış membran proteinleridir. *M. haemolytica* 'nın dış membran proteinlerine karşı oluşan antikor cevabı deneysel infeksiyonlarda, komplement aracılı öldürmeve reseptör aracılı fagositoz ile orantılıdır (45). Yapılan çalışmada, proteaz muamelesi ve Western blotting tekniği ile 21 immunojenik dış membran proteinini tanımlanmıştır.

M. haemolytica in-vivo ortamda akciğer dokusunda 32 kDa büyüklüğünde OmpA, 35 kDa büyüklüğünde PomB, 38 kDa büyüklüğünde yüzey lipoproteini ve demir bağlayıcı OMP'ler gibi dış membran proteinleri üretir (46).

M. haemolytica'nın bu proteinin *Escherichia coli* OmpA ile benzer olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (46). Bunun yanında enfeksiyona karşı dirençte 86, 66, 49 kDa'luk Omp'lerin de etkili antikor yanıtı yarattığı gözlenmiştir (47). Bunun yanı sıra yapılan çalışmalarda, üç büyük demir bağlayıcı dış membran proteini (IROMPs) identifiye edilerek *M. haemolytica*'nın demir kısıtlı ortamlarda da kolayca ürediği bulunmuştur. Proteinlerden 77 kDa ağırlığındaki proteinin fonksiyonu tam olarak bilinmemekte, diğer iki demir bağlayıcı protein ise Tbp1 ve Tbp2 olarak tanımlanmaktadır. Bu demir bağlayıcı proteinler nötrofil fonksiyonları ve fagositozun inhibe edilmesi için etkili faktörlerdir (25, 48). Iovane ve ark. (49), OMP'lerin kemotaksis ile nötrofilleri çekebileceğini ve bu yolla patojenik ajanın üst solunum yollarında kolayca kolonize olabileceğini ve nötrofillerin fagositoz kabiliyetini bozduğunu göstermiştir.

Fimbria

Adezin – konak reseptör ilişkileri *M. haemolytica*'da serotipe göre farklılık gösterebilir. *M. haemolytica* en az 2 farklı tip fimbriaya sahiptir. Bunlardan biri 12 nm çapında sert yapılı diğeri ise 5 nm çapında esnek yapılıdır. Yapılan çalışmalarda büyük çaplı fimbria pürifiye edilmiş ve bunun 35 kDa ağırlığında bir alt üniteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular virülant *M. haemolytica*'nın kolonizasyonunu sağlayan adezyon faktörlerine sahip olduğunu gösterir. *M. haemolytica* ayrıca adezin adı verilen 68 kDa ağırlığında, SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat/Poliakrilamid Jel Elektroforez) ile belirlenebilen, adezyonda görev alan bir proteine sahiptir. (29, 37).

Nörominidaz

Nöraminidaz enzimi de *M. haemolytica*'nın virülans faktörlerinden biri olup termolabil ekstrasellüler bir enzimdir. Bakterinin sabit büyüme fazı boyunca maksimum olarak üretilir (50). Fakat nöraminidaz enzimi üretimi *M. haemolytica*'nın serotiplerine göre farklılık göstermektedir ve bazı serotipleri bu enzimi üretirken bazıları ise üretmemektedir (51, 52).

Nöraminidaz aktivitesinin muhtemel mekanizmalarından biri, tükürük glikoproteinlerinden sialik asit yapısını bağlaması ve ağ yapısını azaltması sonucu bakterinin hücre yüzeyine daha yakın olması ve bakterinin hayatta kalmasıdır (25, 50). Farklı bir mekanizma ise solunum yolu mukusunun vizikositesini azaltması ve böylece mukosilyal örtünün etkinliğinin azalması sonucu bakterilerin solunum epitelyumunun daha derinine yerleşim gösterebilmesidir (34).

Proteaz

M. haemolytica ile ilişkili birkaç farklı proteaz da tanımlanmıştır. Birkaçının doğal ve adaptif bağışıklıklara dâhil olduğu gösterilmiş ve böylece akciğer kolonizasyonunu ve hastalığın oluşmasına yol açtığı belirtilmiştir. *M. haemolytica*' ya karşı savunma mekanizması olarak, hem IgG1 hem de IgG2'nin önemli olduğuna inanılmaktadır. IgG1, *M. haemolytica* kültür süpernatantından elde edilen bir glikoproteaz ile hidrolize edilebilir, bu nedenle opsonizasyonda azalma görülür. Proteazlar ayrıca selektif olarak konakçı mukozal sialoglikoproteinleri parçalarlar. Rekombinant glikoproteaz ve Lkt kombinasyonu ile buzağuların aşılama durumunda hastalığa karşı koruma gözlenmiştir (53).

2.2.2. *M. haemolytica*'nın Üreme ve Lökotoksin Salgılaşma Özellikleri

M. haemolytica üremek için besin maddelerine olan gereksinimi açısından nazlı bir bakteri olarak kabul edilmektedir. Sıvı besiyerinde *M. haemolytica*'nın üremesi ortamın asitliğini artırmaktadır (9). Öyleki üretilen asetik asit bazen üretilen biyokütlenin üzerine çıkmaktadır. Besiyerindeki karbonun büyük kısmı asetik asit birikimine yol açtığı için karbon sınırlı besiyerlerinin bu yüzden biyokütlenin artışına neden olurken asetik asit üretimini sınırladığı ve lökotoksin üretimini artırdığı bildirilmektedir (54). Lkt üretimi üzerine besin maddelerinin etkisine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bakterinin üretimi için en yaygın olarak kullanılan besiyerleri içine sıklıkla sığır fetal serum veya albümin katılan Brain heart infüzyon broth (BHIB) ve RPMI 1640 besiyerleridir. Ancak katılan bu supplementlerin lkt üzerine bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (34, 55). Du perez ve ark. (56), yaptığı bir çalışmada karbonun sınırlandırıldığı vasatların kullanımı lökotoksin konsantrasyonunu maksimize ederken

asetik asit üretimini minimize etmiştir. Genel olarak kabul edilen görüşe göre bakterilerin in vitro ortamlarda ürerken eksprese ettikleri antijenler in vivo ürerken gösterdiklerinden bir hayli farklıdır. Örneğin bazı virülans faktörleri standard laboratuvar besiyerinde salgılanmazken, konakçı içinde ürerlerken ya da demir kısıtlayıcı invitro besiyerlerinde eksprese edilebilirler (57).

Odendaal ve Ellis (58), lökotoksinin fazla miktarda üretilmesinde *M. haemolytica*'yı fermentörde %3,5 fetal buzağı serum içeren RPMI 1640 besiyerinde üretmişler ve yüksek düzeyde toksin ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu sonuçları ile aşı üretimi için bu yöntemin kullanılmasını tavsiye etmişlerdir.

Davies ve ark. (59), besiyerine katılan EDDA, desferal, ovine and bovine transferrin gibi demir şelatörlerinin varlığında bakterinin üremesinin azaldığı bildirilmiştir. Araştırmacılar BHIB besiyerine fetal veya sığır serumu kattıklarında oluşan OMP profillerinin, şelatörlerin katıldığı BHIB besiyerinde oluşan OMP'lerden farklı olduğunu bildirmişlerdir.

2.3. Teşhis Tedavi Kontrol

Solunum sistemi hastalıkları kolayca tanısı yapılabilecek hastalıklardır. Etkin tedavi uygulayabilmek için ise etiyolojik tanımlamanın yapılabilmesi gerekmektedir. Bakteriyel kökenli hastalıkların teşhisi başlıca kültür ve serolojik testler ile yapılmaktadır. En güvenilir teşhis metodu kültürdür. Lakin uzun süre sürmesi, kontaminasyon problemi, saf kültür elde etmenin kolay olmaması gibi bir takım dezavantajları mevcuttur (5).

Antibiyotikler hayvancılık işletmelerinde gerek profilaktik ve gerekse tedavi amacı ile yoğun olarak kullanılmaktadır. Ancak etkinlikleri tedavi rejimindeki ve tanıdaki sebep olduğu istikrarsızlık ve gelişen antibiyotik dirençliği yüzünden değişkendir.

Hastalıklı hayvanlara müdahale etmek ve koruyucu sonuçların iyileştirilebilmesi için tedavinin sonuçlarını değerlendirmek için hastalığın doğru teşhisi büyük önem taşımaktadır. Hastalık sürecine katkıda bulunan birçok faktör vardır ve genellikle tek belirti veya patojenik ajanların analizinden ziyade klinik bulguların kombinasyonuna bağlıdır. Hastalık, etkilenen sığırların karkas kalitesi ve büyüme performansını etkiler; Bu nedenle, negatif etkileri azaltmak için kesin teşhis ve müteakip tedavi hayati önem taşımaktadır (60).

Solunum yolu hastalığına sahip hayvanlarda farklı klinik bulgular olduğu gerçeğinden dolayı, hastalığa karşı ilaçlar çoğunlukla semptomatiktir. Hastalığın ilerleyen aşamalarında akciğer lezyonları gaz alışverişini engeller ve nefes almayı engeller. Non-steroid anti-inflamatuvar ilaçların, alveoler gaz değişiminde zararlı olan inflamatuvar mediatörlerin üretimini ve etkilerini engellediği bildirilmiştir (61).

2.4. Aşı Çalışmaları

Mannheimiosis en ağır formlarının başlıca nedeninin A1 serotipi olduğu bildirilmektedir. Dolayısı ile A1 serotip infeksiyonunun kontrolünün hastalığın prevalans ve ciddiyetini önemli ölçüde düşüreceğine inanılmaktadır (18). *Pasteurella* infeksiyonuna karşı araştırma yapan bilim insanları çeşitli aşı çalışmaları yapmışlardır. Tucci ve ark. (62), lökotosin A'nın ana virülans faktör olduğunu ve bunun yanında kültür süpernatantında 10 tane daha majör komponent bulduklarını bunların başlıca OMP, periplasmik zar membran transporters ve demir bağlayan proteinler olduğunu bildirmişlerdir.

Kullanılan klasik bakterinlerin değil hayvanda koruma sağlamak aşılı hayvanlarda sıklıkla hastalığın artmasına neden olduğu gösterilmesine rağmen, aşılar onlarca yıldır kullanılmaktadır. Modern aşılar içinde lökotosin ve diğer eriyebilir antijenler olan kültür süpernatantları, bakteriyel ekstraktlar veya bakterinle kombine kültür süpernatantlardan oluşmaktadır. Lkt toksoidi içeren kültür süpernatant aşılar yarattığı güçlü bağışıklık ve serotip spesifikliğin büyük ölçüde olmayışı ile hastalığa karşı anakültür aşılar kadar etkili bulunmuştur. Bu aşılar hastalığın önlenmesinde % 50-70 oranında başarı göstermişlerdir (63). Ancak, kültür süpernatant aşının hazırlanmasında tek dezavantaj lkt'nin in vitro ortamda çok düşük konsantrasyonda salgılanmasıydı (36).

Deneme aşı çalışmalarında bir kısım ürünler *M. haemolytica* etkenini, diğer kısmı ise *M. haemolytica* etkeni ile birlikte *P. multocida*'yı da ihtiva etmektedir. *M. haemolytica* aşıları; canlı aşılar, formolle imha edilip uygun adjuvant ile hazırlanan inaktif aşılar, antijen ekstraktları ve kültür süpernatantları kullanılmıştır (64). *M. haemolytica*'nın inaktif aşıları sığırları pnömonik pasteurellosisten koruması tartışmalı olup, canlı aşılarının diğerlerine göre daha koruyucu olduğu savunulmaktadır (64, 65).

Kolostrum almamış 2-4 haftalık buzağuların *M. haemolytica* A1 kültür süpernatantı ile aşılandığı bir çalışmada, tüm buzağular kapsüler polisakkarite ve

lökotoksine karşı kapsüler antijene karşı gelişen Ig M hariç düşük düzeyde antikor titresini oluşturmuşlar. Deneysel epruvasyon sonrası kontrol grubuna göre klinik skorlar, persiste akciğer tutulumu ve hayatta kalma oranına göre daha iyi sonuçlar göstermişlerdir (66).

Confer ve ark. (65), Freund'un Incomplete (FIA), Complete (FCA) ve Al(OH)₃ adjuvantlarını kullanarak yaptıkları aşı çalışmalarında FIA ve FCA' yı daha koruyucu olduğunu savunmaktadırlar. Cameron ve Bester ise FIA ve FCA kadar Al(OH)₃ adjuvantının da yeterli immun cevap oluşturduğunu tespit ettiklerini bildirmişlerdir (64).

Mannheimia haemolytica'nın ekstrakt antijenleri çeşitli metodlarla (tuzlu su, KSCN-Potasyum tiyosiyanat-) elde edilerek aşı kullanılmış olup, araştırmacıların bir kısmı bu aşılama metodunun yeterli koruma sağladığını ileri sürerken, bir kısmı da bu tip antijenlerin yeterli antikor oluşumu sağlamadığı için bu maddeler ile hazırlanan aşılardan koruyucu olmadığını savunmaktadırlar (64, 67).

Confer ve ark. (65), canlı aşılardan ile yaptıkları aşılama çalışmalarında, lökotoksinleri nötralize edici antikorların oluştuğunu, bakteriyel aşılama neticesinde ise bu antikorların az yada hiç oluşmadığını tespit etmişlerdir. Bu nedenle hastalığa karşı direnç gelişiminde hiçbir antijenin tek başına yeterli olamayacağı kanaatine varmışlardır.

Mosier ve ark. (67), *M. haemolytica* serotip A1'in kapsüler karbonhidrat ve protein ekstraktları ile lökotoksinini antijen olarak kullanarak yaptıkları aşı çalışmaları neticesinde, sığırlarda bu antijenlere karşı oluşan antikor yanıtı ile direnç arasında bir korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir.

Srinand ve ark. (68), 3 ticari aşığı koruyuculuk açısından karşılaştırmışlar ve birinci aşının lkt, kapsüler polisakkarit ve yüzeysel antijenlere karşı antikor yanıtı oluşturdukları diğer ikisinin sadece kapsüler polisakkarit ve yüzeysel antijenlere karşı antikor yanıtı ürettiklerini belirtmişler. Sonuçta koruyuculuk açısından birinci aşının diğer ikisinden daha iyi olduğunu ve dha az pnömonik lezyon oluşturduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacıların bulguları lkt'nin koruyucu bağışıklıkta önemini göstermektedir.

M. haemolytica pnömonisi ancak etkili doğru bir teşhis, etkili aşılardan, uygun terapötik yaklaşım ve uygun yönetim uygulamalarının kombinasyonu ile kontrol edilebilir.

Bu çalışmanın temel amacı belirlenen *Mannheimia haemolytica* suşlarının farklı besiyerlerinde üremelerinin ve lökotoksin salgılama düzeylerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Bakteriyel Suşlar

Bu çalışmada kullanılan 3 *Mannheimia haemolytica* suşu hastalık vakasından elde edilmiş ve kontrol suş ise American Type Culture Collection BAA-410 *Mannheimia haemolytica* serotip 1 referans suşudur. Suşların identifikasyonları Tablo 2.3. de belirtilen biyokimyasal testler uygulanmıştır. Çalışma için alınan ‘Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurul Kararı’ 2015/08 nolu kararla ve 23.03.2015 tarihinde alınmıştır (Ek 8.1.).

3.1.2. Suşların Üretilmesinde Kullanılan Besiyerleri ve Hazırlanması

Çalışmada kullanılan tüm besiyerleri ve solusyonların hazırlanması klasik bakteriyel prosedürlere göre yapıldı (9,30).

1)Brain heart infusion broth (BHIB)

Brain Heart Infusion broth	37 g
Distile Su	1 lt

Besiyerinin hazırlanmasında 37 g. BHIB (Oxoid,CM1136) 1 lt distile suda eritildi ve pH 7.2±0.2 ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi.

2)BHIB+%1 Yeast Extract

Brain Heart Infusion broth	37 g
Distile Su	1 lt
Yeast Extract	10 gr
Distile Su	1 lt

Besiyerinin hazırlanmasında 37 g. BHIB (Oxoid,CM1136) ve 10 g. yeast extract 1 lt distile suda eritildi ve pH 7.2±0.2 ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi.

3)BHIB+%5 SERUM

Brain Heart Infusion broth	37 g
Distile Su	1 lt
At Serum	50 ml

Besiyerinin hazırlanmasında 37 g. BHIB (Oxoid,CM1136) 1 lt distile suda eritildi ve pH 7.2±0.2 ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Daha sonra besiyeri 56 °C' ye soğutuldu ve 0,2 µm.lik filtreden süzülerek steril hale getirilen 50 ml at serumu steril şartlarda BHIB besiyerine ilave edildi.

4)RPMI 1640 besi yeri

Calcium nitrate (Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	100.00 mg/L
Potassium chloride (KCl)	400.00 mg/L
Magnesium sulfate (MgSO ₄)	48.84 mg/L
Sodium chloride (NaCl)	6000.00 mg/L
Sodium bicarbonate (NaHCO ₃)	2000.00 mg/L
Sodium Phosphate (Na ₂ HPO ₄)	800.85 mg/L
Glucose	2000.00 mg/L
Glutathione Reduced	1.00 mg/L
Phenol red	5.00 mg/L
L-Arginine	200.00 mg/L
L-Asparagine-H ₂ O	50.00 mg/L
L-Aspartic Acid	20.00 mg/L
L-Cystine	50.00 mg/L
L-Glutamic Acid	20.00 mg/L
L-Glutamine	300.00 mg/L
Glycine	10.00 mg/L
L-Histidine	15.00 mg/L
L-Hydroxyproline	20.00 mg/L
L-Isoleucine	50.00 mg/L
L-Leucine	50.00 mg/L
L-Lysine hydrochloride	40.00 mg/L
L-Methionine	15.00 mg/L
L-Phenylalanine	15.00 mg/L
L-Proline	20.00 mg/L
L-Serine	30.00 mg/L
L-Threonine	20.00 mg/L
L-Tryptophan	5.00 mg/L
L-Tyrosine	20.00 mg/L
L-Valine	20.00 mg/L
Biotin	0.20 mg/L
D-Ca Pantothenate	0.25 mg/L
Choline Chloride	3.00 mg/L
Folic Acid	1.00 mg/L
i-Inositol	35.00 mg/L
Niacinamide	1.00 mg/L
p-Aminobenzoic Acid (PABA)	1.00 mg/L
Pyridoxine HCl	1.00 mg/L
Riboflavin	0.20 mg/L

Thiamine HCl	1.00 mg/L
Vitamin B12	0.005 mg/L

RPMI besiyeri yukarıdaki kimyasal maddeleri içeren şekilde ticari olarak temin edildi.

3.1.3. Testler için Kullanılan Besiyeri ve Solüsyonlar

1) Kanlı Agar

Agar	40 gr
Koyun Kanı	%7
Distile su	1000 ml

Karışımın pH değeri 7,2-7,4' e ayarlanıp, distile su içerisinde agar eriyinceye kadar ısıtıldıktan sonra besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklav ile sterilize edildi. Otoklav sonrası besiyeri 40-45°C'ye soğutuldu. Karışıma steril % 7 defibrine koyun kanı ilave edilerek 12 cm çapındaki petrilere döküldü. Sterilite kontrolleri yapıldıktan sonra kullanıma kadar +4°C saklandı.

2) Mac Conkey Agar

Mac Conkey Agar	50 g
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7.2'ye ayarlanıp, distile su içerisinde agar eridikten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklav sonrası 12 cm çapındaki petrilere döküldü. Sterilite kontrolleri yapıldıktan sonra kullanıma kadar +4°C saklandı.

3)Brain Heart Infusion Agar (BHIA)

Brain Heart Infusion broth	37 g
Agar	15 g
Distile Su	1 lt

37 g. BHIB (Oxoid,CM1136) ve 15 g agar 1 lt distile suda eritildi ve pH 7.2±0.2 ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi.

4) Üre besi ortamı

Temel Besi yeri

Peptone	1.0 g
---------	-------

Glukoz	1.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	2.0 g
Fenol red	0.012 g
Agar	15 g
Distile su	1000.0 ml

Bileşenler damıtık suda çözüldü. Sterilizasyon sonrası pH 6.8 olacak şekilde ayarlanıp 121±1°C de 20 dakika sterilize edildi.

Üre çözeltisi

Üre	400.0 g
Damıtık su	1000.0 ml

Üre suda çözüldürüldükten sonra 0.22 µ luk membran filtreden süzülerek stok solüsyon halinde etiketlenerek +4°C saklandı.

Üre besiyeri

Temel besi yeri	950.0 ml
Üre çözeltisi	50.0 ml

Üre önceden eritilip 45± 1°C ye soğutulmuş temel besi yerine aseptik koşullarda ilave edildi. 10 ml aseptik koşullarda steril deney tüplerine dağıtıldı ve eğik vaziyette katılaşması sağlandı.

5) İndol Test Ortamı

Peptone	4 g
Sodium chloride	2 g
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'ı 7.4-7.6'ya ayarlandıktan ve tüplere 5'er ml dağıtıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi.

6) Nitrat Test Ortamı

Peptone	2 g
KNO ₃	0.2 g
Distile su	1000 ml

Karışım kaynayan benmaride eritildikten sonra 10 ml olacak şekilde tüplere dağıtılıp, 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

3.1.4. ELISA için kullanılan solüsyonlar

1) Pleyt antijen kaplama solusyonu

Sodium hydrogen carbonate	2,93 g
Sodium carbonate	1,59 g
Distile su	1 lt

Hazırlanan solüsyonun pH 9.6 olarak belirlendi ve 121°C’de 20 dakika otoklavda sterilize edildi.

2) Dengeli tuzlu su (PBS):

Di-sodium hydrogen orthophosphate (Na ₂ HPO ₄)	1,4 g
Sodium chloride (NaCl)	7,0 g
Potassium chloride (KCl)	0,2 g
Potassium di-hydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	2 g
Distile su 1000 ml. ye tamamlanır.	

Hazırlanan solüsyonun pH 7.2’ye ayarlandı ve 121°C’de 20 dakika otoklavda sterilize edildi.

3) Bloklama solüsyonu (% 3 BLOTTO)

PBS	500 ml
Milk powder (yağı alınmış)	15 gr
Tween 20	500µl
Sodyum azid (0.02 %)	

4) Yıkama solüsyonu

PBS	1 litre
Tween- 20	1 ml

5) Substrat solüsyonu (fosfat-sitrat buffer, pH 5.0)

0.2M dibazik sodyum sitrat	25.7 ml
0.1 M sitrik asit	24.3 ml

Distile su	50 ml
OPD	0.4 mg/ml
%30 H ₂ O ₂	40µl

3.2. Yöntem

3.2.1. Test Suşlarının Biyokimyasal Testler ile İdentifikasyonu

Test suşları Tablo 2.2.' de belirtilen özellikler yönünden incelendiler. Bu kapsamda üreyen kolonilerden Gram boyaması yapıldı, Kültürlerin MacConkey agarda üreme durumları, kanlı agarda gösterdikleri hemoliz, indol oluşturmaları, oksidaz, üreaz ve katalaz aktiviteleri ve nitratları indirgeyip indirgemedikleri test edildi.

3.2.2. PCR

Çalışmada kullanılan dört suş *M. haemolytica* genomunda CACAG tekrarlayan pentanükleotitlerin bulunduğu Rpt2 lokusu için tasarlanmış olan primerler kullanılarak PCR ile test edildiler (69). Testte Rpt2 forward 5'GTTTGTAAGATATCCCATTT3' ve Rpt2 Reverse 5' CGTTTTCCACTTGCGTGA 3' primerleri kullanıldı. Testte toplam 25 µl'lik çalışma hacmi, 1x PCR buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl [pH8.3], 1.5mM MgCl₂), her bir dNTP'den 0.2 mM, her bir primerden 0.3µM, 2 ünite Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, BR), 25 µL'ye tamamlamak için PCR grade distile su ve 3 µl hedefDNA içerdi. PCR koşulları 95°C'de 3 dakika ön ısıtmayı müteakip 95°C'de 1 dak., primer birleşmesi 48°C'de 1 dak. ve 72°C' de 30 sn olmak üzere 30 siklus halinde gerçekleştirildi. PCR'de amplifiye edilen DNA, agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutuldu. Jel hazırlanırken içine ethidium bromide (0.5 µg/ml) koyuldu. Elektroforez tampon solüsyonu olarak 1x TAE (0.04 M Tris-Acetate; 0. 001 M EDTA [pH 8.0]) kullanıldı ve bir mini jel elektroforez tankında 70 voltta 1 saat süreyle elektroforez işlemi gerçekleştirildi. 100bp DNA Ladder (Qiagen mid pilot DNA ladder) amplikonların fragment büyüklüğünü saptamak için kullanıldı. Daha sonra sonuçlar ultraviyole transilluminatörde değerlendirildi. PCR ürünlerinin jel elektroforezi neticesinde 1022 bp uzunluğundaki bant *M. haemolytica* yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.3. Test Besiyerlerinde Test Suşlarının Üretimi

Mannheimia haemolytica olarak tanımlanan referans suş MH03 ve test suşları MH04/ MH05/ MH06 olarak adlandırıldı. Tespit edilen suşlar BHIA (Brain Heart Infusion Agar) ekilerek ve 37°C de 18 saat üremeye bırakılıp, sonrasında agar yüzeyinden fizyolojik tuzlu su ile toplandı. Suşlar farklı besiyerlerinde üretilerek öncelikle üreme kapasitelerinin besiyeri farklılıkları ile olan ilişkisi test edilmek istendi.

BHIB, BHIB+%1 Yeast Extract, BHIB+%5 Serum ve RPMI besiyerleri seçilen besiyerleri olarak hazırlandı. Hazırlanan bu besiyerlerinin her birine FTS içinde toplanan bakteri solüsyonundan eşit olarak ekildi ve ekilen besiyerleri 24 saat süre ile 37 °C de inkübatörde bir çalkalayıcı üzerinde üremeye bırakıldı. Üremenin 6. , 12. , 15. , 18. , 24. saatlerinde her bir test besiyerinden steril şartlarda 2 ml numune alındı. Sonuçta 4 besiyeri 4 suş kombinasyonundan dolayı toplam 16 numunedan canlılık sayımı gerçekleştirildi. Bunun için her birinde 9 ml FTS bulunan 10 steril tüp alındı. Birinci tüpe alınan test numunesinden 1 ml konuldu ve karıştırıldıktan sonra bu karışımdan 1 ml. alınarak ikinci tüpe aktarıldı. Bu işleme onuncu tüpe kadar aynı şekilde devam edildi. Bu arada 9 adet BHIA petrilere sırasıyla son üç dilüsyonlardan üçer adet olmak üzere 0.1'er ml. ekildi. Ekilen petrilere 96 saat süreyle 37°C'de inkubasyona bırakıldı. Bu süre sonunda petrilereki koloniler ayrı ayrı sayılarak önce her dilüsyonun kendi arasında, sonra üç dilüsyonun ortak aritmetik ortalamaları alınarak 10⁹ üzerinden hesap edildi. Hesap edilen sayı 0.1 ml.'deki bakteri sayısıdır. Bunun 10 ile çarpımı 1 ml'deki bakteri sayısını vermektedir. Canlılık sayımları her bir kombinasyon için iki kez tekrarlanarak ortalaması alındı.

3.2.4. Test Besiyerlerin Kültür Süpernatantlarında Lökotoksin Seviyelerinin Karşılaştırılması

Tüm test besiyerlerinde log fazının sonlarına doğru alınan bakteri kültürleri 5000X g. de 4 °C de 10 dakika süre ile santrifüj edildiler. Santrifüj sonrasında süpernatant solüsyonları 0.22 µm filtre şırıngadan filtre edildiler. Filtre edilen 16 farklı kültür süpernatant solüsyonu bekletilmeden direkt ELISA da solid faz antijeni olarak kullanıldılar.

3.2.5. Direkt ELISA

Gerek zenginleştirilmiş ve gerekse minimal besi yerlerinden elde edilen elde edilen steril kültür filtratlarının her biri 0.05M sodyum karbonat (pH 9.6) antijen kaplama tampon solusyonu içinde sulandırılarak 96 gözlü düz tabanlı polistiren pleytlerin (NUNC 692620) her bir sırasının 11 kuyucuğuna 100 µl olarak taksim edildi. Sıranın 12. kuyucuğu blank olarak bırakıldı. Daha sonra antijenle kaplanan pleytler 4 °C de 18-24 saat inkübe edildi. Daha sonra pleytler % 0.05 Tween 20 içeren PBS (PBS/T) ile 4 kez yıkandı. Pleytler %1 yağsız süt tozunun (Sigma, skim milked) PBS/T içindeki solusyonu ile 2 saat süre ile bloklandılar. Pleytlerin 4 kez yıkanmasının ardından pleytlerin her bir kuyucuğuna Horse radish peroxidase (HRPO) ile işaretlenmiş *M. haemolytica* anti-lökotoksin antikorunun (*Mannheimia haemolytica* leukotoxin antibody-HRPO conjugated (Biorbyt, orb243804)) PBS/T içinde yapılan çalışma dilüsyonunda 100 µl olarak taksim edildi. Pleytler üstü kapalı olarak oda ısısında 1 saat süre ile inkübe edildiler. Pleytler tekrar 5 kez yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa 100 µl kromojenik substrat (0.05 M sitrat tamponu içinde o-Phenylenediamine Dihydrochloride (OPD) 0.4mg/ml, pH 5.5) ilave edildi. Pleytler oda ısısında 10 ila 15 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için stop solusyonu eklendi pleytler otomatik ELISA okuyucusu (VERSAmax 3.13/B2573) ile 490 nm'de absorbans değerleri okundu. Her bir besiyeri/suş kombinasyonunun okunan absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve lökotoksin üretiminin en fazla olduğu besiyeri ve suş kombinasyonları belirlendi.

3.2.6. İstatiksel Analiz

Dört farklı besiyerinin 4 ayrı suş için değerlendirilmesinde çoklu karşılaştırmalarda varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Veriler IBM SPSS Statistics 22.0,2013, release 22.0.0.0 kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Test Suşlarının Biyokimyasal Testler ile İdentifikasyonu

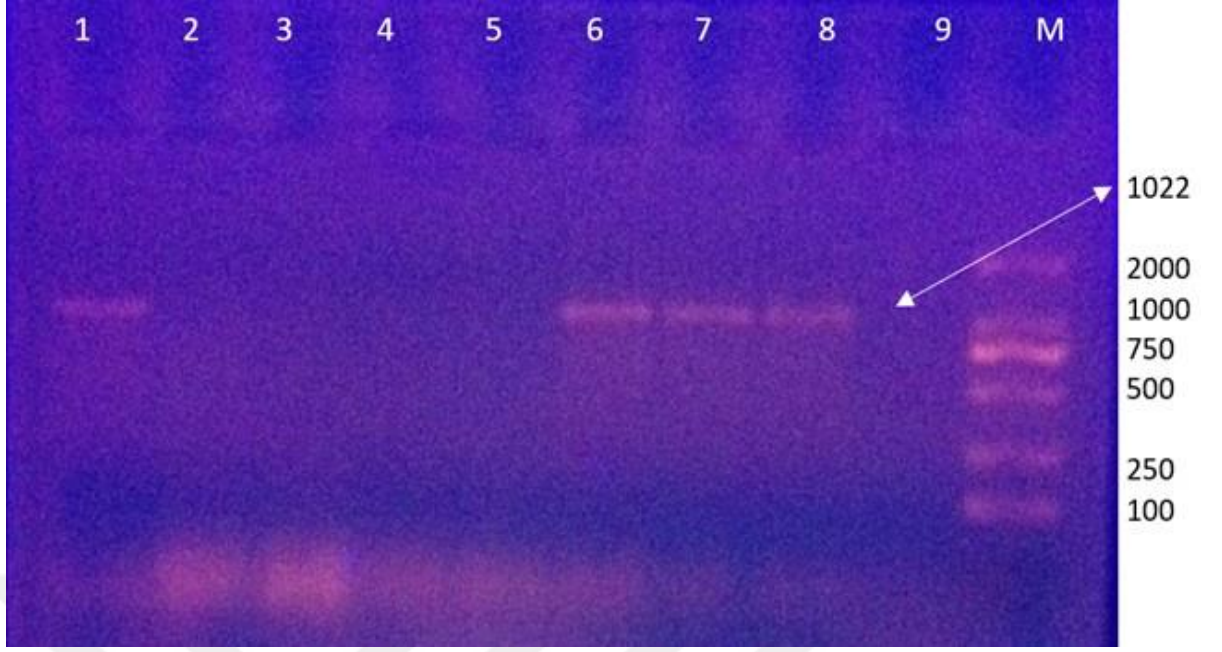
Test suşlarının ve referans *M. haemolytica* suşlarının biyokimyasal test sonuçları Tablo 4.1. de gösterildi. Buna göre kanlı agarda üreyen suşlardan yapılan Gram boyamada tüm suşlar Gram negatif idi ve kanlı agarda hemoliz yaptılar. Tüm suşlar Mac Conkey agarda pembe koloniler oluşturdular. Suların tümü katalaz ve oksidaz testlerinde pozitif sonuç verdiler. İndol oluşturma ve üreaz enzimi varlığı açısından negatiftirler.

Tablo 4.1. Test suşlarının biyokimyasal test sonuçları

Test suşları	Gram Boyama	Hemoliz	İndol	Katalaz	Üreaz	Nitrat	Oksidaz	Mac Conkey üreme
MH03 (ref)	-	+	-	+	-	+	+	+
MH04 (test)	-	+	-	+	-	+	+	+
MH05 (test)	-	+	-	+	-	+	+	+
MH06 (test)	-	+	-	+	-	+	+	+

4.2. PCR

Yapılan PCR testinde tüm suşlar, Referans suşla birlikte 1022 bp lik bir amplikon üreterek tüm suşların *M. haemolytica* olduğu belirlendi (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Kuyucuk 1 *M. haemolytica* referans suşu; Kuyucuk 2-5 *P. multocida* suşları; Kuyucuk 6.MH04; Kuyucuk 7. MH05; Kuyucuk 8 MH06; Kuyucuk 9 Negatif kontrol; M DNA marker

4.3. Test Besiyerlerinde Test Suşlarının Üreme Sonuçları

Dört farklı *Mannheimia haemolytica* suşu 4 farklı besiyerinde üretime tabii tutularak, suşların üreme durumları değerlendirildi. Üretime alınan bakteriler *Mannheimia haemolytica* BAA-410 referans suşu (MH 03), test suşları ise *Mannheimia haemolytica* 04 (MH 04), *Mannheimia haemolytica* 05 (MH 05), *Mannheimia haemolytica* 06 (MH 06) olarak isimlendirildi. Bakterilerin üretim için kullanılan besiyerleri ise BHIB, BHIB+%1 Yeast Extract, BHIB+%5 Serum şeklinde seçildi. Bu besiyerleri ise tablolarda BHIB için 1, BHIB+%1 Yeast Extract için 2, BHIB+%5 Serum için 3 olarak kısaltıldı. RPMI besiyeri için R kısaltması kullanıldı. Test ve referans suşların 1,2,3 nolu besiyerlerinde kültürlerinin 6. 12. 15. 18. ve 24. saatlerindeki canlılık sayımları Tablo 4.2.' da verilmiş ve Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5. ve Şekil 4.6. da gösterilmiştir. Suşların RPMI besiyerindeki canlılık sayımları Tablo 4.3.' de verilmiştir.

Tablo 4.2. ve Tablo 4.3. deki bulgulara göre besiyerlerinin canlı bakteri sayımı üzerine etkileri açısından aralarındaki farklılıklar değerlendirildiğinde, RPMI (4) besiyeri BHIB (1), BHIB+%1 Yeast(2), BHIB+%5(3) besiyerlerinden istatistiki açıdan önemli derecede farklı bulunmuştur ($P<0.001$). BHIB, R besiyerinden istatistiki olarak farklı

bulunurken 2 ve 3 nolu besiyerleri için istatistiki olarak farklı bulunmamıştır ($P>0.05$). BHIB+%1 Yeast besiyeri R besiyerinden istatistiki olarak farklı bulunurken 1 ve 3 nolu besiyerleri için istatistiki olarak farklı bulunmamıştır ($P>0.05$). BHIB+%5 besiyeri R besiyerinden istatistiki olarak farklı bulunurken 1 ve 2 nolu besiyerleri için istatistiki olarak farklı bulunmamıştır ($P>0.05$). Canlılık sayısını en fazla artıran besiyeri BHIB+%5serum besiyeri oldu.

Tablo 4.2. *M. haemolytica* suşlarının farklı besiyerlerinde üreme sonuçları

	6. Saat*	12. Saat	15. Saat	18. Saat	24. Saat
1)MH 03	110x10 ⁶	135x10 ⁶	144x10 ⁶	155,5x10 ⁶	161x10 ⁶
2)MH 03	123,5x10 ⁶	141,5x10 ⁶	161,5x10 ⁶	172x10 ⁶	180,5x10 ⁶
3)MH 03	104,5x10 ⁶	125x10 ⁶	148,5x10 ⁶	155x10 ⁶	196x10 ⁶
1)MH 04	91x10 ⁶	101,5x10 ⁶	113x10 ⁶	125x10 ⁶	142,5x10 ⁶
2)MH 04	98x10 ⁶	149x10 ⁶	163,5x10 ⁶	185x10 ⁶	210x10 ⁶
3)MH 04	188,5x10 ⁶	215x10 ⁶	218x10 ⁶	220,5x10 ⁶	270x10 ⁶
1)MH 05	65x10 ⁶	88,5x10 ⁶	106,5x10 ⁶	135x10 ⁶	176,5x10 ⁶
2)MH 05	120x10 ⁶	134x10 ⁶	153x10 ⁶	167x10 ⁶	218x10 ⁶
3)MH 05	129,5x10 ⁶	142,5x10 ⁶	158,5x10 ⁶	180x10 ⁶	232,5x10 ⁶
1)MH 06	85,5x10 ⁶	117x10 ⁶	148,5x10 ⁶	190x10 ⁶	205x10 ⁶
2)MH 06	141x10 ⁶	178x10 ⁶	194x10 ⁶	225x10 ⁶	290x10 ⁶
3)MH 06	102,5x10 ⁶	136,5x10 ⁶	177,5x10 ⁶	200,5x10 ⁶	275,5x10 ⁶

* Sonuçlar koloni oluşturma birimi(KOB/ml) olarak verilmiştir.

Tablo 4.3. *M. haemolytica* suşlarının RPMI besiyerinde üreme sonuçları

	6. Saat*	12. Saat	15. Saat	18. Saat	24. Saat
R-MH03	32X10 ⁶	43,5X10 ⁶	44,5x10 ⁶	66,5X10 ⁶	82X10 ⁶
R-MH04	20,5X10 ⁶	37,5X10 ⁶	45x10 ⁶	56X10 ⁶	73X10 ⁶
R-MH05	46X10 ⁶	54X10 ⁶	55x10 ⁶	69,5X10 ⁶	83,5X10 ⁶
R-MH06	36X10 ⁶	49,5X10 ⁶	55,5x10 ⁶	66X10 ⁶	78,5X10 ⁶

* Sonuçlar koloni oluşturma birimi(KOB/ml) olarak verilmiştir.

Çalışmada kullanılan suşlar düzeyinde tüm besiyerleri karşılaştırıldığında sonuçlar MH 03, MH 04, MH 05 ve MH 06 suşları için sırası ile Tablo 4.4., Tablo 4.5., Tablo 4.6. ve Tablo 4.7. de gösterildi. MH03, MH04, MH05 ve MH06 suşlarının besiyerlerindeki canlılık sayım sonuçları (üreme özellikleri) açısından aralarında istatistiki olarak bir fark görülmedi (P>0.05).

Tablo 4.4. *M.haemolytica* BAA-410 referens suşunun 4 farklı besiyerinde üreme sonuçları

	6. Saat	12. Saat	15. Saat	18. Saat	24. Saat
1)MH 03	110x10 ⁶	135x10 ⁶	144x10 ⁶	155,5x10 ⁶	161x10 ⁶
2)MH 03	123,5x10 ⁶	141,5x10 ⁶	161,5x10 ⁶	172x10 ⁶	180,5x10 ⁶
3)MH 03	104,5x10 ⁶	125x10 ⁶	148,5x10 ⁶	155x10 ⁶	196x10 ⁶
R-MH03	32X10 ⁶	43,5X10 ⁶	44,5x10 ⁶	66,5X10 ⁶	82X10 ⁶

Tablo 4.5. *M.haemolytica* MH 04 test suşunun 4 farklı besiyerinde üreme sonuçları

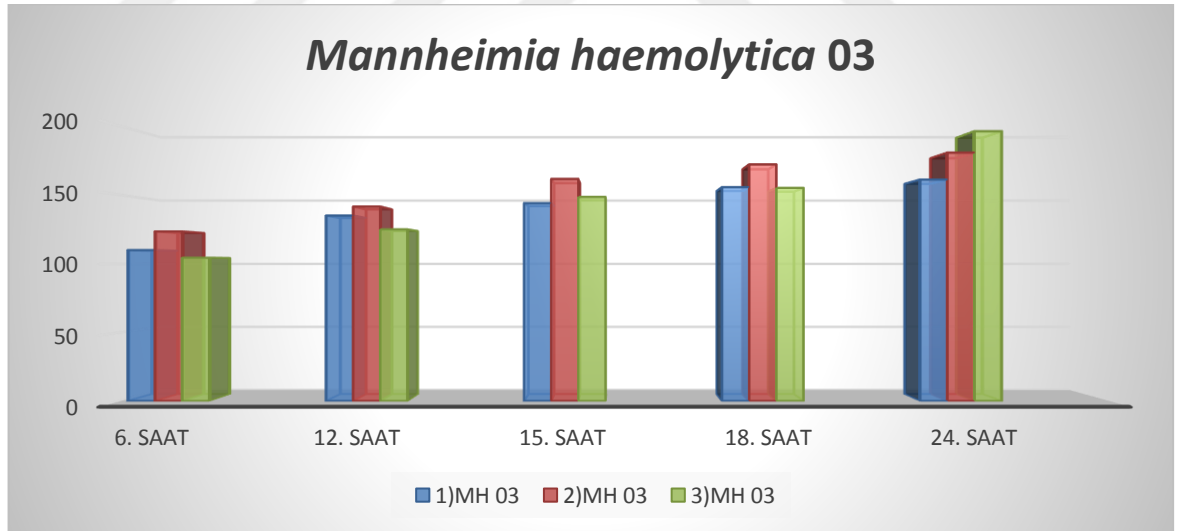
	6. Saat	12. Saat	15. Saat	18. Saat	24. Saat
1)MH 04	91x10 ⁶	101,5x10 ⁶	113x10 ⁶	125x10 ⁶	142,5x10 ⁶
2)MH 04	98x10 ⁶	149x10 ⁶	163,5x10 ⁶	185x10 ⁶	210x10 ⁶
3)MH 04	188,5x10 ⁶	215x10 ⁶	218x10 ⁶	220,5x10 ⁶	270x10 ⁶
R-MH04	20,5X10 ⁶	37,5X10 ⁶	45x10 ⁶	56X10 ⁶	73X10 ⁶

Tablo 4.6. *M.haemolytica* MH 05 test suşunun 4 farklı besiyerinde üreme sonuçları

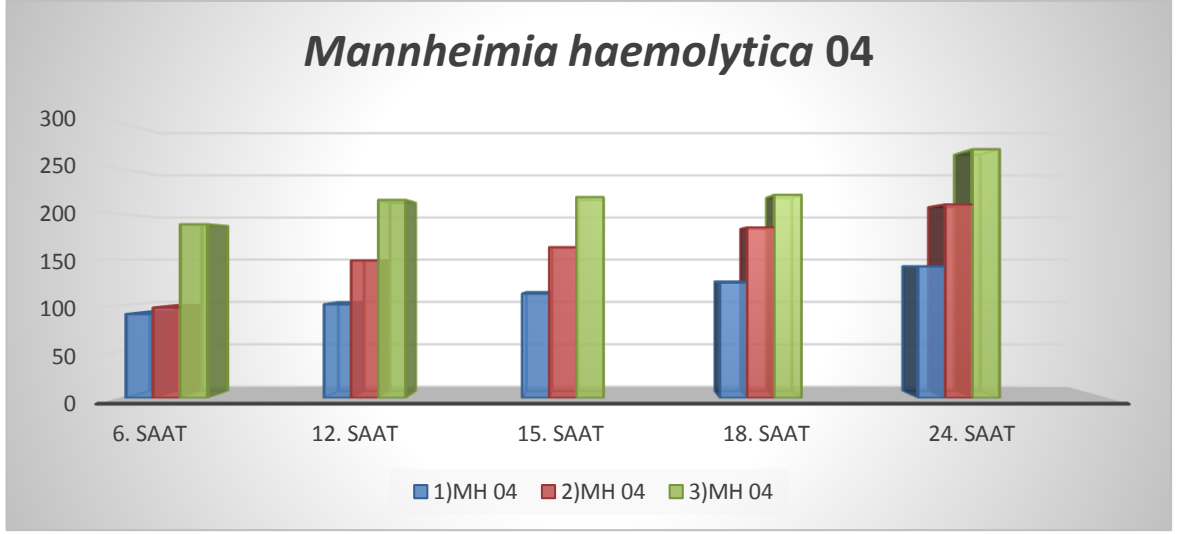
	6. Saat	12. Saat	15. Saat	18. Saat	24. Saat
1)MH 05	65x10 ⁶	88,5x10 ⁶	106,5x10 ⁶	135x10 ⁶	176,5x10 ⁶
2)MH 05	120x10 ⁶	134x10 ⁶	153x10 ⁶	167x10 ⁶	218x10 ⁶
3)MH 05	129,5x10 ⁶	142,5x10 ⁶	158,5x10 ⁶	180x10 ⁶	232,5x10 ⁶
R-MH05	46X10 ⁶	54X10 ⁶	55x10 ⁶	69,5X10 ⁶	83,5X10 ⁶

Tablo 4.7. *M.haemolytica* MH 06 test suşunun 4 farklı besiyerinde üreme sonuçları

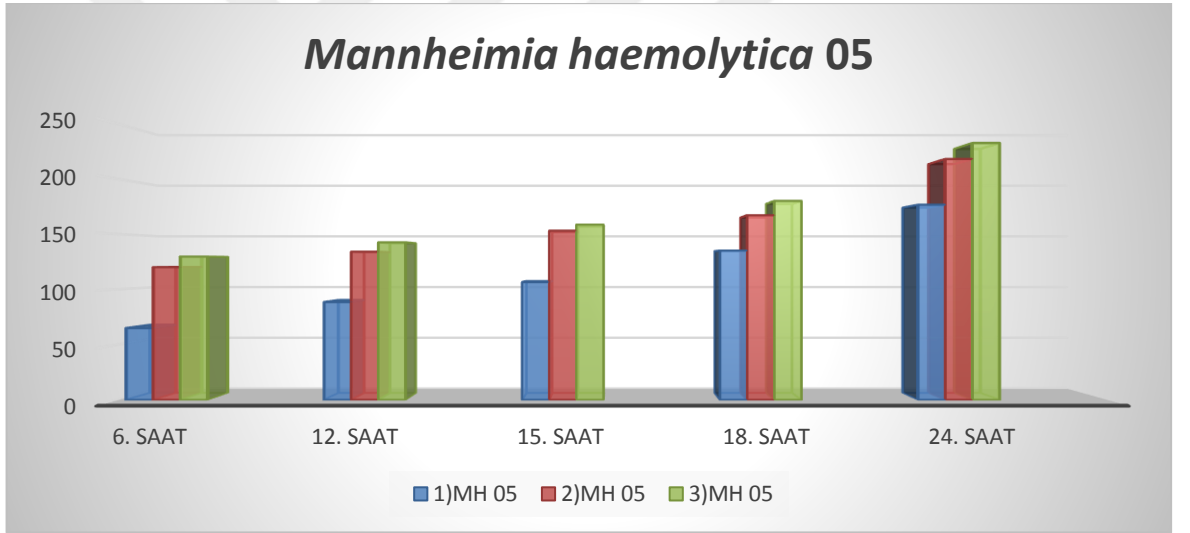
	6. Saat	12. Saat	15. Saat	18. Saat	24. Saat
1)MH 06	85,5x10 ⁶	117x10 ⁶	148,5x10 ⁶	190x10 ⁶	205x10 ⁶
2)MH 06	141x10 ⁶	178x10 ⁶	194x10 ⁶	225x10 ⁶	290x10 ⁶
3)MH 06	102,5x10 ⁶	136,5x10 ⁶	177,5x10 ⁶	200,5x10 ⁶	275,5x10 ⁶
R-MH06	36X10 ⁶	49,5X10 ⁶	55,5x10 ⁶	66X10 ⁶	78,5X10 ⁶



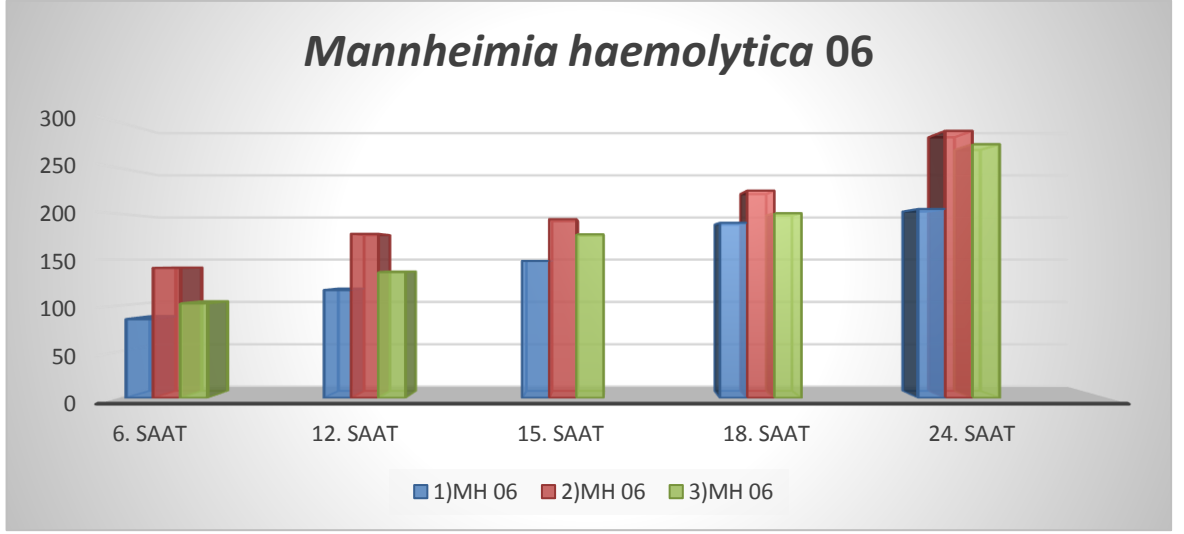
Şekil 4.2. *M. haemolytica* 03 suşun 4 farklı besiyerinde üreme durumları (1. sütun BHIB, 2. sütun BHIB+%1 Y. extract, 3. sütun BHIB+%5 Serum)



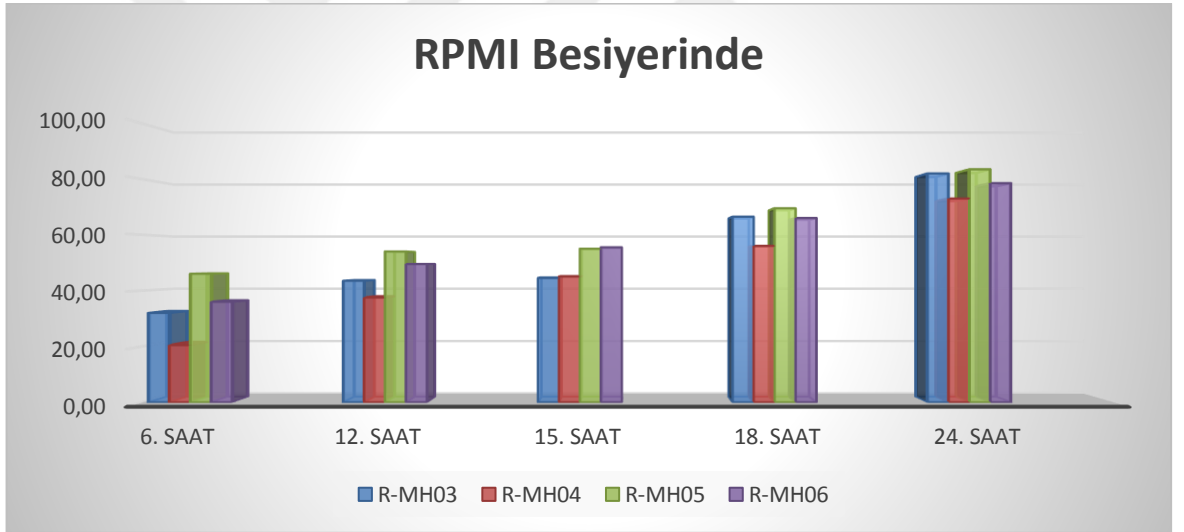
Şekil 4.3. *M. haemolytica* 04 suşun 4 farklı besiyerinde üreme durumları (1. sütun BHIB, 2. sütun BHIB+%1 Y. extract, 3. sütun BHIB+%5 Serum)



Şekil 4.4. *M. haemolytica* 05 suşun 4 farklı besiyerinde üreme durumları (1. sütun BHIB, 2. sütun BHIB+%1 Y. extract, 3. sütun BHIB+%5 Serum)



Şekil 4.5. *M. haemolytica* 06 suşun 4 farklı besiyerinde üreme durumları (1. sütun BHIB, 2. sütun BHIB+%1 Y. extract, 3. sütun BHIB+%5 Serum)



Şekil 4.6. RPMI besiyerinde 4 farklı suşun üreme durumları (1. sütun MH03, 2. sütun MH04, 3. sütun MH05, 4. sütun MH06)

4.4. Test Besiyerlerin Kültür Süpernatantlarında Lökotoksin Seviyelerinin Karşılaştırılması Sonuçları

Dört farklı besiyerinde üreyen 4 farklı suşun kültür filtratları direkt ELISA da lökotoksin salgılanması açısından karşılaştırıldılar. Karşılaştırmada 16 farklı kombinasyonun kültür filtratlarının antijen olarak kullanıldığı direkt ELISA da elde edilen optik dansite (OD) değerlerinin ortalaması baz alınmıştır. Sonuçlar Tablo 4.8.' de

gösterilmiştir. Besiyerlerinin lökotoxin oluşturma özellikleri arasında istatistiki açıdan önemli bir fark vardı. Buna göre RPMI besiyeri, BHIB (1), BHIB+%1 Yeast(2), BHIB+%5(3) besiyerlerinden istatistiki açıdan önemli derecede farklı bulunmuştur ($P<0.001$). Tüm suşlar RPMI besiyerinde diğer besiyerlerine göre daha fazla lökotoxin oluşturdular. Yapılan deneye göre en yüksek lökotoxini MH05 ve ikinci olarak MH06 suşları ürettiler. MH03 ve MH04 arasında bu açıdan önemli bir fark gözlenmedi.

Tablo 4.8. Test besiyerlerin kültür süpernatantlarında lökotoxin seviyelerinin direkt ELISA ile karşılaştırılması

Suş/besiyeri kombinasyonu	Optik dansite (OD)değeri ortalaması	Blank OD/-kontrol OD ort.	Suş/besiyeri kombinasyonu	Optik dansite (OD)değeri ortalaması	Blank OD/-kontrol OD ort.
MH 03 BAA-410/BHIB	0.637	0.035/0.09	MH 05/ BHIB	0.792	0.05/0.09
MH 03 BAA-410/ BHIB+%1 Yeast Extract	0.541	0.04/0.09	MH 05/ BHIB+%1 Yeast Extract	0.676	0.045/0.09
MH 03 BAA-410/ BHIB+%5 serum	0.522	0.04/0.095	MH 05+ %5 serum	0.6	0.055/0.12
MH 03 BAA-410/ RPMI	0.828	0.045/0.09	MH 05/ RPMI	1.286	0.05/0.095
MH 04/ BHIB	0.523	0.04/0.09	MH 06/ BHIB	0.669	0.055/0.1
MH 04/ BHIB+%1 Yeast Extract	0.503	0.035/0.09	MH 06/ BHIB+%1 Yeast Extract	0.608	0.045/0.09
MH 04+ %5 serum	0.489	0.04/0.1	MH 06+ %5 serum	0.555	0.05/0.1
MH 04/ RPMI	0.771	0.04/0.09	MH 06/ RPMI	0.948	0.055/0.13

5. TARTIŞMA

Mannheimiosis, dünya genelinde tüm sığır ölümlerinin yaklaşık %30'undan sorumludur. Sağlıklı sığırlarda göreceli olarak patojen olmayan A2 ve A4 bu bölgeleri işgal etmişken patojenik A1 serotipleri düşük sayıdadır. Tam mekanizma çok açık olarak bilinmemesine rağmen çevresel stress faktörleri ve beraberinde eşlik eden viral ve bakteriyel ajanlar A1 serotipinin üst solunum yollarında hızlıca artmasına neden olur. Dolayısı ile A1 serotipinin selektif olarak çoğalması mannheimiosisin gelişmesi için bir ön koşul olarak değerlendirilmektedir (2).

M. haemolytica, hastalığın patogenezinde çok önemli role sahip birtakım virülans faktörlerine sahiptir. *M. haemolytica*'nın potansiyel virülans faktörleri arasında lökotosin (Lkt), ve Lipopolisakkarit (LPS) en önemli olan virülans faktörlerindedir. Lkt, 102-105 kDa'lık bir *M. haemolytica* ekzotoksini olup metabolik aktif hücreler lökotosini logaritmik faz boyunca en fazla üretilirler ve lag fazı boyunca Lkt azalmaya devam eder. Logaritmik üreme fazında bakterinin tüm serotipleri tarafından lökotosinin salgılandığı belirtilmektedir (32). Lökotoksine doğal ya da deneysel yol ile maruz kalan sığır ve koyunlarda lkt'a karşı gelişen antikorların hastalığa karşı bağışıklıkta koruyucu olduğu gösterildikten sonra bu moleküle duyulan ilgi artmış ve *M. haemolytica* A1 kültür süpernatantı, mannheimiosa karşı aşılama için kullanılmaya başlanmıştır. Ancak lökotosinin in vitro ve in vivo ekspresyon ve üretim düzeyleri farklı ve in vitro üretimi oldukça sınırlıdır. Sığır ve koyunlardan izole edilen *M. haemolytica* suşlarının çoğu Lkt üretmesine karşın tüm suşlar eşit olarak patojenik değildir. Çünkü bu suşlar benzer lökotosik aktivite göstermezler üretilen lökotosin miktarları değişkendir ve dolayısı ile hastalığın patogenezi salgılanan Lkt miktarı ile doğrusal orantılıdır (18, 34).

Bu nedenlerle çalışmamızda 4 farklı *M. haemolytica* suşunun 4 değişik besiyerlerinde lökotosin üretme yetenekleri karşılaştırıldı. Ayrıca endüstriyel aşı üretimindeki hedef karlılık olduğu için birim besiyerinden alınan bakteri sayısının en fazla olduğu besiyerinin kullanılması amaçlandı.

Bakterilerin üretim için kullanılan besiyerleri ise BHIB, BHIB+%1 Yeast Extract, BHIB+%5 Serum şeklinde seçildi. Lkt üretimi üzerine besin maddelerinin etkisine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bakterinin üretimi için en yaygın olarak kullanılan besiyerleri içine sıklıkla sığır fetal serum veya albümin katılan Brain heart infüzyon broth

(BHIB) ve RPMI 1640 besiyerleridir (34, 55). Test ve referens suşların bu besiyerlerinde kültürlerinin 6. 12. 15. 18. ve 24. saatlerindeki canlılık sayımları yapılarak lkt'nin en fazla üretildiği üreme safhası olan log fazında alınması sağlandı (Tablo 4.2. ve Tablo 4.3.).

M. haemolytica üremek için besin maddelerine olan gereksinimi açısından nazlı bir bakteri olarak kabul edilmektedir. *M. haemolytica* sıvı besiyerinde ürerken fazla miktarda asetik asit biriktirmekte ve bu da ortamın asitliğini etkilemektedir (9). Öyleki üretilen asetik asit bazen üretilen biyokütlenin üzerine çıkmaktadır. Besiyerindeki karbonun büyük kısmı asetik asit birikimine yol açtığı için karbon sınırlı besiyerlerinin bu yüzden asetik asit üretimini sınırlandırdığı ve lökotoksin üretimini artırdığı bildirilmektedir (54). Du perez ve ark. (56), yaptığı bir çalışmada karbonun sınırlandırıldığı vasatların kullanımı lökotoksin konsantrasyonunu maksimize ederken asetik asit üretimini minimize etmiştir.

Bu çalışmada alınan sonuçlara göre besiyerlerinin canlı bakteri sayımı üzerine etkileri açısından aralarındaki farklılıklar değerlendirildiğinde, RPMI besiyeri diğer besiyerlerinden anlamlı derecede farklı bulunmuştur ($P<0.001$). Canlılık sayısını en fazla artıran besiyeri BHIB+%5 serum besiyeri olmasına karşın canlı bakteri sayısının en az olduğu besiyeri RPMI olmuştur. Bu sonucun nedeni içinde bol miktarda karbon kaynağı, vitamin ve amino asit bulunan kimyasal olarak tanımlı olmayan BHIB ve bu besiyerine ekstra vitamin kaynağı olarak eklenen yeast extract ve diğer esansiyel besin öğeleri açısından zengin olan serumun da ilavesi ile test suşları beklendiği gibi en iyi üremeyi RPMI haricindeki besiyerlerinde göstermişlerdir. Zira RPMI besiyerinde bakteriler karbon ve demir sınırlı bir ortamda üremek zorunda kalmışlardır. Bu bulgumuzu bir çok araştırmacının bu yöndeki bulguları da desteklemektedir (54,56,58,63).

Test edilen MH03, MH04, MH05 ve MH06 suşlarının besiyerlerindeki canlılık sayım sonuçları (üreme özellikleri) açısından aralarında istatistiki olarak bir fark görülmemiştir ($P>0.05$). Gıda maddelerinin bol olduğu besiyerlerinde canlılık sayısının fazla olması ve tersi durumda az olması beklenen bir durum olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada 4 farklı besiyerinde üreyen 4 farklı suşun kültür filtratları direkt ELISA da lökotoksin salgılanması açısından karşılaştırıldılar. Karşılaştırmada 16 farklı kombinasyonun kültür filtratlarının antijen olarak kullanıldığı direkt ELISA da elde edilen optik dansite (OD) değerlerinin ortalaması baz alınmıştır (Tablo 4.8.). Tüm suşlar RPMI besiyerinde diğer besiyerlerine göre daha fazla lökotoksin oluşturduklar. Yapılan

deneye göre en yüksek lökotoskini MH05 ve ikinci olarak MH06 suşları ürettiler. MH03 ve MH04 arasında bu açıdan önemli bir fark gözlenmedi. Ancak burada lökotoskin oluşturma kabiliyetleri açısından çok önemli bir fark görülmedi. Oysa tüm. *M. haemolytica* suşlarının farklı düzeylerde lökotoskin salgıladıkları bilinmektedir. Muhtemelen bu çalışma çok sayıda izolatla yapılmış olsaydı belki de böyle bir ciddi farklılığın gözlenmesine olanak verebilecekti.

Besiyerleri lökotoskin üretimi açısından istatistiki olarak birbirlerinden önemli derecede farklı idi ($p < 0.001$). En fazla lökotoskin üretimi RPMI besiyerinde oldu. Bakterilerin ekprese ettiği virülans faktörlerinin infekte konakçıda ve standard laboratuvar besiyerlerinde birbirinden oldukça farklı olduğu bilinmektedir (2,54,57,59). RPMI besiyerinde olduğu gibi bakterinin maruz kaldığı açlık ve demir kısıtlı ortamlar, bakteriye bir canlı içinde çoğalmaya çalışmayı taklit eden bir çevre yaratabilir. Örneğin *M. haemolytica* siderofor üretmediği için demiri elde etmek için çeşitli virülans faktörleri sağlamakta ve bunu demir sağlamada önemli bir mekanizma olarak kullanmaktadır.

Bu çalışmada canlılık sayımı ile lökotoskin arasında bir korelasyon gözlenmemiştir. Zaten yüksek hücre yoğunluğunun yüksek lökotoskin düzeyini yansıtmadığı bir çok araştırmacı tarafından da bildirilmiş bir konudur (54,56,58,59). Sonuç olarak, açlık ve kısıtlı demir varlığı gibi stress faktörlerinin *Mannheimia haemolytica*'nın daha fazla lökotoskin ve muhtemelen diğer virülans faktörleri üretmesine yol açtığı kanısına varıldı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Aşı üretim aşamalarında veya endüstriyel üretim amacıyla yapılan işlemlerde amaca yönelik etkin üretim sonuç alınması için önem arz etmektedir. Dolayısıyla içinde lökotoxin üretilen besiyeri tipinin dikkate alınması, bu besiyerleri kültür süpernatantları aşı üretiminde kullanılacaksa son derece önemlidir. Lökotoxinin başta olmak üzere diğer virülans faktörlerinin bulunduğu kültür süpernatantlarından yapılan aşılarda koruyucu bağışıklıkta önemi bulunduğundan, *M. haemolytica* için aşı üretiminde besiyeri seçilirken canlı bakterinin sayısının çok olmasından ise virülans faktörlerin çok olması öncelikli hedef olmalıdır. *M. haemolytica* sıvı besiyerinde ürerken fazla miktarda asetik asit biriktirmekte ve bu da ortamın asitliğini etkilemektedir. Aşırı asitlik lökotoxin miktarını azaltmaktadır. Bunu kontrol altına almak için kontrollü biyoreaktörlerin kullanımı pH değerini lökotoxin için optimal olan 7,3-8.0 aralığında tumağa yardımcı olacaktır. Lökotoxin üretimi normalde in vitro ortamda son derece az olduğundan, besiyerinin RPMI ve türevleri gibi kimyasal olarak tanımlı besiyeri olması ve bu besiyerlerinin ortama verilecek çözülmüş oksijen, hava, ısı, karışım yoğunluğu pH gibi üreme parametreleri yönünden sürekli takip altında olan fermentörlerde yapılması ekonomik bir aşı üretimine katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

- 1- Frank GH. Pasteurellosis of cattle. In: Pasteurella and pasteurellosis. Eds: C. Adlam and J. M. Rutter. New York, NY, Academic Press 1989, 197-222.
- 2- Singh K, Ritchey JW, and Confer AW. Mannheimia haemolytica: Bacterial-Host Interactions in Bovine Pneumonia. Veterinary Pathology 2011, 48(2): 338-348.
- 3- Yates WDG. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. Can J Comp Med 1982, 46: 225-263.
- 4- Confer AW. Update on bacterial pathogenesis in BRD. Anim Health Res Rev 2009, 10: 145-148.
- 5- Adamu JY. Mannheimia haemolytica: Phylogeny and genetic analysis of its major virulence factors. Israel Journal of Veterinary Medicine 2007, 61: 85-96.
- 6- Blackall PI, Bojosen AM, Christensen H. Reclassification of (Pasteurella) trehalosi as Bibersteinia trehalosi gen. nov., comb., nov, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2007, 57: 666-674.
- 7- Aydın N. Pasteurella, Mannheimia, Haemophilus ve Actinobacillus İnfeksiyonları. In: Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar), Ed: Aydın N, Paraciklioğlu J. Ankara: İlke Emek yayınları 2006, 171-193.
- 8- Gilmour NJL, Angus KW. Pasteurellosis. In "Disease of sheep". Ed. by WB Martin, London, Blackwell Scientific Publication 1983, 3-8.
- 9- Panciera RJ, Corsvet RE. Bovine Pneumonic Pasteurellosis: Model for Pasteurella haemolytica and Pasteurella multocida induced pneumonia in cattle. Am J Vet Res 1984, 45(12): 2532-3537.
- 10- Gibbs HA, Allan EM, Wiseman A. Experimental production of bovine pneumonic pasteurellosis. Res Vet Sci 1984, 37: 154-166.
- 11- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=712>.
- 12- Aydın N. Pasteurellaceae familyası, Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS Özel Mikrobiyoloji, Epidemiyoloji, Bakteriyel ve Mikotik İnfeksiyonlar, Medisan Yayın Serisi, No: 26, 4. Baskı, Ankara 1997, 64-74.
- 13- Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. (6. Edition). Lippincott Williams & Wilkins. Chepter 8. 2006, 459-467.

14- Quin PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology. Elsevier Health Sciences 1999, 254-259.

15- Quirie MW, Donachie and. Gilmour NJ. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from cattle. Vet Rec 1986, 119: 93-94.

16- Angen OR, Mutters DA, Caugant JE, Olsen and Bisgaard M. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1999, 49: 67-86.

17- Klima CL, Alexander TW, Hendrick S, McAllister TA. Characterization of *Mannheimia haemolytica* isolated from feedlot cattle that were healthy or treated for bovine respiratory disease. The Can J. Vet. Res 2014, 78: 38-45.

18- Rice JA, Carrasco- Medina L, Hodgins DC, Shewen PE. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. Anim. Health. Res. Rev 2008, 8: 117- 128.

19- Frank GH, and Smith PC. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves. Am J Vet Res 1983, 44: 981-985.

20- Davies RL, Arkinsaw S, Selander RK. Evolutionary genetics of *Pasteurella haemolytica* isolates recovered from cattle and sheep. Infect Immun 1997, 65: 3585–3593.

21- Houghton SB, Gourlay RN. Bacteria associated with calf pneumonia and their effect on gnotobiotic calves. Res Vet Sci 1984, 37(2): 194-198.

22- Allan EM, Wiseman A, Gibbs HA. and Selman IE. *Pasteurella* species isolated from the bovine respiratory tract and their antimicrobial sensitivity patterns. Vet. Rec 1985, 117: 629-631.

23- Tegtmeier C, Uttenthal AA, Friis NF, Jensen NE, Jensen HE. Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. J Vet Med B 1999, 46: 693-700.

24- Erdağ O, Erdoğan İ, Türkaslan J ve Gürel A. Buzağı ve dana pnömonilerinde mikoplazma ve bakteriyel etkenlerin izolasyonu, identifikasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Pendik Vet Microbial Derg 1993, 24(2): 143-148.

25- Hazıroğlu R, Erdeğer J, Gülbahar MY, Kul O. Association of *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* and *Haemophilus somnus* with pneumonia in calves. Dtsch Tierarztl Wschr 1997, 104: 125-164.

26- Özkan Ö, Bulu AA, Dörterler R, Hoştürk F. Kars yöresinde önemli salgın ve belirli sendromlarla seyreden hayvan hastalıklarının epidemiyolojisi üzerine araştırmalar. *Etlık Vet. Mikrobiol. Derg* 1993, 7(4): 115-135.

27- Al-Ghamdi GM, Ames TR, Baker JC, Walker R, Chase CC, Maheswaran SK. Serotyping of Mannheimia (Pasteurella) haemolytica isolates from the upper Midwest United States. *J. Vet. Diagn. Invest* 2000, 12(6): 576-578.

28- Maheswaran SK, Weiss DJ, Ames TR, Kannan MS: Pasteurella haemolytica A1 and Bovine Respiratory Disease. Pathogenesis, *journal of Veteribary internal Medicine* 1992, 6(1): 11-22.

29- Jeyaseelan S, Sreevatsan S, Maheswaran SK. Role of Mannheimia haemolytica leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Anim. Health Res. Rev* 2002, 3: 69- 82.

30- Zechinon L, Fett T, Desmecht D. How Mannheimia haemolytica defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet. Res* 2005, 36: 133-156.

31- Czuprynski CJ, Leite F, Sylte M, Kuckleburg C, Schultz R, Inzana T, et al. Complexities of the pathogenesis of Mannheimia haemolytica and Haemophilus somnus infections: challenges and potential oppurtunities for prevention? *Animal Health Research Reviews* 2004, 5(2); 277-282.

32- Shewen PE, Wilkie BN. Evidence for the Pasteurella haemolytica cytotoxin as a product of actively growing bacteria. *Am J Vet Res* 1985, 46(5): 1212-1214.

33- Highlander SK, Chidambaram M, Engler MJ. DNA sequence of the Pasteurella haemolytica leukotoxin gene cluster. *DNA* 1989, 8(1): 15-28.

34- Saadati M, Gibbs HA, Parton R, Coote JG. Characterisation of the leukotoxin produced by different strains of Pasteurella haemolytica. *J Med Microbiol* 1997, 46: 276-284.

35- Reggie YCL, McKerral LJ, Hills TL, Kostrzynska M. Analysis of the Capsule Biosynthetic Locus of Mannheimia (Pasteurella) haemolytica A1 and Proposal of a Nomenclature System. *Infect. Immun* 2001, 69: 4458- 4464.

36- Clinkenbeard KD, Mosier DA, Confer AW. Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by Pasteurella haemolytica leukotoxin. *Infect Immun* 1989, 57(2): 420-425.

37- Atapattu DN, Czuprynski CJ. Mannheimia haemolytica leukotoxin induces apoptosis of bovine lymphoblastoid cells (BL-3) via a caspase-9-dependent mitochondrial pathway. *Infect Immun* 2005, 73(9): 5504-5513.

38- Stevens PK, Czuprynski CJ. Pasteurella haemolytica Leukotoxin Induces Bovine Leukocytes To Undergo Morphologic Changes Consistent with Apoptosis In Vitro. *Infect. Immun* 1996, 64: 2687-2694.

39- Davies RL, Baillie S. Cytotoxic activity of Mannheimia haemolytic strains in relation to diversity of the leukotoxin structural gene lktA. *Vet Microbiol* 2003, 92: 263-279.

40- Lafleur RL, Malazdrewich C, Jeyaseelan S, Bleifield E, Abraham MS, Maheswaran SK. Lipopolysaccharide enhances cytolysis and inflammatory cytokine induction in bovine alveolar macrophages exposed to Pasteurella (Mannheimia) haemolytica leukotoxin. *Microb. Pathog* 2001, 30: 347-357.

41- Malazdrewich C, Ames TR, Abrahamsen MS. Pulmonary expression of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 in the acute phase of bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet Pathol* 2001, 38(3): 297-310.

42- Adlam C. The structure function and properties of cellular and extracellular components of Pasteurella haemolytica. Adlam C, Rutter JM (Eds) *Pasteurella and Pasteurellosis*, Inc. New York Academic Press 1989, 75-94.

43- De la Mora A, Trigo F, Jaramillo L. The N-acetyl-Dglucosamine specific adhesin from Mannheimia haemolytica activates bovine neutrophils oxidative burst. *Vet Immunol Immunop* 2006, 113(1-2): 148-156.

44- Retzer MD, Yu R, Zhang Y. Discrimination between apo and iron-loaded forms of transferrin by transferrin binding protein B and its Nterminal subfragment. *Microb Pathogenesis* 1998, 25(4): 175-180.

45- Ayalew S, Confer AW, Payton ME. Mannheimia haemolytica chimeric protein vaccine composed of the major surface-exposed epitope of outer membrane lipoprotein PlpE and the neutralizing epitope of leukotoxin. *Vaccine* 2008, 26: 4955-4961.

46- Mahasreshti PJ, Murphy GL, Wyckoff III JH, Farmer S, Hancock REW, Confer AW. Purification and Partial Characterization of the OmpA Family of Proteins of Pasteurella haemolytica. *Infect. Immun* 1997, 65: 211-218.

47- Diker KS, Kaya O, Akan M. Koyun pnöymonik Pasteurella infeksiyonlarına karşı aşı geliştirme çalışmaları. TÜBİTAK Proje No: VHAG- 997, Ankara 1995, 51-60.

48- Maheswaran SK, Weiss DJ, Kannan MS. Effects of Pasteurella haemolytica A1 leukotoxin on bovine neutrophils: degranulation and generation of oxygen derived free radicals. *Vet Immunol Immunop* 1992, 33(1-2): 51-68.

49- Iovane G, Galdiero M, Vitiello M. Effect of Pasteurella haemolytica outer membrane proteins on bovine neutrophils. *FEMS Immunol Med. Mic* 1998, 20(1): 29-36.

50- Straus DC, Pudry CW, Loan RW, Briggs RF, Frank GH. In Vivo Production of Neuraminidase by *Pasteurella haemolytica* in Market Stressed Cattle After Natural Infection. *Curr. Microbiol* 1998, 37: 240-244.

51- Straus DC, Jolley WL, Purdy CW. Characterization of Neuraminidases Produced by Various Serotypes of *Pasteurella haemolytica*. *Infect. Immun* 1993, 61: 4669-4674.

52- White DJ, Jolley WL, Purdy CW, Straus DC. Extracellular Neuraminidase Production by a *Pasteurella multocida* A:3 Strain Associated with Bovine Pneumonia. *Infect. Immun* 1995, 63: 1703-1709.

53- Lee CW, Shewen PE. Evidence of bovine immunoglobulin G1 (IgG1) protease activity in partially purified culture supernate of *Pasteurella haemolytica* A1. *Can J Vet Res* 1996, 60(2): 127-32.

54- Oppermann T, Busse N, Czermak P. *Mannheimia haemolytica* growth and leukotoxin production for vaccine manufacturing-A bioprocess review. *Electronic Journal of Biotechnology* 2017, 28: 95-100.

55- Urban-Chmiel R, Wernicki A, Puchalski A, Mikucki P. Evaluation of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin prepared in nonsupplemented and BSA and FBS supplemented RPMI 1640 medium. *Pol J Vet Sci* 2004, 7: 1-8.

56- Du Preez JC, Van Rensburg E, Kilian SG. Kinetics of growth and leukotoxin production by *Mannheimia haemolytica* in continuous culture. *J. Ind Microbiol. Biotechnol* 2008, 35: 611-618.

57- Smith H. Pathogenicity and the microbe in vivo. *Journal of General Microbiology* 1990, 136: 377-383.

58- Odendaal MW, Ellis CE. The production and evaluation of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin in the supernatant of submerged cultures in fermenters. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 1999, 66: 265-272.

59- Davies RL, Parton R, Coote JG, Alison Gibbs H, Freer JH. Outer-membrane protein and lipopolysaccharide variation in *Pasteurella haemolytica* serotype A1 under different growth conditions. *Journal of General Microbiology* 1992, 138: 908-922.

60- White BJ, Renter DG. Bayesian Estimation of the Performance of Using Clinical Observations and Harvest Lung Lesions for Diagnosing Bovine Respiratory Disease in Post-weaned Beef Calves. *J. Vet. Diagnostic Investig* 2009, 21: 446-453.

61- Elitok B, Elitok OM. Clinical efficacy of carprofen as an adjunct to the antibacterial treatment of bovine respiratory disease. *J. Vet. Pharmacol. Ther* 2004, 27: 317-320.

62- Tucci P, Estevez V, Becco L, Cabrera-Cabrera F, Grotiuz G, Reolon E, et al. Identification of Leukotoxin and other vaccine candidate proteins in a *Mannheimia haemolytica* commercial antigen, *Heliyon*, 2 article 2016, 12: 58-66.

63- Shewen PE, Wilkie BN. Vaccination of calves with leukotoxic culture supernatant from *Pasteurella haemolytica*. *Can. J. Vet. Res* 1988, 52: 30-36.

64- Cameron CM, Bester FJ. Response of sheep and cattle to combined polyvalent *Pasteurella haemolytica* vaccines. *Onderstepoort J. Vet. Res* 1987, 51: 204-211.

65- Confer AW, Panciera RJ, Fulton RW, Gentry MJ. Immunologic response and resistance to experimentally induced pneumonic pasteurellosis in cattle vaccinated with various dosages of lyophilized *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res* 1986, 4(8): 1853-1856.

66- Hodgins DC, Shewen PE. Vaccination of neonatal colostrum-deprived calves against *Pasteurella haemolytica* A1. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 2000, 64: 2-8.

67- Mosier DA, Simons KR, Chengappa MM, Confer AW. Antigenic composition of *Pasteurella haemolytica* serotype-1 supernatants from supplemented and nonsupplemented media. *Am. J. Vet. Res* 1994, 55: 348-352.

68- Srinand S, Maheswaran SK, Ames TR, Werdin RE, Hsuan SL. Evaluation of efficacy of three commercial vaccines against experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Veterinary Microbiology* 1996, 52: 81-89.

69- Ryan KA, Lory C. Characterization of a CACAG pentanucleotide repeat in *Pasteurella haemolytica* and its possible role in modulation of a novel type III restriction-modification system. *Nucl. Acids Res* 1999, 27(6): 1505-1511.

8. EKLER

8.1. Etik Kurul



Sayı : 2015/08
Konu : Yerel Etik Kurul Kararı

23/03/2015

DOLLVET A.Ş.
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(DOLLVET-HADYEK)

Sayın: Mehmet ÇELİK

19.03.2015 tarihinde kurulumuza yapmış olduğunuz "Pasteurella multocida ve Mannheimia haemolytica suşlarının farklı besiyerlerinde üreme ve lölotoksin oluşturma özelliklerinin incelenmesi" isimli 'HÜBAK' projenizde yapacağınız hayvan denemeleri kurulumuza taahhülle bulunduğunuz çerçevede dâhilinde olması şartı ile uygun bulunmuştur.

Dr. Hüseyin ZENGİN
Sorumlu Yönetici

Ek:
• Karar onayı


DOLLVET A.Ş.
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (DOLLVET-HADYEK)

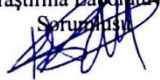
Karar No: 2015/08

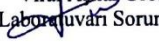
Konu : Yerel Etik Kurul Kararı


19.03.2015 tarihinde kurulumuza yapmış olduğunuz "Pasteurella multocida ve Mannheimia haemolytica suşlarının farklı besiyerlerinde üreme ve lölotoksin oluşturma özelliklerinin incelenmesi" isimli 'HÜBAK' projenizde yapacağınız hayvan denemeleri kurulumuza başvuruda bulunulmuştur.

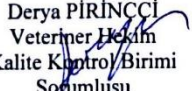
Yapılan başvuru formunun incelenmesi sonucu çalışmanın uygun olduğu görüşüne oy birliğince karar verilmiştir.


Dr. Hüseyin ZENGİN
Sorumlu Yönetici

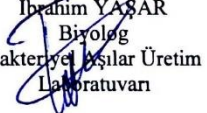
Hülya KAPLAN
Veteriner Hekim
Deney Hayvanları Üretim ve
Araştırma Laboratuvarı
Sorumlusu


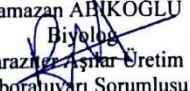
Dr. Nilay ÜNAL
Veteriner Hekim
Viral Aşılama Üretim
Laboratuvarı Sorumlusu


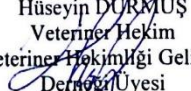
Cahit BAYBURS
Veteriner Hekim
Bakteriyel Aşılama Üretim
Laboratuvarı Sorumlusu


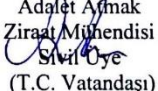
Derya PİRİNCCI
Veteriner Hekim
Kalite Kontrol Birimi
Sorumlusu


Hilal ZENGİN
Veteriner Hekim
Hayvan Keşif Birimi
Sorumlusu



İbrahim YAŞAR
Biyolog
Bakteriyel Aşılama Üretim
Laboratuvarı


Ramazan ABİKOĞLU
Biyolog
Paraziter Aşılama Üretim
Laboratuvarı Sorumlusu


Hüseyin DURMUŞ
Veteriner Hekim
Veteriner Hekimliği Gelişim
Derneği Üyesi
(T.C. Vatandaşı)


Adalet Ayık
Ziraat Mühendisi
Sivil Üye
(T.C. Vatandaşı)


8.2. Orjinallik Beyanı

	T.C. HARRAN ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
---	---

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLIK RAPORU VE BEYAN BELGESİ

Öğrencinin	
Numarası	: 145326001
Adı, Soyadı	: Mehmet Çelikk
Anabilim Dalı (Bölümü)	: Mikrobiyoloji (Veterinerlik)
Program	: <input checked="" type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora
Tezin Adı	: Monohemiin analitik ve sentezinin farklı bölgelerinde
Yürütme	: İhtisarı, sentez, karakterizasyon, inceleme

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yukarıda başlığı belirtilen yüksek lisans çalışmamın; kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç kısımlarından oluşan toplam 61 sayfalık kısmına ilişkin 27.05/2013 tarihinde şahsım/ danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orjinallik raporuna göre, benzerlik oranı %18 tür.

Uygulanan filtrelemeler:

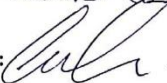
- 1- Kabul/Onay ve Bildirim sayfaları hariç,
- 2- Kaynakça hariç
- 3- Alıntılar hariç
- 4- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Yukarıda bilgileri verilen tezin, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından kabul edilen lisansüstü orjinallik raporu alınması uygulama esasları ile belirlenen azami benzerlik oranlarını aşmadığını ve bütün bilgilerin, akademik kurallara uygun olarak toplanıp sunulduğunu, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçları andığımı, blok şeklinde alıntılar yapmadığımı ve tüm alıntılarının bilimsel atıf kuralları çerçevesinde kaynağını gösterdiğimi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ile Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesinin 8. maddesinde yer alan etik ihlallerden herhangi birisinin yer almadığını, etik ihlal tespiti halinde, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca, diplomamın iptal edilmesini kabul ediyorum.

Gereğini saygılarımla arz ederim. 27/05/2013

Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Adı-Soyadı: Mehmet Çelikk

İmzası: 

Yukarıda yer alan raporun ve beyanın doğruluğunu onaylarım. 27.05/2013

Danışmanın

Unvanı-Adı-Soyadı: Doç. Dr. Semra ERÖZLÜ

ÇİĞDEM

İmzası: 

8.3. Turnitin

27.05.2019

Turnitin

Turnitin Orijinallik Raporu	
İşleme kondu: 2019年05月27日 10:35 +03 NUMARA: 1136440389 Kellme Sayısı: 11560 Gönderildi: 1	
Deneme Mehmet Çelik tarafından	
Benzerlik Endeksi %18	Kaynağa göre Benzerlik Internet Sources: %13 Yayınlar: %4 Öğrenci Ödevleri: %9

3% match (18-Ağu-2017 tarihli öğrenci ödevleri) Sınıf: Microbiology Ödev: BRUCELLA VE ALFA-PROTEOBACTERİA GRUBUNA AİT BAZI BAKTERİ CİNSLERİ ARASINDAKİ SEROLOJİK ÇAPRAZ REAKSİYONLARIN BRUSELLOZUN SEROLOJİK TANISINDA POTANSİYEL UYGULANABİRLİĞİ YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI Ödev Numarası: 838020839
3% match (07-May-2019 tarihli internet) http://adudspace.adu.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11607/272/Goksel_Erbas_tez.pdf?isAllowed=y&sequence=3
2% match (10-Oca-2019 tarihli internet) http://adudspace.adu.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11607/267/erhan_baysan_tez.pdf?isAllowed=y&sequence=3
1% match (06-Tem-2017 tarihli internet) https://semspub.epa.gov/work/02/235905.pdf
1% match (02-Oca-2017 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Ondokuz Mayıs Üniversitesi on 2017-01-02
1% match (19-Eki-2015 tarihli internet) http://www.tarim.gov.tr/GKGM/Belgeler/Veteriner%20Hizmetleri/teshiste_metod_birligi/bakteriyoloji.pdf
1% match (22-Şub-2006 tarihli internet) http://www.jbilife.com/product/pdf/LM011-04.pdf
1% match (27-Ara-2017 tarihli internet) http://acikerisim.aku.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/11630/2192/458722.pdf?isAllowed=y&sequence=1
1% match (02-Şub-2017 tarihli internet) http://www.termos-matara.com/cok-amacli-termoslar
1% match (04-Tem-2015 tarihli internet) http://adudspace.adu.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/159/anatez.doc?sequence=1&isAllowed=y
< 1% match (14-Ara-2013 tarihli internet) http://veteriner.fusabil.org/text.php3?id=746
< 1% match (09-Eki-2012 tarihli internet) http://vfdergi.yyu.edu.tr/archive/2010/21_1/2010_21_(1)_31-34.pdf
< 1% match (17-Mar-2016 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Kastamonu University on 2016-03-17
< 1% match (07-May-2019 tarihli internet) http://adudspace.adu.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11607/3410/%c3%b6znur09.doc?isAllowed=y&sequence=1
< 1% match (20-Eki-2010 tarihli internet) http://www.jarvm.com/articles/Vol8Iss2/Deressa.pdf
< 1% match (18-Kas-2015 tarihli internet) http://vetkontrol.tarim.gov.tr/adana/Belgeler/Dergi%202012-2/Makale%203.pdf

https://www.turnitin.com/newreport_printview.asp?eq=0&eb=1&esm=5&oid=1136440389&sid=0&n=0&m=2&svr=326&r=32.810978177734796&l... 1/17

8.4. Tez Veri Giriş Formu

16.07.2019

Ulusal Tez Merkezi | Tez Form Yazdır

T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10270189
Yazar Adı / Soyadı	MEHMET ÇELİK
T.C.Kimlik No	29042450062
Telefon	5066050258
E-Posta	mehmet.celik.0663@gmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	MANNHEIMIA HAEMOLYTICA SUŞLARININ FARKLI BESİYERLERİNDE ÜREME VE LÖKOTOKSİN OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ
Tezin Tercümesi	INVESTIGATION OF REPRODUCTIVE AND LEUKOTOXIN GENERATION PROPERTIES IN DIFFERENT MEDIUM OF MANNHEIMIA HAEMOLYTICA
Konu	Mikrobiyoloji = Microbiology
Üniversite	Harran Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Mikrobiyoloji (Veterinerlik) Anabilim Dalı
Bilim Dalı	
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2019
Sayfa	60
Tez Danışmanları	DOÇ. DR. SEVİL ERDENLİĞ GÜRBİLEK
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	

16.07.2019

İmza: